LIÈGE université Library

https://lib.uliege.be

https://matheo.uliege.be

Travail de fin d'études en chimie et bio-industries : Rôle de la nature des stérols membranaires dans les interactions lipopeptides-membranes.

Auteur : Stoclet, Roman
Promoteur(s) : Deleu, Magali
Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)
Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée
Année académique : 2025-2026
URI/URL : http://hdl.handle.net/2268.2/26751

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.

LIÈGE université
Gembloux
Agro-Bio Tech

RÔLE DE LA NATURE DES STÉROLS MEMBRANAIRES DANS LES INTERACTIONS LIPOPEPTIDES-MEMBRANES

ROMAN STOCLET

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

ANNÉE ACADÉMIQUE 2025-2026

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.

LIÈGE université
Gembloux
Agro-Bio Tech

RÔLE DE LA NATURE DES STÉROLS MEMBRANAIRES DANS LES INTERACTIONS LIPOPEPTIDES-MEMBRANES

ROMAN STOCLET

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

ANNÉE ACADÉMIQUE 2025-2026

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 (LBMI) mais également pour sa disponibilité, sa bienveillance et la qualité de son encadrement.

Je tiens également à témoigner toute ma gratitude à mon encadrante, Amélie Goret, doctorante au sein du laboratoire de biophysique moléculaire aux interfaces (LBMI), pour tout le temps consacré et l'aide apportée pour les explications des manipulations.

Je souhaite également remercier Catherine, technicienne du laboratoire de biophysique moléculaire aux interfaces (LBMI) 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.

Mes remerciements vont également à mes parents et mon frère, 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 ma petite amie, Manon Verdeau, qui a toujours été là pour me soutenir pendant les périodes de stress et aussi pour partager des bons moments.

Résumé

Les lipopeptides cycliques produits par les bactéries du genre *Bacillus*, notamment la surfactine, la fengycine et la lichenysine, sont des métabolites secondaires naturels dont l'action repose principalement sur leur interaction avec les membranes biologiques. La composition lipidique de ces membranes, et en particulier la nature des stérols, varie selon l'organisme considéré, le cholestérol chez les animaux, l'ergostérol chez les champignons et les phytostérols chez les plantes. Si l'interaction préférentielle de la fengycine avec les membranes fongiques riches en ergostérol est documentée, les mécanismes moléculaires sous-jacents ainsi que le rôle des stérols dans ces interactions restent peu caractérisés. Ce travail vise à évaluer de manière comparative et systématique l'influence de cinq stérols, qui sont le cholestérol, ergostérol, β-sitostérol, stigmastérol et campestérol, sur les propriétés biophysiques de membranes modèles à base de POPC et sur leurs interactions avec ces trois lipopeptides.

Trois approches complémentaires ont été utilisées. La balance à film de Langmuir en mode compression a permis de caractériser les propriétés d'organisation interfaciale des stérols purs, révélant notamment la singularité de l'ergostérol, qui n'est pas apte à former un film condensé stable, contrairement aux six autres stérols testés. La balance à film en mode adsorption a permis d'étudier la capacité d'interaction des lipopeptides avec une monocouche lipidique. La surfactine interagit de manière similaire quelle que soit la nature du stérol, confirmant son caractère non sélectif, tandis que la fengycine montre plus d'affinité pour le cholestérol et une affinité réduite pour le β-sitostérol. La calorimétrie de titration isotherme (ITC) a confirmé que la partition des trois lipopeptides dans des liposomes POPC/stérol est un processus thermodynamiquement spontané et entropiquement favorable, caractéristique de l'effet hydrophobe, avec une affinité généralement augmentée en présence de stérols par rapport au POPC pur. Enfin, la fluorescence du Laurdan sur liposomes a révélé que les trois lipopeptides induisent une rigidification de la région interfaciale de la bicouche, selon la hiérarchie fengycine < surfactine < lichenysine.

Ces résultats soulignent la non-sélectivité de la surfactine et de la lichenysine vis-à-vis de la nature du stérol membranaire, cohérente avec leurs activités biologiques larges, et confirment la sensibilité de la fengycine à la composition en stérol des membranes cibles. Ils apportent également les premières données sur les interactions membranaires de la lichenysine en présence de phytostérols.

Abstract

Cyclic lipopeptides produced by soil bacteria of the genus *Bacillus*, including surfactin, fengycin, and lichenysin, are natural bioactive compounds whose mode of action relies primarily on interactions with biological membranes. The lipid composition of these membranes, particularly the nature of sterols, varies considerably between organisms: cholesterol in animal cells, ergosterol in fungi, and phytosterols in plants. Although the preferential activity of fengycin against ergosterol-rich fungal membranes is documented, the underlying molecular mechanisms and the role of phytosterols in these interactions remain poorly understood. This work aims to systematically evaluate the influence of five sterols, cholesterol, ergosterol, β-sitosterol, stigmasterol, and campesterol, on the biophysical properties of POPC-based model membranes and on their interactions with these three lipopeptides.

Three complementary approaches were employed. Langmuir film balance experiments in compression mode characterized the interfacial organization of pure sterol monolayers at the air-water interface, revealing the atypical behavior of ergosterol, whose broad and progressive isotherm reflects its inability to form a stable condensed film. In adsorption mode, surfactin displayed homogeneous maximal insertion pressures (MIP) across all sterols, confirming its non-selective character, whereas fengycin showed a marked preference for cholesterol and a reduced affinity for β-sitosterol. Isothermal titration calorimetry (ITC) confirmed that membrane partition of all three lipopeptides into POPC/sterol liposomes is thermodynamically spontaneous and entropically driven, consistent with the hydrophobic effect, with affinities generally enhanced in the presence of sterols relative to pure POPC. Laurdan fluorescence measurements on liposomes revealed that all three lipopeptides induce an ordering effect on the bilayer interfacial region, following the hierarchy fengycin < surfactin < lichenysin at 10 and 20 µM.

Taken together, these results highlight the sterol non-selectivity of surfactin and lichenysin, consistent with their broad biological activities, and confirm the sensitivity of fengycin to the sterol composition of target membranes. They also provide the first biophysical data on lichenysin interactions with phytosterol-containing membranes, opening new perspectives on the synergistic activity of these lipopeptides in fungal biocontrol.

Table des matières

1 Mise en contexte 1

2 État de l'art 2

2.1 La rhizosphère: une zone d'interaction 2

2.1.1 Organisation microbienne de la rhizosphère 2

2.2 Les lipopeptides produits par les bactéries du sol 2

2.2.1 Les bactéries productrices et leur contexte écologique 2

2.2.2 Classification et structure générale des lipopeptides cycliques 3

2.2.3 La famille des surfactines 4

2.2.4 La famille des fengycines 6

2.3 Spécificités des membranes végétales et fongiques 7

2.3.1 Membranes végétales versus membranes fongiques 7

2.4 Les stérols : origine, diversité et rôles membranaires 8

2.5 Rôles des stérols dans les membranes : fluidité, phases et domaines 10

2.6 Structure comparée des stérols étudiés et relation structure–propriétés membranaires 10

2.6.1 Le cholestérol, structure de référence 11

2.6.2 L'ergostérol, stérol des champignons 11

2.6.3 Les phytostérols : β-sitostérol, stigmastérol et campestérol 13

2.7 Effets des lipopeptides sur les membranes plasmiques 13

2.7.1 Principes généraux d'interaction des lipopeptides avec les membranes 13

2.7.2 La surfactine : un agent membranotrope non sélectif à forte activité tensioactive 14

2.7.3 La lichenysine : données disponibles et lacunes 16

2.7.4 La fengycine : une interaction membranaire stérol-dépendante 17

2.8 Les modèles membranaires à base de POPC 18

2.8.1 Pourquoi des modèles membranaires ? Justification et types de systèmes 18

2.8.2 Le POPC comme phospholipide modèle, structure et propriétés 19

2.9 Modèles POPC/stérol, état des connaissances 19

2.9.1 POPC/cholestérol 19

2.9.2 POPC/ergostérol 20

2.9.3 POPC/phytostérols 20

2.10 Conclusion générale de l'état de l'art 21

3 Objectif 22

4 Matériel et méthode 24

4.1 Réactifs 24

4.2 Solvants 24

4.3 Informations sur les tests statistiques 24

4.4 Balance à film de Langmuir en compression : Propriétés d'organisation interfaciale des stérols à l'interface air-eau. 24

4.4.1 Matériel 24

4.4.2 Solutions 25

4.4.3 Protocole 25

4.4.4 Analyse des données 25

4.5 Balance à film de Langmuir en adsorption : Évaluation de l'insertion de la surfactine et la fengycine dans une monocouche de stérol. 25

4.5.1 Matériel 25

4.5.2 Solutions 25

4.5.3 Protocole 26

4.5.4 Analyse de données 26
4.6 Analyse thermodynamique par calorimétrie de titration isotherme 27
4.6.1 Préparation des solutions 27
4.6.2 Formation des films lipidique 27
4.6.3 Formation des liposomes 27
4.6.4 Protocole 28
4.6.5 Analyse des données 28
4.7 Étude de la fluidité membranaire en fonction de sa composition en lipides. 29
4.7.1 Préparation des liposomes 29
4.7.2 Protocole 30
4.7.3 Analyse des données 31
5 Résultats et discussions 32
5.1 Propriétés d'organisation interfaciale des stérols à l'interface air-eau 32
5.2 Adsorption des lipopeptides dans des monocouches lipidiques contenant différents stérols 35
5.3 Interaction thermodynamique des lipopeptides avec des bicouches lipidiques 39
5.4 Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes composés de différents stérols. 44
6 Discussion générale 51
7 Conclusion et perspectives 52
8 Bibliographie 56
9 Annexes 63
9.1 Contribution personnelle 82

Table des illustrations

Figure 1: Structures chimiques de la surfactine A et de la lichenysine. Les différences entre les deux molécules sont indiquées en rouge. R représente un groupement alkyle variable selon l'homologue considéré. Figure adaptée de Aranda et al (2023)[13] 4
Figure 2: Structures chimiques des fengycines.. Figure adaptée de Aranda et al (2023)[13]. 6
Figure 3: Structure générale du noyau stérane. Avec les trois cycles hexagonaux (A,B,C) et un cycle pentagonal (D). Chaine latérale variable(R). 8
Figure 4 : Voie simplifiée de la biosynthèse des stérols chez les plantes et les animaux,tirée de Sonawane et al. (2016) [45]. 9
Figure 5: Structures chimiques des cinq stérols étudiés dans ce travail. Tous partagent un noyau tétracyclique stérane (cycles A–D), un groupement hydroxyle en 3β et une double liaison Δ5. Ils se distinguent par leur chaîne latérale en C17 et leur degré d'insaturation : (a) le cholestérol (C27), stérol des membranes animales ; (b) l'ergostérol (C28), stérol fongique, caractérisé par un diène Δ5,7 et une double liaison Δ22 ; (c) le campestérol (C28), phytostérol portant un méthyle en C24 ; (d) le stigmastérol (C29), phytostérol avec un éthyle en C24 et une double liaison Δ22 ; (e) le β-sitostérol (C29), phytostérol majoritaire des plantes, portant un éthyle en C24. 11
Figure 6 : Diagramme de phase de l'interaction surfactine/POPC en fonction des concentrations totales en surfactine (C_S) et en lipide (C_L) , de Heerklotz et Seelig 2007[78], ... 15
Figure 7: Simulation de dynamique moléculaire de la lichenysine insérée dans une bicouche de POPC, tirée de Coronel et al. 2015. 16
Figure 8: **Principe de la balance à film de Langmuir en mode compression.** (Gauche) Représentation schématique de la cuve de Langmuir : les barrières mobiles compriment le film lipidique déposé à l'interface air-eau tandis que la lame de Wilhelmy mesure en continu la pression de surface (π). (Droite) Transitions de phase du film au cours de la compression, de l'état expansé vers les états liquide condensé et solide. 32
Figure 9: Isothermes de compression π-A de monocouches de différents stérols. 33

Figure 10: **Paramètres caractéristiques des isothermes de compression π-A des monocouches de stérols. (a)** Aire moléculaire au take-off (A_0, Å²), **(b)** Aire moléculaire à l'effondrement (Ac, Å²), **(c)** pression d'effondrement (πc, mN/m) et **(d)** module de compressibilité (Cs^{-1}, mN/m) calculé à 25 mN/m, pour les sept stérols étudiés : cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol, β-sitostérol, 24-méthyl cholestérol et 24α-éthyl cholestérol..... 33
Figure 11: Modules de compressibilités des différents stérols..... 35
Figure 12: Balance à film en adsorption. (a)Exemple de cinétique d'adsorption de la surfactine dans une monocouche de β-sitostérol. (b) Droite de régression réalisées avec 5 cinétiques à différentes pressions de surface initiale, deltaπ en fonction de πi..... 36
Figure 13: **Paramètres d'insertion de la surfactine et de la fengycine dans des monocouches de stérols déterminés par balance à film en mode adsorption.** Pression maximale d'insertion (MIP, mN/m) de **(a)** la surfactine et **(b)** la fengycine dans des monocouches de cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol et β-sitostérol. Ordonnée à l'origine ($d\pi_0$, mN/m) de la droite $\Delta\pi = f(\pi_0)$ pour **(c)** la surfactine et **(d)** la fengycine... 37
Figure 14: **Thermogrammes ITC de l'interaction de lipopeptides avec des liposomess de POPC/cholestérol.** Données brutes (puissance différentielle en fonction du temps) obtenues par calorimétrie de titration isotherme (ITC) lors de l'injection de **(a)** surfactine, **(b)** fengycine et **(c)** lichenysine dans des vésicules de POPC/cholestérol. Chaque pic correspond à une injection du peptide dans la cellule contenant les liposomes. 40
Figure 15: **Paramètres thermodynamiques de partition des lipopeptides dans des liposomes POPC/stérol déterminés par ITC.** Enthalpie (ΔH, a–c), énergie libre de Gibbs (ΔG, d–f) et entropie (ΔS, g–i) de partition de la fengycine (a, d, g), de la lichenysine (b, e, h) et de la surfactine (c, f, i) en présence de liposomes POPC purs ou supplémentés en cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol ou β-sitostérol (ratio molaire POPC/stérol 70:30)..... 41
Figure 16: Constantes d'affinités (K), pour chacun des systèmes. 42
Figure 17: **Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC mesuré par fluorescence du Laurdan.** Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à **(a)** 10 µM et **(b)** 20 µM, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés. 45
Figure 18: **Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC/chol mesuré par fluorescence du Laurdan.** Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à **(a)** 10 µM et **(b)** 20 µM, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés. 46
Figure 19: **Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC/ergo mesuré par fluorescence du Laurdan.** Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à **(a)** 10 µM et **(b)** 20 µM, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés. 47
Figure 20: **Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC/phytostérol (70/30 molaire) mesuré par fluorescence du Laurdan.** Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à 10 µM (panneaux gauches) et 20 µM (panneaux droits), pour les systèmes POPC/campestérol **(a, b)**, POPC/stigmastérol **(c, d)** et POPC/β-sitostérol **(e, f)**, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés..... 48

Abréviations

Camp : campestérol

Chol : cholestérol

CMC : concentration micellaire critique

Ergo : ergostérol

Feng : fengycine

Laurdan : 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene

Lich : lichenysine

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

Sito : ß-sitostérol

Stigma : stigmastérol

Surf : surfactine

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

Π : pression de surface

1 Mise en contexte

Au sein de la rhizosphère, zone de sol directement influencée par les racines végétales, les bactéries du genre *Bacillus* constituent des acteurs majeurs du biocontrôle biologique. Ces microorganismes produisent une diversité de métabolites spécialisés, parmi lesquels les lipopeptides cycliques, dont la surfactine, la fengycine et la lichenysine. Ces molécules amphiphiles exercent leurs activités biologiques principalement en interagissant avec les membranes plasmiques des organismes cibles, notamment les champignons phytopathogènes. Leur mode d'action repose sur leur capacité à s'insérer dans les bicouches lipidiques, à en perturber l'organisation et à en modifier les propriétés biophysiques.

Or, la membrane plasmique n'est pas une structure homogène et universelle. Sa composition lipidique varie considérablement d'un organisme à l'autre, en particulier en ce qui concerne la nature des stérols. Chez les animaux, le cholestérol constitue le stérol majoritaire, chez les champignons, c'est l'ergostérol, chez les plantes, un mélange de phytostérols, notamment le β-sitostérol, le campestérol et le stigmastérol, remplit ce rôle structural. Ces stérols, bien que partageant une architecture moléculaire commune, présentent des différences subtiles dans leurs chaînes latérales et leur degré d'insaturation, qui se traduisent par des propriétés membranaires distinctes.

La question de savoir dans quelle mesure ces différences de stérols influencent les interactions des lipopeptides avec les membranes reste largement ouverte. Si la sélectivité antifongique de la fengycine pour les membranes riches en ergostérol est documentée, les bases physicochimiques précises de cette sélectivité sont encore mal comprises. Le rôle des phytostérols dans ces interactions n'a quant à lui été moins étudié, malgré leur abondance dans les membranes des plantes hôtes et des pathogènes végétaux. Enfin, la lichenysine, pourtant structuralement proche de la surfactine, n'a fait l'objet que de très rares études concernant ses interactions membranaires et son éventuelle sélectivité des stérols.

2 État de l'art

2.1 La rhizosphère: une zone d'interaction

2.1.1 Organisation microbienne de la rhizosphère

Le sol constitue l'un des écosystèmes les plus complexes et les plus riches en biodiversité microbienne sur Terre. On estime qu'un gramme de sol peut contenir plusieurs milliards de microorganismes appartenant à des milliers d'espèces différentes, formant un réseau trophique et fonctionnel hautement structuré[1,2]. Parmi ces microorganismes, on distingue principalement les bactéries, les champignons, les archées, les protistes et les nématodes, chacun contribuant de manière spécifique aux cycles biogéochimiques et au maintien de la fertilité du sol.

Au sein de cet écosystème, la rhizosphère occupe une place particulière. Ce terme, introduit pour la première fois par l'agronome allemand Lorenz Hiltner en 1904, désigne la zone de sol directement influencée par la présence des racines végétales[3]. Cette zone, qui s'étend sur quelques millimètres autour des racines, est caractérisée par une activité microbienne significativement plus élevée que le sol environnant, un phénomène souvent désigné sous le terme d'« effet rhizosphère ». Cette activité est stimulée par les exsudats racinaires, constitués de sucres, d'acides organiques, d'acides aminés et de métabolites secondaires sécrétés par la plante[4,5]. Ces composés constituent une source de carbone et d'énergie pour les microorganismes, mais agissent également comme molécules signal, attirant ou inhibant certaines espèces microbiennes. Ainsi, la composition de la communauté microbienne rhizosphérique est le reflet d'une interaction dynamique et bidirectionnelle entre la plante et le sol.

Les champignons mycorhiziens sont présents dans la rhizosphère. Ces champignons établissent des associations symbiotiques mutualistes avec les racines de la grande majorité des plantes terrestres, estimée à plus de 80 % des espèces végétales, en colonisant les tissus racinaires et en déployant un réseau d'hyphes qui s'étend bien au-delà de la zone racinaire. Ce réseau d’hyphes augmente considérablement la surface d'absorption effective de la plante, facilitant l'acquisition de nutriments peu mobiles dans le sol, notamment le phosphore et l'azote, en échange de composés carbonés fournis par l'hôte[6,7]. Par cette double capacité à prolonger physiquement l'interface racine-sol et à moduler la composition de la communauté microbienne environnante, les champignons mycorhiziens constituent un maillon central des interactions biotiques dans la rhizosphère.

2.2 Les lipopeptides produits par les bactéries du sol

2.2.1 Les bactéries productrices et leur contexte écologique

Parmi les habitants de la rhizosphère, les bactéries à Gram positif du genre *Bacillus* se distinguent par leur remarquable capacité à produire une grande diversité de métabolites spécialisés dotés d'activités biologiques puissantes. Des espèces telles que *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. velezensis* sont particulièrement bien représentées dans les sols agricoles et la rhizosphère, où elles constituent des acteurs centraux du biocontrôle biologique[8,9]. Leur succès écologique repose en partie sur leur capacité à sporuler, qui leur permet de persister dans des conditions environnementales défavorables, mais surtout sur la production d'une multitude de composés bioactifs, parmi lesquels les lipopeptides cycliques (CLPs)[10].

La production de ces lipopeptides par *Bacillus* dans la rhizosphère ne se limite pas à une simple activité antibiotique. Une perspective plus récente et plus nuancée révèle que ces molécules sont de véritables médiateurs chimiques d'interactions écologiques complexes : elles participent à la communication interspécifique, à la compétition pour les ressources, à la défense contre les microorganismes compétiteurs et à l'établissement de relations mutualistes avec d'autres microorganismes et avec les plantes[9]. Ce changement de paradigme, d'une vision « arme chimique » à celle de « médiateur écologique », est fondamental pour comprendre le rôle de ces molécules dans leur contexte naturel. Il est par ailleurs établi que la production de CLPs est stimulée *in planta* et dans la rhizosphère, suggérant que les signaux moléculaires de l'environnement racinaire induisent activement leur biosynthèse[10–12].

2.2.2 Classification et structure générale des lipopeptides cycliques

On distingue chez *Bacillus* trois grandes familles de CLPs : les surfactines, les iturines et les fengycines. Ces lipopeptides appartiennent à la grande famille des peptides non ribosomaux (NRP), synthétisés par des méga-enzymes multimodulaires appelées NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetases). Ces enzymes fonctionnent selon un mécanisme de type chaîne d'assemblage : chaque module est responsable de l'incorporation d'un acide aminé spécifique dans la chaîne peptidique, grâce à trois domaines catalytiques fondamentaux : le domaine d'adénylation (A), responsable de la reconnaissance et de l'activation de l'acide aminé ; le domaine de transport (T ou PCP) ; et le domaine de condensation (C), qui catalyse la formation de la liaison peptidique[10]. Des domaines d'épimérisation (E) permettent en outre la conversion d'acides aminés L en configuration D, contribuant à la résistance de ces molécules aux protéases et donc à leur stabilité chimique dans le sol[9]. La libération et la cyclisation de la chaîne peptidique sont assurées par un domaine thioestérase (TE) terminal, qui forme le macroalactone caractéristique des surfactines et fengycines (fonction amide qui ferme le cycle) et macrolactame caractéristique des iturines (fonction ester qui ferme le cycle)[10].

La structure générale d'un lipopeptide de *Bacillus* consiste donc en un oligopeptide cyclique, partiellement ou totalement cyclisé, lié de manière covalente à, une chaîne acide gras β-hydroxylée pour les surfactines et fengycines et ß-aminée pour les iturines, de longueur variable[8]. Cette architecture amphiphile qui résulte de la coexistence d'une chaîne acide gras hydrophobe et d'un peptide cyclique globalement hydrophile est à l'origine des propriétés tensioactives et d'affinité pour les membranes biologiques de ces molécules. Chaque famille présente une structure peptidique, une longueur de chaîne lipidique et un profil d'activité biologique distincts[8,10]. La diversité structurale au sein de chaque famille est considérable, résultant de variations dans la séquence en acides aminés, la configuration L/D de ceux-ci, ainsi que la longueur et le degré de ramification de la chaîne lipidique[9]. Deux de ces familles sont étudiées dans ce travail, avec deux métabolites de la famille des surfactines : la surfactine A et la lichenysine, ainsi qu'un métabolite de la famille des fengycines.

2.2.3 La famille des surfactines

Deux des trois lipopeptides étudiés dans ce travail font partie de la famille des surfactines, la surfactine A largement connue et détaillée, ainsi que la lichenysine dont les études sont plus rares. Leurs structures, présentées en Figure 1, sont presque identiques à l'exception de deux acides aminés du cycle peptidique.

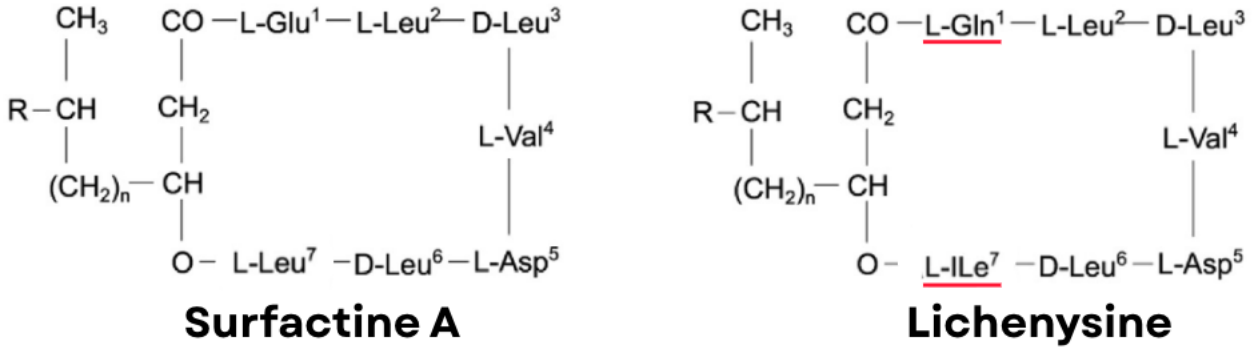


Figure 1: Structures chimiques de la surfactine A et de la lichenysine. Les différences entre les deux molécules sont indiquées en rouge. R représente un groupement alkyle variable selon l'homologue considéré. Figure adaptée de Aranda et al (2023)[13]

Parmi les surfactines, la surfactine A est le lipopeptide de *Bacillus* le plus étudié et l'un des biosurfactants les plus puissants connus à ce jour[8]. Sa structure consiste en un heptapeptide cyclique de séquence L-Glu–L-Leu–D-Leu–L-Val–L-Asp–D-Leu–L-Leu, dont le résidu glutamique N-terminal est lié par une liaison ester à un acide gras β-hydroxylé de longueur variable, principalement entre C13 et C15[10,14]. La cyclisation entre le groupement hydroxyle de la chaîne lipidique et l'acide aminé C-terminal forme la structure macrolactonique caractéristique de la surfactine. Le gène srfAB, qui encode les NRPS responsables de sa biosynthèse, contient le gène comS, impliqué dans la capacité d'incorporation d'ADN exogène (compétence génétique) et dans le quorum sensing [15–17].

D'un point de vue physico-chimique, la surfactine A est capable d'abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à moins de 27 mN/m à des concentrations inférieures à 0,05 % (m/v), avec une concentration micellaire critique (CMC) de l'ordre de 7–25 µM selon les conditions et la longueur de la chaine d'acide gras (plus elle est longue, plus elle est hydrophobe et plus la CMC est basse)[8,14,18]. Ces propriétés tensioactives découlent directement de son architecture en forme de « chaise longue » ou de « fer à cheval » : la chaîne lipidique et les acides aminés (Leu, Val) forment le domaine hydrophobe, tandis que les résidus chargés (Glu, Asp) constituent le domaine hydrophile. Cette géométrie moléculaire favorise une insertion efficace dans les bicouches lipidiques. Contrairement aux iturines et aux fengycines, la surfactine présente une activité antifongique directe relativement modérée, bien qu'elle agisse en synergie avec les autres familles de lipopeptides pour renforcer leur activité[9,10]. Elle a des effets hémolytiques, antibactériens et antiviraux, et stimule la résistance des plantes[19,14,20].

Il existe plusieurs types de surfactines, qui se différencient par l'acide aminé en position 7. La surfactine B possède une L-valine en position 7 et la surfactine C une L-isoleucine. La surfactine D contient également huit depsipeptides présentant des variations dans le nombre d'atomes de carbone de la chaîne acide gras, généralement entre 13 et 16, ainsi que des différences potentielles de méthylation[14].

Un autre variant de la surfactine est la lichenysine, un lipopeptide cyclique produit principalement par *Bacillus licheniformis*[13,21]. Sa structure consiste également en un heptapeptide cyclique lié à une chaîne lipidique β-hydroxylée de longueur C12–C17, mais diffère de la surfactine par la substitution de l'acide glutamique (Glu) en position 1 par la glutamine (Gln) (Figure 2), avec comme configuration : L-Gln-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Ile lié à un résidu d'acide gras 3-hydroxylé[20,21]. Contrairement à ce que suggéraient certaines descriptions anciennes, la lichenysine conserve une charge négative nette via son résidu acide aspartique (Asp) en position 5, la rendant moins anionique que la surfactine mais non neutre[21,24,22,25]. Ces différences, bien que subtiles, ont des conséquences fonctionnelles importantes qui lui permet notamment d'établir des interactions avec les ions calcium Ca^{2+} quatre fois plus fortes que la surfactine, affectant ainsi ses propriétés d'insertion membranaire[22]. La lichenysine est biosynthétisée par les NRPS encodées par l'opéron licA–licB–licC–licTE, dont l'organisation modulaire est très similaire à celle de l'opéron surfactine[21,26].

Sur le plan des propriétés tensioactives, la lichenysine est souvent décrite comme un biosurfactant aussi puissant que la surfactine, capable d'abaisser la tension superficielle de l'eau à environ 27 mN/m avec une CMC de 14-38µM, selon les conditions expérimentales[23,25,27,28].

Malgré ces propriétés attractives, la lichenysine reste à ce jour nettement moins étudiée que la surfactine ou la fengycine, notamment en ce qui concerne ses interactions avec les membranes

biologiques et ses activités antifongiques. Cette lacune dans la littérature rend son inclusion dans le présent travail particulièrement pertinente, afin d'établir des comparaisons avec les deux autres lipopeptides dans des systèmes membranaires modèles.

2.2.4 La famille des fengycines

Les fengycines sont des lipodécapeptides cycliques à activité antifongique marquée et relativement spécifique[8,29]. Leur structure, Figure 2, se distingue nettement de celle des surfactines par la taille de leur anneau peptidique : huit acides aminés forment un cycle lactone et deux sont en dehors : L-Glu – D-Orn – L-Tyr -D-Thr/Ser – L-Glu – D-Ala/Val – L-Pro – L-Gln – D-Tyr – L-Ile, avec 4 résidus en configuration D, conférant à la molécule une résistance aux protéases[10,30]. On distingue deux isoformes principales : la fengycine A, qui possède un résidu alanine en position 6, et la fengycine B, qui présente une valine à la même position[30]. La chaîne lipidique β-hydroxylée, de longueur C14–C18[30], est en moyenne plus longue que celle des surfactines. Il existe plusieurs variants, fengycine C, fengycine D, fengycine E, fengycine F, fengycine S, fengycine A2, fengycine B2, fengycine C2, fengycine H, fengycine X, fengycine Y, fengycine IX, plipastatine A et plipastatine B, donc les structures sont reprises dans le tableau 1 de l'article Chen et al. 2025[30].

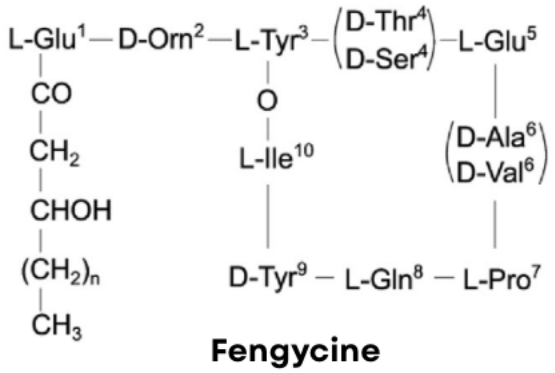


Figure 2: Structures chimiques des fengycines.. Figure adaptée de Aranda et al (2023)[13].

Au-delà de sa structure, la fengycine possède plusieurs activités biologiques décrites dans la littérature. Les activités antifongiques de la famille des fengycines sont surtout reconnues envers les champignons filamenteux phytopathogènes, notamment *Fusarium graminearum*, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus stolonifer*, *Magnaporthe grisea* et *Rhizoctonia solani* [31]. La fengycine est également capable d'inhiber la synthèse de mycotoxines produites par *F. graminearum*. Quelques études ont par ailleurs montré une activité antitumorale de la fengycine, notamment sur des lignées de cancer colorectal, où elle induit l'apoptose des cellules et bloque le cycle cellulaire, ainsi que sur le cancer du poumon humain, avec une inhibition de la prolifération confirmée in vivo sur des souris nude xénogreffées. Enfin, une activité antibactérienne a également été rapportée pour les lipopeptides de type fengycine et iturine, mais celle-ci reste limitée à quelques

phytopathogènes bactériens comme *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Pectobacterium carotovorum* et *Ralstonia solanacearum*[31].

2.3 Spécificités des membranes végétales et fongiques

Bien que l'architecture générale, en bicouche lipidique, des membranes biologiques soit conservée entre les différents règnes du vivant, leur composition lipidique présente des variations significatives, notamment en ce qui concerne la nature et la proportion des stérols. Ces différences confèrent aux membranes végétales, fongiques et animales des propriétés biophysiques distinctes, susceptibles d'influencer leurs interactions avec des molécules amphiphiles telles que les lipopeptides.

2.3.1 Membranes végétales versus membranes fongiques

Les membranes des cellules végétales se caractérisent par une grande diversité lipidique, incluant des phospholipides (PLs), des sphingolipides et des stérols[32]. Dans les PLs, on trouve la phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), la phosphatidylserine (PS) et la phosphatidylinositol (PI), qui représentent la grande majorité des PLs retrouvés dans les membranes biologiques. Ils se composent d'un squelette de glycérol reliant deux chaines d'acides gras hydrophobes à un groupement phosphate hydrophile, lequel peut également contenir de la choline, éthanolamine, sérine ou inositol[33,34]. Avec leur nature amphiphilique, les PLs jouent un rôle important dans le maintien de la structure de la membrane. Les sphingolipides sont composés d'un squelette sphingoïde à longue chaîne carbonée, généralement la sphingosine, sur lequel est attachée une chaîne d'acide gras via une liaison amide, formant ainsi la céramide[35]. Dans les plantes, les sphingolipides se répartissent en deux classes, les glucosylcéramides (GlcCer), formés par l'ajout d'un résidu glucose sur la céramide, et les glycosylinositolphosphoséramides (GIPCs), qui constituent la classe majoritaire dans les membranes végétales[36]. Les GIPCs présentent une tête polaire complexe constituée d'un groupement inositolphosphate auquel sont liées une ou plusieurs unités osidiques (hexoses, hexoamides, acide glucuronique), donnant à ces molécules une grande diversité structurale[36]. Localisés préférentiellement dans le feuillet externe de la membrane plasmique, les GIPCs jouent un rôle clé dans l'organisation des domaines membranaires et dans les interactions avec les pathogènes[36].

Les stérols les plus abondants chez les plantes sont les phytostérols tels que le ß-sitostérol, le campestérol et le stigmastérol[37–39]. Les variantes de stérols portant un groupe 3ß-hydroxyle sont appelées stérols libres (Figure 5), des modifications de ce groupes conduisent à ce que l'on appelle des stérols conjugués[39]. Les plantes contiennent généralement trois classes de stérols conjugués, les esters de stérols (ES), les glycosides de stérols (GS) et les glycosides de stérols acylés (GSA).

Comme leur nom l'indique, les GS sont des stérols qui ont été glycosylés, le plus souvent avec du glucose. À partir des GS, les GSA peuvent être produits par une acylation du résidu du sucre[40,41].

Les membranes des champignons se distinguent principalement par la présence d'ergostérol comme stérol majoritaire, au lieu des phytostérols. Mais aussi par les sphingolipides qui sont des mannosylinositolphosphates (MIPCs)[42].

2.4 Les stérols : origine, diversité et rôles membranaires

Les stérols constituent une famille de lipides triterpéniques présents dans pratiquement tous les organismes eucaryotes, où ils jouent un rôle structural et fonctionnel indispensable au sein des membranes biologiques[37,40]. Malgré leur diversité structurale remarquable, plus de 250 stérols distincts ont été identifiés dans le règne végétal seul[36], tous partagent une architecture commune : un noyau tétracyclique stérane composé de trois cycles hexagonaux (A, B, C) et d'un cycle pentagonal (D), avec un groupement hydroxyle attaché en position 3β du cycle A et une chaîne latérale variable en C17 du cycle D (Figure 3)[43]. Ces caractéristiques structurales communes confèrent aux stérols leur aptitude à s'insérer de manière spécifique et orientée dans les bicouches lipidiques, le groupement hydroxyle interagissant avec les têtes polaires des phospholipides et le noyau rigide s'ancrant profondément dans la région hydrophobe de la bicouche[40,44].

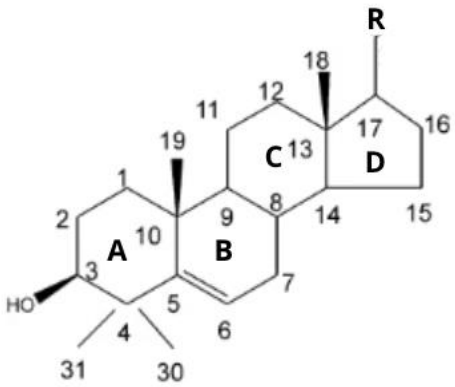


Figure 3: Structure générale du noyau stérane. Avec les trois cycles hexagonaux (A,B,C) et un cycle pentagonal (D). Chaine latérale variable(R).

La biosynthèse des stérols débute dans le réticulum endoplasmique à partir de l'acétyl-CoA, transformé en acide mévalonique par les enzymes AACT, HMGS et HMGR. La voie mévalonate conduit ensuite, via plusieurs phosphorylations et décarboxylations, au squalène, puis au 2,3-oxidosqualène grâce à la squalène époxydase (SQE). C'est à ce carrefour métabolique que les voies de biosynthèse des stérols divergent selon les organismes. Chez les animaux et les champignons, l'oxidosqualène est converti en lanostérol par la lanostérol synthétase (LAS), précurseur commun du cholestérol et de l'ergostérol respectivement. Chez les plantes en revanche, l'enzyme cycloarténol synthase (CAS) transforme l'oxidosqualène en cycloarténol, précurseur commun des phytostérols. La méthyltransférase SMT1 introduit ensuite un groupement méthyl en position C-24, initiant la voie de biosynthèse des stérols alkylés en C-24. Après une série de réactions impliquant des isomérases (CPI, 8,7 SI), une déméthylase (CYP51) et une réductase (C14-R), la voie aboutit au 24-methylenelophenol qui se divise en deux branches, soit le 24-methylenelophenol est transformé en episterol par la methyloxydase SMO2 pour aboutir au campestérol, soit transformé en 24-ethylidenelophenol par la methyltransférase SMT2 pour

aboutir au sigmastérol, les deux branches suivent une série de réactions via l'action successive de la methyl oxydase SMO2, de la C5-désaturase (C5-SD1) et la delta7-reductase (7-DR1). Le stigmastérol est ensuite dérivé du ß-sitostérol par désaturation en C-22 par l'enzyme CYP710A. Parallèlement, les plantes produisent également du cholestérol en quantités généralement faibles via une voie distincte partageant plusieurs enzymes avec la voie des phytostérols, mais impliquant des enzymes spécifiques dont SSR2[45,46] (Figure 4).

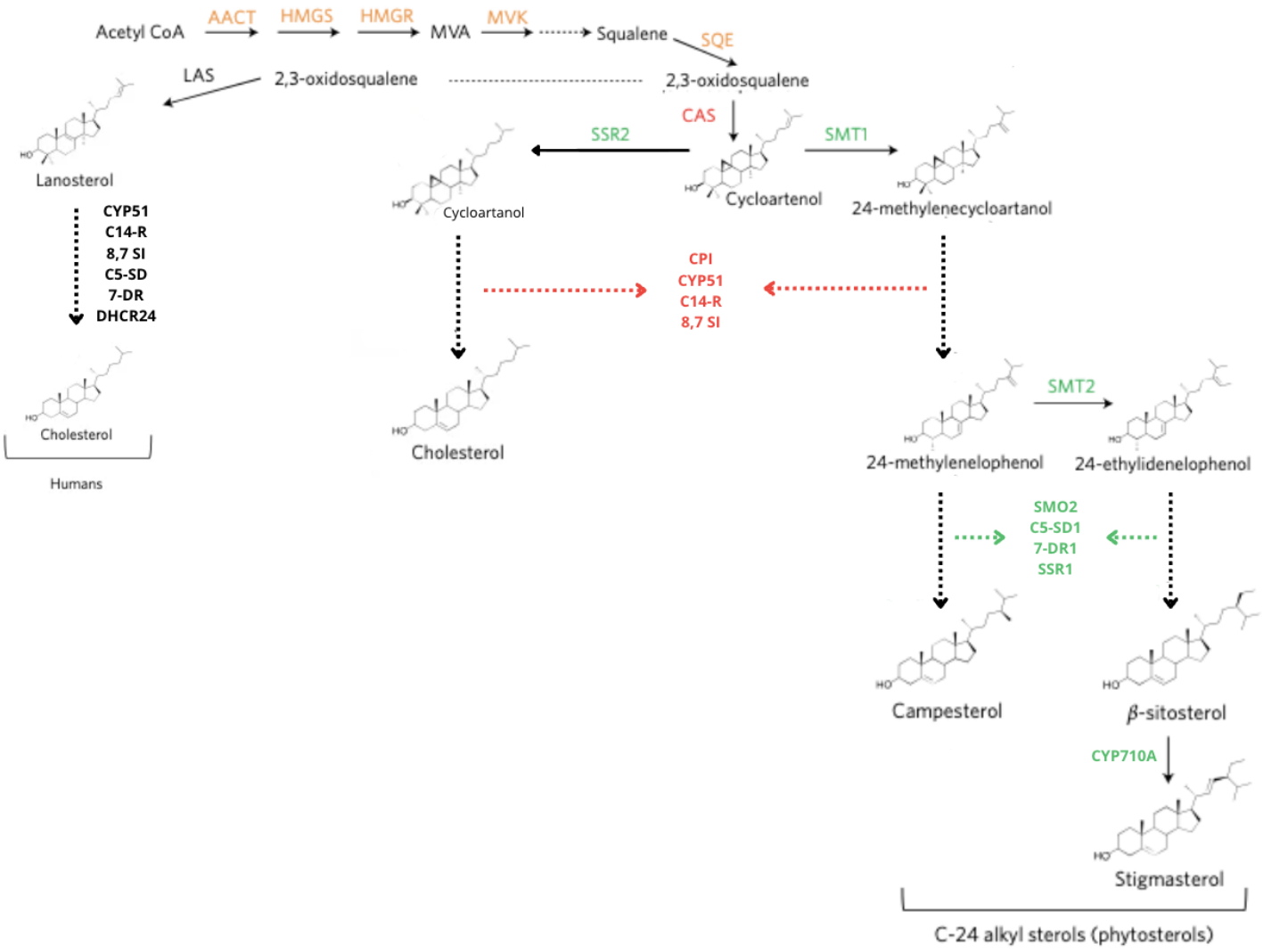


Figure 4 : Voie simplifiée de la biosynthèse des stérols chez les plantes et les animaux,tirée de Sonawane et al. (2016) [45].

Concernant la biosynthèse des stérols conjugués, ce mécanisme reste peu étudié. Au niveau des connaissances actuelles, les stérol acytransférases catalysent une réaction d'estérification permettant d'attacher un acide gras, typiquement d'une longueur de C12 à C22 (acides palmitiques, stéarique, oléiques, linoléiques ou linolénique), au groupe hydroxyle d'un stérol. Les enzymes impliqués semblent présenter une certaine spécificité pour leur substrat et se localisent principalement au niveau du RE[47,48]. Les GS sont formés, comme dit précédemment, par l'attachement d'un résidu sucre au groupe hydroxyle des stérols. Il s'agit le plus souvent du glucose, mais également de xylose, galactose et mannose, ainsi que le di-et triglucosides[49]. Ces

réactions sont réalisées par des stérols glucosyltransférases qui, malgré l'absence de domaine transmembranaire, peuvent s'associer de manière lâche à la membrane plasmique, mais souvent également retrouvées dans le cytoplasme, au niveau du RE et du tonoplaste, et représente une certaines spécificité de substrat, indiquant une régulation dynamique des GS[50]. Les stéryl glycoside acyltransférases modifient les GS en GSA par estérification de divers acides gras sur le résidu sucre[51].

2.5 Rôles des stérols dans les membranes : fluidité, phases et domaines

La fonction primordiale des stérols dans les membranes biologiques est la régulation de leur organisation physico-chimique, notamment à travers le contrôle de la fluidité membranaire et la formation de domaines latéraux[40,52]. La fluidité membranaire est une propriété dynamique qui reflète la mobilité latérale et rotationnelle des lipides au sein de la bicouche, une membrane trop fluide devient perméable aux ions et aux molécules, tandis qu'une membrane trop rigide perd sa fonctionnalité en bloquant la diffusion des protéines et les échanges moléculaires[53]. Les stérols jouent un rôle tampon : en phase gel, ils désordonnent les chaînes lipidiques trop compactées, tandis qu'en phase liquide-désordonnée (Ld), ils les condensent et les ordonnent, maintenant ainsi la membrane dans un état intermédiaire fonctionnel, la phase liquide ordonnée (Lo)[40,54].

Cette capacité à induire la phase Lo est au cœur de la formation des domaines lipidiques (lipid rafts), des microdomaines membranaires enrichis en stérols et en sphingolipides qui jouent un rôle crucial dans la compartimentation des protéines membranaires, la signalisation cellulaire et le trafic vésiculaire[52]. Chez la majorité des champignons, des domaines lipidiques contenant de l'ergostérol et des sphingolipides fongiques spécifiques ont été mis en évidence, notamment dans *Saccharomyces cerevisiae*, et sont impliqués dans la régulation de transporteurs membranaires essentiels[55,56]. La perméabilité membranaire est également directement affectée par la quantité de stérol. Des travaux combinant mesures cinétiques et simulations de dynamique moléculaire ont montré que la membrane plasmique des levures, riche en ergostérol, est au moins deux ordres de grandeur moins perméable aux petites molécules que des vésicules de phospholipides insaturés en phase liquide désordonnée (Ld), dépourvue de stérol[57].

2.6 Structure comparée des stérols étudiés et relation structure–propriétés membranaires

Les structures des différents stérols d'intérêt de ce travail sont représentées dans la figure 5.

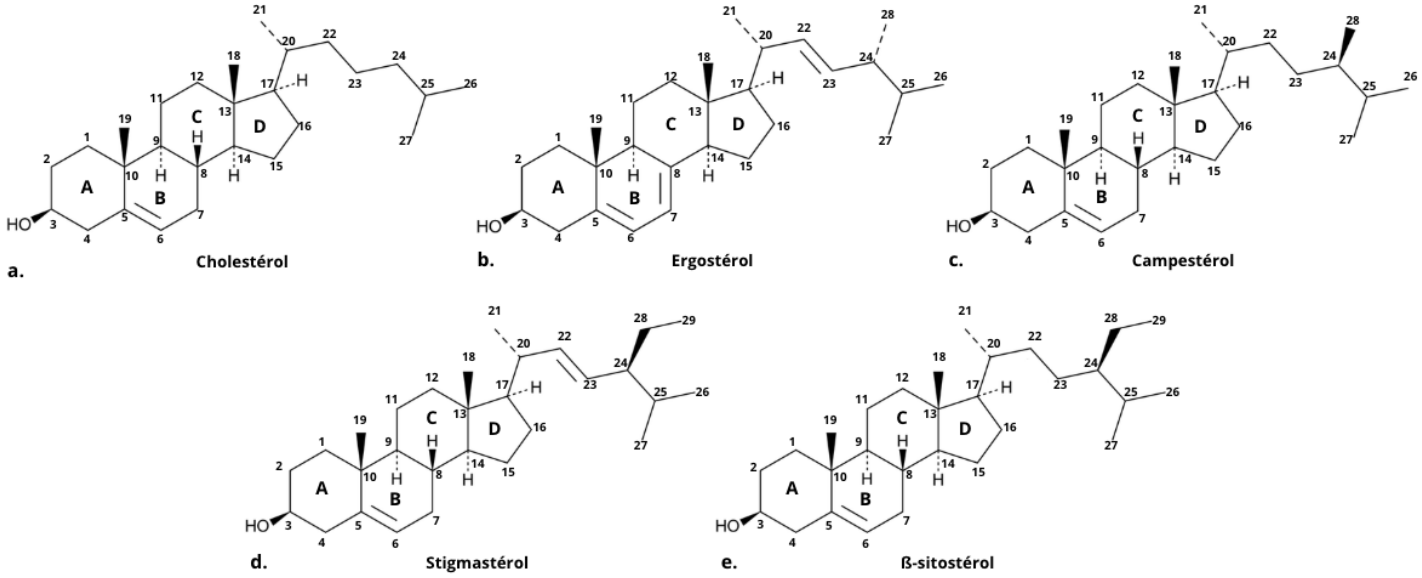


Figure 5: Structures chimiques des cinq stérols étudiés dans ce travail. Tous partagent un noyau tétracyclique stérane (cycles A–D), un groupement hydroxyle en 3β et une double liaison Δ5. Ils se distinguent par leur chaîne latérale en C17 et leur degré d'insaturation : (a) le cholestérol (C27), stérol des membranes animales ; (b) l'ergostérol (C28), stérol fongique, caractérisé par un diène Δ5,7 et une double liaison Δ22 ; (c) le campestérol (C28), phytostérol portant un méthyle en C24 ; (d) le stigmastérol (C29), phytostérol avec un éthyle en C24 et une double liaison Δ22 ; (e) le β-sitostérol (C29), phytostérol majoritaire des plantes, portant un éthyle en C24.

2.6.1 Le cholestérol, structure de référence

Le cholestérol (cholest-5-én-3β-ol) est la molécule de référence de la famille des stérols animaux[40]. Sa structure se distingue par un noyau stérane plan et rigide, une double liaison en position C5–C6 dans le cycle B, et une chaîne latérale isooctyle flexible en C17[37]. L'unique groupement hydroxyle en 3β constitue la seule tête polaire de la molécule, lui conférant un caractère très majoritairement hydrophobe. Cette architecture particulière, corps plan et rigide combiné à une chaîne flexible, permet au cholestérol d'adopter une orientation presque perpendiculaire au plan de la bicouche, où son noyau rigide réduit les isomérisations trans-gauche des chaînes acyl voisines et son hydroxyle interagit avec les groupements ester des phospholipides[54]. Le cholestérol induit ainsi la formation de la phase liquide ordonnée (Lo), une phase membranaire intermédiaire entre l'état gel et l'état liquide désordonnée (Ld), caractérisée par un ordre élevé des chaînes tout en maintenant une mobilité latérale significative des lipides[52,58].

2.6.2 L'ergostérol, stérol des champignons

L'ergostérol (ergosta-5,7,22-trién-3β-ol) se distingue du cholestérol par trois différences structurales majeures : une double liaison supplémentaire en C7–C8 dans le cycle B, une double liaison trans en C22–C23 dans la chaîne latérale, et un groupement méthyle en C24[55,59]. Bien que subtiles, ces modifications entraînent des variations significatives des propriétés membranaires de l'ergostérol. La double liaison conjuguée C5–C6/C7–C8 confère à l'ergostérol une rigidité

encore supérieure à celle du cholestérol, et sa chaîne latérale moins flexible impose un empilement plus compact avec les chaînes acyl des phospholipides voisins[60]. Des travaux combinant mesures cinétiques et simulations de dynamique moléculaire ont montré que l'ergostérol présente un effet condensant moindre que le cholestérol dans les mêmes systèmes membranaires. La rigidité élevée de la membrane plasmique des levures ne résulte pas de l'ergostérol seul, mais de son association avec des sphingolipides à longues chaînes acyles saturées, qui confère à la membrane un état hautement ordonnée, comparable à une phase gel[57].

2.6.2.1 L'ergostérol : cible privilégiée des antifongiques et problématique des résistances

La spécificité de l'ergostérol aux membranes fongiques et son rôle indispensable à la viabilité cellulaire en font une cible thérapeutique de choix pour le développement d'agents antifongiques[55,61]. Deux grandes classes d'antifongiques cliniques exploitent directement cette spécificité. L'amphotéricine B (AmB), une macrolide polyénique produite par *Streptomyces nodosus*, agit principalement par séquestration directe de l'ergostérol. En formant des complexes stœchiométriques avec ce stérol au sein de la bicouche, elle déstabilise la membrane et induit la formation de pores permettant la fuite d'ions et de molécules, conduisant à la mort cellulaire[62,63]. Sa sélectivité pour l'ergostérol par rapport au cholestérol, n'est pas absolue, ce qui explique sa toxicité rénale dans les formulations conventionnelles[63]. Les azolés, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, constituent la deuxième classe majeure d'antifongiques. Ils agissent de façon indirecte en inhibant l'enzyme lanosterol 14α-déméthylase (Erg11p), bloquant ainsi la voie de biosynthèse de l'ergostérol[61,64].

Cependant, l'utilisation prolongée et intensive de ces antifongiques a conduit à l'émergence de résistances cliniquement préoccupantes[65]. Les mécanismes de résistance aux azolés incluent des mutations dans le gène ERG11, la surexpression de pompes à efflux de type ABC, et des mutations dans ERG3. La résistance à l'amphotéricine B, plus rare, implique des altérations de la composition en stérol de la membrane via des mutations dans les gènes ERG2, ERG3, ERG6 ou ERG11, réduisant la teneur en ergostérol[63]. Ces résistances, couplées à la toxicité des formulations existantes et à l'arsenal thérapeutique limité, soulignent l'urgente nécessité de développer de nouvelles stratégies antifongiques. Les lipopeptides de *Bacillus*, en particulier la fengycine, représentent dans ce contexte des candidats prometteurs dont les mécanismes moléculaires impliquant l'ergostérol membranaire restent à préciser, ce qui constitue une des motivations du présent travail[9,29].

2.6.3 Les phytostérols : β-sitostérol, stigmastérol et campestérol

Les phytostérols constituent le groupe de stérols le plus diversifié structuralement. Tous partagent avec le cholestérol le noyau stérane de base ainsi que la double liaison C5–C6, mais se distinguent par la présence de groupements alkyle supplémentaires en position C24 de la chaîne latérale[43,66]. Ces substitutions en C24 sont le résultat de l'activité des stérols méthyltransférases (SMT), enzymes absentes chez les animaux.

Le β-sitostérol, le phytostérol le plus abondant chez les végétaux, possède un groupement éthyle en C24[66]. Son effet condensant et ordonnant sur les bicouches phospholipidiques est proche de celui du cholestérol, et supérieur à celui de l'ergostérol, comme l'ont montré différentes études biophysiques sur des bicouches et monocouches modèles (DPPC, POPC, monocouches contenant de la sphingomyéline)[67–70]. Cette similarité d'effet par rapport au cholestérol s'explique par la conformation très voisine du noyau stérane et de la chaîne latérale du β-sitostérol, le groupement éthyle additionnel en C24 ne modifiant que marginalement la profondeur d'insertion et l'orientation du stérol dans la bicouche.

Le stigmastérol est structuralement identique au β-sitostérol, à l'exception d'une double liaison supplémentaire en C22–C23 dans sa chaîne latérale, introduite par l'enzyme stérol C22-désaturase CYP710A[71]. Il a été montré que le stigmastérol seul n'augmente pas l'ordre membranaire, contrairement au β-sitostérol et au campestérol, mais peut moduler l'organisation des domaines lipidiques en interaction avec des sphingolipides végétaux[72]. Le campestérol, enfin, possède un groupement méthyle en C24, ce qui en fait le précurseur direct des brassinostéroïdes, hormones végétales essentielles à la croissance[73]. Son effet sur les membranes modèles est comparable à celui du β-sitostérol, bien que son encombrement stérique réduit lui permette une insertion légèrement différente dans la bicouche[40,67,69].
En résumé, les différences structurales entre ces cinq stérols, bien que subtiles, engendrent des propriétés membranaires distinctes qui pourraient influencer de manière spécifique leur interaction avec les lipopeptides.

2.7 Effets des lipopeptides sur les membranes plasmiques

2.7.1 Principes généraux d'interaction des lipopeptides avec les membranes

Avant d'examiner les effets spécifiques de chaque lipopeptide, il est utile de rappeler les principes physicochimiques qui gouvernent l'interaction des molécules amphiphiles avec les bicouches lipidiques. Comme toute molécule amphiphile, un lipopeptide peut adopter deux comportements

compétitifs en solution aqueuse : s'auto-assembler en micelles au-delà de sa concentration micellaire critique (CMC), ou s'insérer dans une membrane lipidique préexistante[74]. Le ratio entre ces deux tendances, quantifié par le produit K × CMC, où K est le coefficient de partage membrane/eau, détermine l'affinité intrinsèque de la molécule pour les bicouches[74,75]. Une fois insérée, la molécule amphiphile perturbe l'organisation de la bicouche selon un mécanisme dépendant de la concentration : à faible concentration, une perturbation locale et réversible ; à concentration intermédiaire, une perméabilisation membranaire (par formation de pores) ; à forte concentration, quand la CMC est dépassée, un effet détergent, par lequel la molécule extrait les lipides de la bicouche sous forme de micelles mixtes et solubilise progressivement la membrane jusqu'à sa désintégration complète[76,77].

Un aspect fondamental qui distingue les lipopeptides des détergents conventionnels est leur mode d'action sur l'ordre membranaire. Alors que les détergents classiques désordonnent systématiquement les chaînes acyl lors de leur insertion, les lipopeptides de *Bacillus*, et en particulier la surfactine et la fengycine, peuvent perméabiliser et lyser les membranes sans induire de désordre global significatif des chaînes lipidiques, suggérant des mécanismes de perturbation fondamentalement différents[76].

2.7.2 La surfactine : un agent membranotrope non sélectif à forte activité tensioactive

La surfactine est la molécule dont l'interaction avec les membranes lipidiques est la mieux caractérisée parmi les lipopeptides de *Bacillus.* Sa CMC relativement basse et son coefficient de partage membrane/eau indique une affinité substantielle pour les bicouches phospholipidiques[74]. Des études par calorimétrie de titration isotherme (ITC) ont montré que la partition de la surfactine dans les membranes POPC est un processus thermodynamiquement favorable, endothermique, et essentiellement piloté par des interactions hydrophobes[77,78]. La surfactine est capable de s'insérer dans les membranes lipidiques indépendamment de leur état de phase, et son activité dépend fortement de la longueur de la chaîne acyle des lipides cibles. Parmi les phospholipides, elle est plus miscible avec des lipides à courtes chaînes acyles et à tête polaire de type phosphatidylcholine (PC), comparativement aux lipides saturés à longues chaines ou aux lipides à tête phosphatidyléthanolamine (PE) ou phosphatidylsérine (PS)[79]. Des mesures ITC sur des liposomes biomimétiques de la MP végétale ont révélé que l'affinité de la surfactine est significativement plus élevée pour les membranes contenant des glucosylcéramides (GluCer) que pour des membranes phospholipidiques seules, avec une contribution des liaisons hydrogène spécifiques entre la surfactine et le groupement glucose des GluCer[20].

Au niveau structural, des expériences de RMN du deutérium ont révélé que la surfactine s'insère dans la bicouche, à des ratios molaires surfactine/lipide (R_b) compris entre 0,05 et 0,2, à l'interface

hydrophobe-hydrophile, en induisant une inclinaison caractéristique des chaînes acyl des phospholipides voisins[80].Ces observations, réalisées sur des vésicules de POPC pur (modèle lipidique homogène à un seul phospholipide), s'inscrivent dans un modèle de « perturbation hétérogène », dans lequel la surfactine se répartit de manière inégale dans la membrane, formant des domaines enrichis qui déstabilisent localement la bicouche sans modifier significativement l'ordre moyen de l'ensemble de la membrane. A des ratios molaires plus élevés (Rb ≈ 0,22), cette ségrégation peut aboutir à la formation de micelles mixtes, constituées de surfactine et de lipides des membranes, qui se séparent en phase aqueuse[76] (Figure 6). Une étude sur membrane membranaire hétérogène comportant des domaines latéraux a établi un modèle mécanistique en trois étapes : à des concentrations inférieures à la CMC, la surfactine s'insère préférentiellement à l'interface entre les domaines gel et fluide, inhibe la séparation de phase et rigidifie la bicouche sans changement morphologique des liposomes ; au voisinage de la CMC, elle solubilise préférentiellement la phase fluide et augmente l'ordre du reste de la bicouche ; à concentrations élevées, elle désintègre complètement la bicouche en structures micellaires[81].

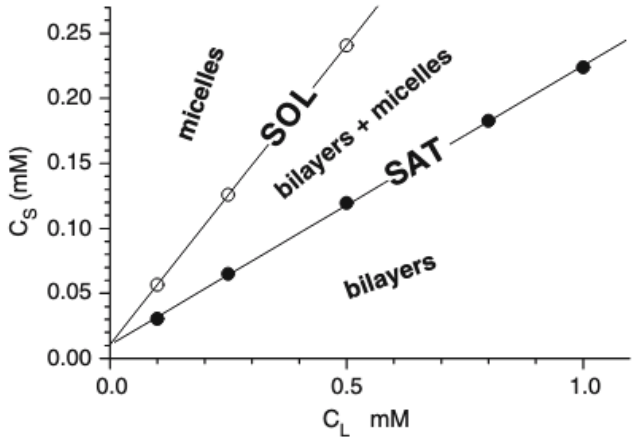


Figure 6 : Diagramme de phase de l'interaction surfactine/POPC en fonction des concentrations totales en surfactine (C_S) et en lipide (C_L) , de Heerklotz et Seelig 2007[78],

Très récemment, Gilliard *et al.* ont proposé un mécanisme moléculaire expliquant la perception de la surfactine par les cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Contrairement aux éliciteurs microbiens classiquement reconnus par des récepteurs membranaires de type PRR (Pattern Recognition Receptor), la surfactine agit directement au niveau des lipides membranaires. Les auteurs ont montré qu'à une concentration inférieure à la CMC, elle interagit préférentiellement avec certains sphingolipides végétaux, notamment les glucosylcéramides, induisant un remodelage de la membrane plasmique caractérisé par une augmentation de la rigidité et de la tension latérale membranaire. Ces modifications biophysiques conduisent ensuite à l'activation de canaux mécanosensibles et au déclenchement de réponses immunitaires précoces, incluant la production d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires, des flux calciques, une dépolarisation membranaire. Cela permet de mettre la plante en alerte et favorise sa résistance contre *Botrytis cinerea*[20].

Les interactions importantes de la surfactine avec les membranes cellulaires expliquent en partie ses activités biologiques, comme son effet hémolytique, son activité antibactérienne et antivirale. Néanmoins, la surfactine présente une activité antifongique directe faible comparée à la fengycine. Cela s'explique en partie par le fait que son interaction avec les membranes est peu sélective vis-à-vis du stérol présent[82].

2.7.3 La lichenysine : données disponibles et lacunes

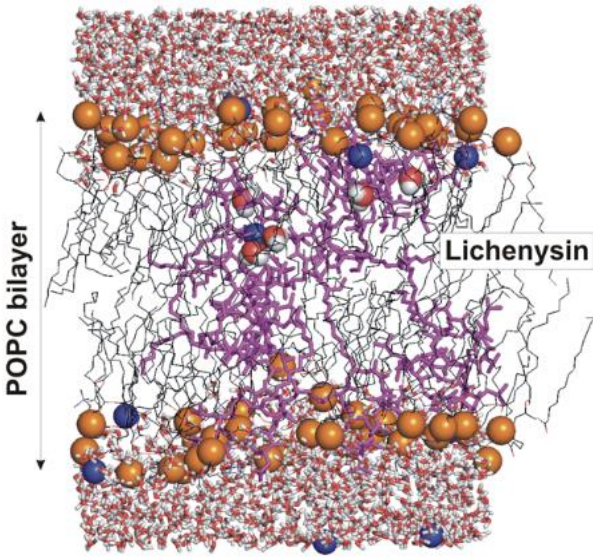


Figure 7: Simulation de dynamique moléculaire de la lichenysine insérée dans une bicouche de POPC, tirée de Coronel et al. 2015.

La lichenysine s'insère dans les bicouches de phospholipides à des concentrations bien inférieures à sa CMC, ce qui indique que ses effets membranaires sont distincts de tout mécanisme de solubilisation. Des simulations de dynamique moléculaire révèlent que la molécule se distribue de manière homogène le long de l'axe z de la bicouche, en occupant préférentiellement le cœur hydrophobe, et non la région des têtes polaires (Figure 7). Cette localisation interne est cohérente avec les profils de densité de masse atomique, qui ne montrent pas de modification significative de l'aire par lipide en présence de lichenysine. Des études biophysiques plus récentes indiquent en outre que la lichenysine déshydrate l'interface phospholipide/eau, augmente la mobilité des chaînes acyles et modifie l'épaisseur de la bicouche, perturbant l'empilement lipidique et la transition de phase des membranes de type DPPC[25,83].
L'effet fonctionnel majeur de la lichenysine est une augmentation de la perméabilité membranaire aux molécules hydrophiles, sans solubilisation ni désintégration de la bicouche, ce qui la distingue clairement des biosurfactants à effet détergent. La lichenysine tend à former des agrégats orientés selon l'axe normal à la membrane, susceptibles de constituer, à des échelles de temps plus longues (microsecondes à secondes), des structures de type pore permettant le passage de molécules plus volumineuses[25].

Dans les globules rouges, ces pores, de diamètre estimé à environ 34 Å, sont sélectifs selon la taille : ils autorisent le passage d'ions K^+ mais retiennent l'hémoglobine. Ce mécanisme de perméabilisation sélective est à l'origine d'un processus d'hémolyse colloïdo-osmotique. La lichenysine induit d'abord une fuite précoce de K^+ hors des érythrocytes, générant un déséquilibre osmotique qui conduit dans un second temps à la lyse cellulaire par gonflement. L'hémolyse suit

une cinétique sigmoïde en fonction de la concentration, avec une augmentation marquée autour de 4–5 µM, bien en dessous de la CMC, pour atteindre un maximum aux alentours de 12 µM[25].

Les données relatives à l'activité antifongique de la lichenysine seule restent à ce jour limitées. Des travaux récents sur *Venturia inaequalis*, agent de la tavelure du pommier, ont montré que la lichenysine ne présente pas d'activité antifongique significative lorsqu'elle est utilisée seule sur cette souche. En revanche, lorsqu'elle est associée à la fengycine une activité antifongique notable est observée[84], suggérant un effet synergique entre ces deux molécules. Ce phénomène de synergie pourrait s'expliquer par la complémentarité de leurs modes d'action respectifs sur la membrane fongique cible, la lichenysine potentialisant l'action de la fengycine en perturbant l'intégrité membranaire et en facilitant ainsi son insertion. Toutefois, les mécanismes précis à l'origine de cette synergie restent à élucider et nécessitent des investigations expérimentales approfondies.

Sur le plan antibactérien, la lichenysine suscite un intérêt croissant comme alternative aux antibiotiques conventionnels, et notamment dans le traitement des infections bactériennes à Gram-négatif [85].

2.7.4 La fengycine : une interaction membranaire stérol-dépendante

La fengycine présente un profil d'interaction avec les membranes fondamentalement distinct de la surfactine, et directement relié à sa spécificité antifongique. Des études ont caractérisé en détail l'interaction de la fengycine avec différents modèles membranaires par balance de Langmuir, ellipsométrie, DSC et cryo-TEM[86,87]. Ces travaux ont montré que la fengycine s'insère dans les monocouches lipidiques de manière très dépendante de la composition en lipides, et qu'elle tend à former des agrégats à la surface des membranes plutôt qu'à s'insérer individuellement comme la surfactine[86]. Cette propension à l'agrégation membranaire est considérée comme un élément clé de son mécanisme de perturbation.

La sélectivité antifongique de la fengycine repose en partie sur une interaction différentielle avec l’ergostérol et le cholestérol. Des études biophysiques ont d’abord établi que les membranes contenant de l’ergostérol sont intrinsèquement plus susceptibles à l’action de la fengycine que les membranes contenant du cholestérol à teneur équivalente, la concentration efficace requise pour induire la formation de clusters membranaires (cFE) étant significativement plus faible en présence d’ergostérol qu’en présence de cholestérol[82]. Ce contraste s’explique par la capacité du cholestérol à former des liaisons hydrogène avec la fengycine, qui inhibent la formation des clusters nécessaires à son activité lytique, tandis que l’ergostérol, structuralement moins apte à ces interactions, confère une protection moindre à la membrane.

Néanmoins, au sein même des membranes fongiques, la relation entre teneur en ergostérol et susceptibilité à la fengycine est plus complexe. Des travaux de Wise et al. (2014)[88] ont établi une corrélation inverse entre la teneur en ergostérol de la membrane et la sensibilité du champignon à la fengycine. Cette observation a été confirmée par des expériences sur bicouches à teneur variable en ergostérol, les membranes à 0% et 3% d'ergostérol sont plus sensibles à la fengycine, qui y perturbe fortement les domaines Lo et Ld, les membranes à 6% présentent une tolérance intermédiaire, celles à 12% la résistance est plus élevée. Ces résultats paradoxaux s'expliquent par un modèle cohérent, l'ergostérol rend les membranes fongiques plus sensibles à la fengycine que le cholestérol ne protège les membranes animales. Mais au sein même de ces membranes fongiques, l'ergostérol joue aussi un rôle tampon, en stabilisant les domaines Lo ciblés par la fengycine [82,89,90].

La composition lipidique de la membrane fongique, et en particulier sa teneur en ergostérol, apparaît comme un facteur déterminant dans la sensibilité des champignons à la fengycine. Des travaux menés sur *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* ont montré que *B. cinerea*, dont la teneur en ergostérol est environ deux fois plus faible que celle de *S. sclerotiorum*, s'avère significativement plus sensible aux fengycines, un faible taux d'ergostérol réduisant la capacité de la membrane à tamponner leurs effets fluidifiants[29]. Mais il n'y a pas que l'ergostérol qui joue. En effet, des simulations de dynamique moléculaire et des expériences de RMN en état solide ont confirmé que les fengycines s'insèrent plus facilement dans les modèles membranaires mimant *B. cinerea*, plus riche en PE et moins riche en PA que *S. sclerotiorum*, la charge anionique du PA exerçant un effet répulsif sur les fengycines dont la charge nette est également négative[91].

2.8 Les modèles membranaires à base de POPC

2.8.1 Pourquoi des modèles membranaires ? Justification et types de systèmes

L'étude des interactions entre molécules bioactives et membranes biologiques se heurte à la complexité des membranes cellulaires natives : composition hétérogène avec plusieurs centaines d'espèces lipidiques, présence de protéines membranaires, asymétrie des feuillets, et dynamique temporelle rapide[53]. Les modèles membranaires simplifient volontairement cette complexité en reconstituant des bicouches lipidiques, monocouches ou liposomes de composition contrôlée, permettant ainsi d'isoler et d'étudier l'effet de paramètres précis, nature du phospholipide, type de stérol, ratio stérol/phospholipide, sur les propriétés physicochimiques membranaires et sur l'interaction avec les molécules d'intérêt[92]. Cette démarche réductionniste est un préalable indispensable à la compréhension mécanistique des phénomènes qui se produisent dans les systèmes biologiques complexes.

Plusieurs types de modèles membranaires sont couramment utilisés en biophysique des membranes[92]. Les vésicules unilamellaires, petites (SUV, 20–100 nm), grandes (LUV, 100–400 nm) ou géantes (GUV, 1–100 µm), permettent d'étudier les propriétés de bicouches en suspension aqueuse. Les LUV, préparées par extrusion, sont particulièrement adaptées aux expériences de fluorescence et de calorimétrie de titration isotherme (ITC) en raison de leur taille homogène et de leur bonne stabilité colloïdale[93]. Les monocouches de Langmuir permettent de reconstituer un des deux feuillets d'une membrane à l'interface air/eau, permettant un contrôle précis de la pression de surface et l'étude de l'insertion de molécules amphiphiles[87]. Les bicouches supportées (SLB) déposées sur supports solides permettent, quant à elles, l'utilisation de techniques de surface comme la microscopie à force atomique (AFM), l'ellipsométrie ou la réflectométrie de neutrons[94].

2.8.2 Le POPC comme phospholipide modèle, structure et propriétés

Parmi les phospholipides utilisés pour préparer des modèles membranaires, le POPC (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) est probablement le phospholipide modèle le plus étudié en biophysique membranaire[95,96]. Sa structure se compose d'une tête polaire phosphocholine, d'un glycérol servant de squelette, et de deux chaînes acyl asymétriques : une chaîne saturée palmitique en position sn-1 (C16:0) et une chaîne insaturée oléique en position sn-2 (C18:1, avec une double liaison cis en Δ9)[95]. Cette asymétrie de chaînes est biologiquement représentative, les phospholipides naturels étant majoritairement composés d'une chaîne saturée et d'une chaîne insaturée[53].

La présence d'une double liaison cis dans la chaîne oléyle génère une courbure moléculaire qui empêche l'empilement compact des chaînes et confère au POPC une température de transition de phase gel/liquide-cristallin (Tm) de −2 à −5 °C [96]. À température ambiante (25 °C), le POPC est donc naturellement dans la phase liquid-disordered (Ld), avec une aire par molécule d'environ 63–68 Å et une épaisseur de la zone hydrophobe d'environ 27 Å [95]. La tête phosphocholine du POPC lui confère une charge nette nulle à pH physiologique, et la phosphocholine est la tête polaire la plus abondante dans les membranes plasmiques eucaryotes, notamment dans le feuillet externe, ce qui renforce la pertinence biologique du POPC comme lipide modèle[53].

2.9 Modèles POPC/stérol, état des connaissances

2.9.1 POPC/cholestérol

Le système POPC/cholestérol est de loin le plus étudié des systèmes phospholipide/stérol. Des études par RMN du deutérium ²H, par diffraction de neutrons et de rayons X, et par calorimétrie différentielle (DSC) ont montré que le cholestérol augmente de façon progressive et linéaire l'ordre

des chaînes acyl du POPC lorsqu'il est ajouté jusqu'à 40 % molaire[97]. Le cholestérol induit également une augmentation significative de l'épaisseur de la bicouche POPC, une réduction de l'aire par molécule et un abaissement de la perméabilité membranaire[95]. Ces effets sont la signature de l'induction progressive d'une phase liquid-ordered[98].

2.9.2 POPC/ergostérol

Le système POPC/ergostérol présente un comportement distinct de celui du POPC/cholestérol, [59]. Des études par RMN ²H ont montré que l'ergostérol augmente l'ordre des chaînes palmitoyles lorsqu'il est ajouté jusqu'à une concentration d'environ 20–25 % molaire. Au-delà de cette concentration, le paramètre d'ordre sature et n'augmente plus[99]. Ce comportement de saturation est en contraste net avec l'absence de saturation observée pour le cholestérol, et a été attribué aux différences structurales entre les deux stérols, notamment la rigidité élevée de la chaîne latérale et les doubles liaisons conjuguées de l'ergostérol[100]. Des expériences d'aspiration par micropipette sur GUV ont par ailleurs confirmé que l'ergostérol augmente les propriétés mécaniques des membranes POPC, avec une efficacité inférieure à celle du cholestérol[98]. Des mesures sur monocouches de Langmuir avec des PC saturés (DPPC, DMPC) ont également montré que le cholestérol condense davantage les monocouches que l'ergostérol[101], bien que cette comparaison puisse différer dans le contexte des bicouches POPC insaturées.

2.9.3 POPC/phytostérols

Les systèmes POPC/phytostérols sont nettement moins caractérisés que POPC/cholestérol ou POPC/ergostérol, et constituent donc un terrain encore partiellement inexploré. Des études utilisant la SAXS, la dilatométrie et les ultrasons ont comparé l'effet du cholestérol, du β-sitostérol et du stigmastérol sur des bicouches POPC[67]. Ces travaux ont montré que le cholestérol est le plus efficace pour augmenter l'épaisseur de la bicouche et augmenter la rigidité, suivi du β-sitostérol puis du stigmastérol, une hiérarchie attribuée aux groupements éthyle en C24 et à la double liaison C22–C23 du stigmastérol qui réduisent l'efficacité de l'empilement avec les chaînes lipidiques. Des expériences de spectroscopie ²H NMR ont confirmé que le cholestérol, le β-sitostérol, le stigmastérol, le campestérol et l'ergostérol augmentent tous l'ordre des chaînes palmitoyles du POPC de manière concentration-dépendante, mais présentent des concentrations de saturation différentes selon leur structure[69]. En particulier, le β-sitostérol et le stigmastérol présentent une saturation du paramètre d'ordre similaire à l'ergostérol, tandis que le campestérol se comporte davantage comme le cholestérol[69].

2.10 Conclusion générale de l'état de l'art

Plusieurs études ont déjà examiné l'interaction de lipopeptides de *Bacillus* avec des membranes POPC, souvent en présence de stérols. Les travaux de Heerklotz & Seelig (2001)[74] ont caractérisé en détail la partition et la lyse de vésicules POPC par la surfactine par ITC et fluorescence. Des études d'insertion dans des monocouches POPC ont permis de déterminer les pressions critiques d'insertion de la fengycine et de la surfactine, et de comparer leur affinité pour des monocouches de compositions lipidiques variées[86,87]. Des expériences sur des bicouches POPC enrichies en ergostérol ont révélé la redistribution des domaines membranaires induite par la fengycine en fonction de la teneur en stérol[102]. L'effet de la surfactine et de la fengycine sur la perméabilité de vésicules POPC en présence de cholestérol ou d'ergostérol a également été comparé[82,89]. Des modèles biomimétiques plus complexes, reproduisant les profils lipidomiques de champignons pathogènes, ont été utilisés pour la fengycine.[91,103].

La lichenysine illustre quant à elle un comportement biphasique du cholestérol particulièrement instructif. A forte proportion (rapport molaire POPC/cholestérol 1:1), le cholestérol augmente l'ordre des chaînes acyles et le serrage lipidique, entravant l'insertion du lipopeptide et réduisant la fuite membranaire. A plus faible proportion (2:1), l'effet est inversé et la perméabilisation est accrue. Ce comportement biphasique est pertinent pour comprendre la sélectivité de la lichenysine vis-à-vis des cellules eucaryotes, riches en cholestérol, par rapport aux bactéries qui en sont dépourvues. À l'inverse, l'incorporation de DPPC, en phase gel à 25 °C, augmente considérablement la fuite de carboxyfluorescéine (CF), probablement en générant des défauts aux interfaces entre domaines lipidiques de fluidité différente[83].

Cependant, plusieurs lacunes importantes subsistent dans la littérature. Les phytostérols (β-sitostérol, stigmastérol, campestérol) sont peu utilisés comme composants de modèles membranaires dans les études d'interaction avec des lipopeptides. Aucune étude comparative systématique des cinq stérols (cholestérol, ergostérol, β-sitostérol, stigmastérol, campestérol) dans un même système POPC/stérol n'a encore été publiée pour les lipopeptides étudiés ici. Enfin, l'interaction de la lichenysine avec des membranes contenant différents stérols n'a jamais été étudiée. C'est précisément à ces lacunes que le présent travail entend répondre.

3 Objectif

L'ensemble des travaux présentés met en évidence la complexité des interactions qui s'établissent au sein de la rhizosphère, où microorganismes et plantes échangent en permanence des molécules bioactives. Parmi celles-ci, les lipopeptides produits par les bactéries du genre *Bacillus*, tels que la surfactine, la fengycine et la lichenysine, apparaissent comme des acteurs majeurs dont l'importance écologique est aujourd'hui bien établie, bien que leurs mécanismes d'action à l'échelle moléculaire restent encore partiellement élucidés.

Les données disponibles convergent vers un point central, la membrane plasmique constitue la cible principale de ces molécules amphiphiles. Toutefois, ces interactions ne peuvent être comprises indépendamment de la composition lipidique des membranes. En particulier, la nature des stérols (cholestérol, ergostérol ou phytostérols), joue un rôle déterminant dans la modulation des propriétés biophysiques membranaires, notamment l'ordre lipidique, la formation de domaines latéraux et la perméabilité.

Les différences structurales entre ces stérols pourraient se traduire par des comportements membranaires distincts, susceptibles d'influencer directement l'insertion et l'activité des lipopeptides. Si plusieurs études ont établi un lien entre la spécificité antifongique de la fengycine et la présence d'ergostérol, les bases physicochimiques précises de cette sélectivité demeurent encore mal comprises. Par ailleurs, le rôle des phytostérols dans ces interactions reste peu exploré, malgré leur abondance. De même, les interactions membranaires de la lichenysine n'ont, à ce jour, fait l'objet que de très peu d'études.

Ces lacunes soulignent la nécessité d'approches expérimentales permettant d'isoler et de comparer de manière systématique l'influence des différents stérols sur les interactions lipopeptides–membranes. Dans cette perspective, l'utilisation de modèles membranaires simplifiés à base de POPC enrichis en stérols constitue une stratégie particulièrement adaptée.

Le présent travail vise ainsi à étudier de manière comparative l'influence de cinq stérols, cholestérol, ergostérol, β-sitostérol, stigmastérol et campestérol, sur les propriétés biophysiques de membranes modèles et sur leurs interactions avec trois lipopeptides représentatifs. Pour ce faire, des expériences de balance à film de Langmuir en mode compression et adsorption ont été réalisées, permettant de caractériser les propriétés élastiques et l'organisation des monocouches lipidiques ainsi que la capacité des lipopeptides à s'y insérer et leur cinétique d'adsorption. Des mesures calorimétriques par calorimétrie de titration isotherme (ITC) ont permis de quantifier les paramètres thermodynamiques de ces interactions. Enfin, des analyses de la fluidité membranaire par fluorescence du Laurdan dans des liposomes ont été conduites sur microplaque (TECAN),

renseignant sur la fluidité/rigidité des bicouches en présence des différents stérols et lipopeptides. L'objectif est de déterminer dans quelle mesure la nature du stérol constitue un facteur clé dans la modulation de ces interactions, et d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de la sélectivité d'action des lipopeptides.

4 Matériel et méthode

4.1 Réactifs

-Le cholestérol (99+%, CAS: 57-88-5, ref: C8667-1G, lot: 050K5304, Sigma)

-L'ergostérol (98%, CAS: 57-87-4, ref: 117810050, lot: A0436500, Thermo-Scientific)

-Le campestérol (99%, CAS: 474-62-4, ref:41695, lot: 0716520-18, Cayman Chemical)

-Le stigmastérol (99%, CAS: 83-48-7, ref:700062P, lot: 223362, Avanti Polar Lipids)

-Le ß-sitostérol (99+%, CAS: 85-46-5, ref: 7001P, lot:C-010, Avanti Polar Lipids)

-Le 24-méthyl cholesterol (99%, ref: 17344, lot: 0681676-8, Cayman Chemical)

-Le 24α-éthyl cholestérol (>95%, CAS: 83-46-5, ref :37386, lot :0698226-19, Cayman Chemical)

-Le POPC (CAS :26853-31-6, lot :5679CPO218, Avanti Polar Lipids)

-La surfactine (production par l'équipe de Philippe Jacques, lot :P-05-01-02)

-La fengycine (production par l'équipe de Philippe Jacques, lot :57)

-La lichenysine (production par l'équipe de Philippe Jacques)

4.2 Solvants

-L'éthanol (CAS: 64-17-5, VWR®)

-Le chloroforme (CAS : 67-66-3, Biosolve)

-Le 2-propanol (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 (CASNo :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<padj/value<0,01 : différence hautement significative (**)

-p-adj/value<0,001 : différence très hautement significative (***)

4.4 Balance à film de Langmuir en compression : Propriétés d'organisation interfaciale des stérols à l'interface air-eau.

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 cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol, 24-methyl cholestérol, β-sitostérol, 24α-ethyl cholestérol ont été préparées dans un mélange chloroforme:méthanol 2:1 molaire.

4.4.3 Protocole

La cuve utilisée possède une largeur de 75 mm et une aire de 24225 mm^2 . Celle-ci est remplie avec un volume de ≈230 ml de tampon. Après dépôt d'un volume respectivement de 40 µL de solutions de stérol, 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 $Å^2$ 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 membranaires étudiés, l'aire au take-off (A_0) est définie comme l'aire moléculaire pour laquelle la pression de surface augmente de 1,5 mN/m par rapport à sa valeur initiale ; elle marque le début de l'insertion du peptide dans la monocouche. L'aire d'effondrement (Ac) correspond à l'aire moléculaire mesurée au point où survient la pression d'effondrement (πc), c'est-à-dire la pression de surface maximale atteinte avant la rupture du film et la perte de son organisation en monocouche.

L'élasticité du film a été évaluée par le calcul du module de compression (Cs^{-1}), déterminé à partir de la pente locale de l'isotherme π-A selon l'équation (1):

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

Les comparaisons statistiques sont réalisées à l'aide d'une ANOVA à un facteur. L'homogénéité des variances est vérifiée au moyen du test de Levene. En raison de la faible taille des échantillons (n < 10), la normalité des résidus n'a pas été testée formellement mais a été supposée.

4.5 Balance à film de Langmuir en adsorption : Évaluation de l'insertion de la surfactine et la fengycine dans une monocouche de stérol.

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 1 mM ont été préparées dans un mélange chloroforme/méthanol 2 :1 molaire avec du cholestérol, ergostérol, stigmastérol, campestérol, ß-sitostérol, 24-méthyl

cholestérol et 24α-éthyl cholestérol. Des solutions de surfactine et fengycine , chacunes à 4 mM a également été préparée dans du DMSO.

4.5.3 Protocole

80 millilitres de tampon sont déposés au sein de la cuve de Langmuir. La solution contenant le stérol est ensuite déposée à la surface jusqu'à atteindre la pression de surface souhaitée (5,10,15,20 ou 25 mN/m). Après stabilisation, 40 µL de solution de lipopeptide sont injectés dans la sous-phase. Les courbes de la pression de surface en fonction du temps sont ensuite enregistrées via le logiciel KSV minitrough jusqu'à ce qu'une stabilisation de la pression de surface soit observée. Ces expériences sont réalisées à 20°C afin d'avoir des phases avec des liquides ordonnés et désordonnés et d'éviter la phase gel.

4.5.4 Analyse de données

La pression d'insertion maximale (MIP, *Maximum Insertion Pressure*) a été déterminée pour chaque stérol en traçant Δπ (représentant la différence entre la pression de surface initiale et la pression de surface finale) en fonction de π_i (pression de surface initiale), pour une série de monocouches formées à différentes pressions initiales. Une régression linéaire a été appliquée à ces points, et la MIP correspond à la pression initiale théorique pour laquelle la droite de régression extrapole à Δπ = 0.

La droite de régression obtenue en reportant Δπ en fonction de π_i permet également d'extrapoler une seconde valeur caractéristique, le $\Delta\pi_0$, correspondant à la valeur de Δπ extrapolée à πi = 0. Cette valeur représente la pression de surface théorique ($\Delta\pi_0$) que le lipopeptide serait capable de générer en l'absence de toute monocouche préformée à l'interface. Cette valeur théorique a été comparée à la pression de surface réellement mesurée lorsque le lipopeptide seul est injecté dans la sous-phase, en l'absence de film lipidique à l'interface (π_e). L'écart entre ces deux valeurs a été quantifié par le calcul de $d\pi_0$ (2).

$$d\pi_0 = \Delta\pi_0 - \pi_e \qquad (2)$$

Les comparaisons statistiques sont réalisées à l'aide d'une ANOVA à un facteur. L'homogénéité des variances est vérifiée au moyen du test de Levene. En raison de la faible taille des échantillons ($n < 10$), la normalité des résidus n'a pas été testée formellement mais a été supposée.

4.6 Analyse thermodynamique par calorimétrie de titration isotherme

4.6.1 Préparation des solutions

Des solutions contenant les lipides à une concentration de 2 mM ont été préparées pour les conditions suivantes : POPC seul, POPC/cholestérol, POPC/ergostérol, POPC/campestérol, POPC/stigmatérol et POPC/ß-sitostérol dans des proportions molaires de 100/0 pour POPC seul et 70/30 pour les stérols.

Les lipides ont été solubilisés dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) afin d'assurer une solubilisation homogène. Pour chaque condition expérimentale, solution lipidique à 2mM a été transférée dans un ballon distinct.

Des solutions de biosurfactants à une concentration de 20 µM ont également été préparées dans le tampon contenant 0,1 % (v/v) de DMSO. Les biosurfactants étudiés étaient la surfactine, la fengycine et la lichenysine.

4.6.2 Formation des films lipidiques

Les solutions lipidiques ont ensuite été soumises à une évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (R-3000, BUCHI), afin d'éliminer le mélange chloroforme/méthanol, hautement volatil. Cette étape permet la formation d'un film lipidique homogène déposé sur les parois internes du ballon.

À l'issue de l'évaporation, les ballons ont été placés dans un dessiccateur sous vide et maintenus pendant une nuit.

4.6.3 Formation des liposomes

Les films lipidiques ont été réhydratés par l'ajout de tampon, à 2mM. Afin de faciliter le décollement complet du film lipidique des parois, les ballons ont été placés dans un bain-marie à 50 °C pendant 5 minutes, une température supérieure à la température de transition de phase des lipides étudiés. Les suspensions ont ensuite été vigoureusement vortexées. Ce cycle chauffage–vortex a été répété au minimum trois fois, et prolongé jusqu'à dissolution complète du film lipidique lorsque nécessaire.

La suspension lipidique obtenue a ensuite été soumise à des cycles de congélation–décongélation afin d'homogénéiser la population de liposomes. La phase de congélation a été réalisée par immersion dans de l'azote liquide, tandis que la phase de décongélation a été effectuée dans un bain-marie à 50 °C, à l'aide de cryotubes. Ce cycle a été répété cinq fois.

Les liposomes ont ensuite été extrudés à travers une membrane en polycarbonate de 100 nm de diamètre de pores (Nycleopore TrackEtch Membrane filtration products, ref : 800309) et un préfiltre (PE drain disc,Ref :230300,Cytavia Whatman TM) grâce au système d'extrusion avec support (ref : 610000-1Ea, Avanti polar lipids). Préalablement, 15 passages de tampon ont été effectués afin d'équilibrer le système, suivis de 25 passages de la suspension lipidique, permettant l'obtention de liposomes unilamellaires de taille homogène (100nm).

La taille hydrodynamique et la distribution des liposomes formés ont été analysées par diffusion dynamique de la lumière (DLS), afin de vérifier la qualité et l'homogénéité des vésicules obtenues.

4.6.4 Protocole

Les expériences de calorimétrie de titration isotherme ont été réalisées à 15°C à l'aide d'un microcalorimètre, Malvern Microcal peaq-itc automated. La cellule de mesure (V_{cell} = 0,28 mL) contenait le lipopeptide à une concentration initiale C_0D = 20 µM. La seringue contenait les liposomes à une concentration de 2 mM. Les titrations ont été réalisées par injections successives de 3,9 µL, en mode continu. Une expérience contrôle (injection des liposomes dans le tampon seul) a été réalisée dans les mêmes conditions afin de mesurer la chaleur de dilution des liposomes. Cette chaleur de dilution a été soustraite des données expérimentales afin d'isoler la chaleur associée à la partition du lipopeptide dans la membrane.
Les pics de chaleur ont été intégrés manuellement à l'aide du logiciel intégré à l'appareil, afin de corriger les artefacts d'intégration automatique.

4.6.5 Analyse des données

L' analyse thermodynamique a été réalisée selon le modèle de partition membranaire décrit par Heerklotz et Seelig[104]. Dans ce modèle, la chaleur cumulée mesurée après i injections de lipide est donnée par l'équation (3) :

$$\sum_{k=1}^{i} \delta \mathrm{h}_k = \Delta \mathrm{H}^{\mathrm{w}\to\mathrm{b}} \times \mathrm{V}_{cell} \times \mathrm{C}_0^D \cdot \frac{K \times C_L^0}{1 + K \times C_L^0} \qquad (3)$$

où : $\sum \delta\, h_k$est la chaleur cumulée (µcal), $\Delta H^{w\to b}$est l'enthalpie molaire de transfert du lipopeptide de la phase aqueuse vers la membrane (kcal/mol), est le volume de la cellule de mesure (0,28 mL), C_D^0est la concentration initiale du lipopeptide dans la cellule (20 µM), C_L^0est la concentration totale en lipide dans la cellule après *i* injections (mM), Kest le coefficient de partition mole-ratio (M^{-1}).
Cette équation (4) est de la forme :

$$y = \frac{a \times b \times x}{1 + b \times x} \qquad (4)$$

avec $a = \Delta H^{w\to b} \cdot V_{cell} \cdot C_D^0$ et $b = K$.

La chaleur cumulée (Y, en µcal) a été tracée en fonction de la concentration cumulée en lipide dans la cellule (X = C_0^L, en mM) et ajustée par régression non linéaire à l'aide du logiciel GraphPad Prism, en utilisant les paramètres *a* et *b* comme variables libres.

L'enthalpie de partition a été extraite selon (5):

$$\Delta H^{w \to b} = \frac{a}{V_{cell} \times C_D^0} \qquad (5)$$

L'énergie libre standard de partition a été calculée selon l'équation (6), en utilisant le coefficient de partition en fraction molaire :

$$\Delta G = -RT \ln(55{,}5 \times K) \qquad (6)$$

où *R* = 1,987 cal/mol/K, *T* est la température en Kelvin, et 55,5 M est la concentration molaire de l'eau.

L'entropie de partition a été déduite de la relation thermodynamique fondamentale (7):

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \qquad (7)$$

Aucun test statistique n'a été réalisé pour les expériences d'ITC, celles-ci ayant été menées à titre exploratoire et sur un seul réplicat par condition.

4.7 Étude de la fluidité membranaire en fonction de sa composition en lipides.

4.7.1 Préparation des liposomes

Les liposomes de POPC et POPC/stérol (70/30, rapport molaire) ont été préparés selon la même méthode de préparation que pour les analyses ITC, à l'exception de la concentration, ici la concentration est de 1mM.

Par ailleurs, une solution de Laurdan (CAS :74515-25-6, ref :40227, lot :#BCCB5249, Sigma-Aldrich) a été préparée à une concentration comprise entre 1 et 3 mM dans de l'éthanol, puis incubée pendant 3 heures à 50 °C.

Des solutions de biosurfactants à une concentration de 10 et 20 µM ont également été préparées dans le tampon contenant 1 % (v/v) de DMSO. Les biosurfactants étudiés étaient la surfactine, la fengycine et la lichenysine.

4.7.2 Protocole

Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques Tecan Spark®. Pour chaque condition expérimentale, trois réplicats ont été analysés, ainsi que les contrôles correspondants.

Les conditions suivantes ont été étudiées :

- liposomes avec le Laurdan et sans biosurfactant (contrôle, addition de 0,1 % de DMSO/éthanol),
- liposomes avec le Laurdan et la surfactine,
- liposomes avec le Laurdan et la fengycine,
- liposomes avec le Laurdan et la lichenysine.
- liposomes sans le Laurdan et sans biosurfactant (contrôle, addition de 0,1 % de DMSO/éthanol),
- liposomes sans le Laurdan et avec la surfactine,
- liposomes sans le Laurdan et avec fengycine,
- liposomes sans le Laurdan et avec lichenysine.

Ce plan expérimental a été appliqué à tous les liposomes.

Après incubation pendant 1h, 90 µL de suspension de liposomes ont été distribués dans les puits de la microplaque. Une mesure de fluorescence préalable à été réalisée afin de fixer le gain au alentour de 20 000 unités, puis conservé identique pour l'ensemble des mesures réalisées avec un même lot de liposomes.

L'ajout des biosurfactants a été effectué juste avant le début de la mesure, par l'ajout de 10 µL de solution de biosurfactant dans chaque puits. Pour les contrôles, 10 µL de solution contenant 1 % de DMSO/éthanol ont été ajoutés (pour avoir 0,1% de DMSO dans le puit).

La fluorescence du Laurdan a été mesurée toutes les 150 secondes, après une agitation de 5 secondes, aux longueurs d'onde d'émission de 430±10nm et 485±10nm (filtre) . Chaque puits a ainsi fait l'objet de cinq mesures successives entre la dixième et vingtième minutes, permettant l'obtention de données cinétiques exploitables pour le calcul du paramètre de polarisation généralisée (GP).

4.7.3 Analyse des données

Pour chaque condition testée, la GP a été calculée à partir des intensités de fluorescence mesurées à 430±10nm (filtre pour 440nm) et 485±10nm (filtre pour 480nm), après ajout du lipopeptide et entre 10 et 20 minutes de mesure, selon l'équation (8):

$$GP = \frac{(I_{440} - I_{480})}{(I_{440} + I_{480})} \qquad (8)$$

ensuite comparée à une condition contrôle sans traitement, l'effet du traitement a été exprimé sous la forme d'un ΔGP (9) :

$$\Delta GP = GP_{condition} - GP_{contrôle} \qquad (9)$$

L'homogénéité des variances n'étant pas vérifiée pour toutes les conditions, dû au manque de réplicat pour la lichenysine, les comparaisons statistiques avec le contrôle sont réalisées avec le test de Welch.

5 Résultats et discussions

5.1 Propriétés d'organisation interfaciale des stérols à l'interface air-eau.

La balance à film de Langmuir permet d'étudier le comportement de molécules amphiphiles déposées à l'interface air-eau sous forme de monocouche, appelées films. Le mode utilisé ici est celui de la compression. Le principe repose sur la compression progressive de la monocouche à l'aide de barrières mobiles (Figure 8), tout en mesurant la pression de surface (π en mN/m) en fonction de l'aire moléculaire (A en $Å^2$), donnant lieu à une isotherme π-A caractéristique de chaque molécule. Ces isothermes renseignent sur plusieurs propriétés fondamentales des molécules à l'interface. L'aire moléculaire au take-off (A_0), représente l'encombrement stérique de la molécule en phase expansé, l'aire d'effondrement (A_c) représente l'encombrement stérique de la molécule en phase condensée, la pression d'effondrement ($π_c$), qui indique la pression maximale que le film peut supporter avant réorganisation en bicouche ou micelles, et le module de compressibilité (Cs^{-1}) qui permet de caractériser l'état de phase du film, liquide expansé, liquide condensé ou solide et d'évaluer la rigidité de la monocouche. Dans le cas des stérols, cette technique est utilisée pour sonder l'influence des variations structurales de la chaîne latérale en C17 et des substitutions méthyle ou éthyle sur la capacité de compaction du film. Elle permet de relier directement la structure de la molécule à leurs propriétés d'organisation interfaciale, information déterminante pour comprendre leur rôle de modulation des propriétés mécaniques dans des membranes.

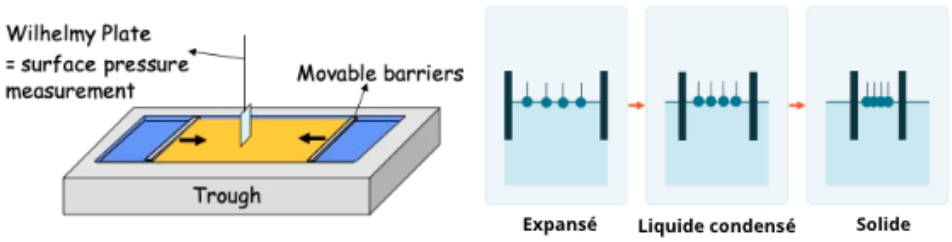


Figure 8: ***Principe de la balance à film de Langmuir en mode compression.*** (Gauche) *Représentation schématique de la cuve de Langmuir : les barrières mobiles compriment le film lipidique déposé à l'interface air-eau tandis que la lame de Wilhelmy mesure en continu la pression de surface (π).* (Droite) *Transitions de phase du film au cours de la compression, de l'état expansé vers les états liquide condensé et solide.*

Au niveau des résultats, les isothermes de compression π-A permettent d'emblée d'identifier deux comportements à l'interface distincts parmis les stérols étudiés (Figure 9). Dans cette figure une seule isotherme de compression par stérol est présentée. Cependant 3 réplicats pour chaque stérol ont été réalisés, les isothermes pour tous les réplicats de chaque stérol sont disponible en annexe 1-7. Ainsi que les profils de compression complet de chaque stérol en annexe 8.

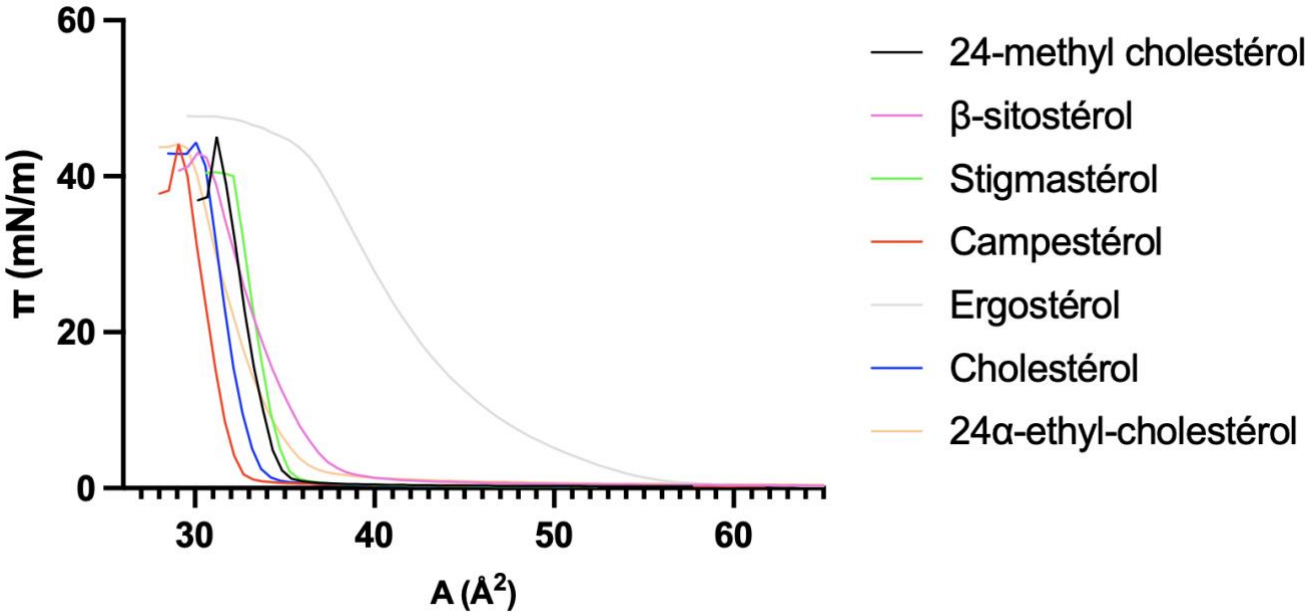


Figure 9: Isothermes de compression π-A de monocouches de différents stérols.

L'ergostérol se distingue nettement des six autres stérols testés par une courbe large et progressive, dépourvue de transition abrupte caractéristique d'un film condensé (Figure 9). Ce comportement reflète directement sa structure encombrée, la présence conjuguée d'un diène Δ5,7 dans le cycle B, d'une double liaison trans Δ22 dans la chaîne latérale et d'un groupement méthyle en C24 génère une rigidité moléculaire élevée qui complique l'empilement des molécules à l'interface (Figure 5). Les six autres stérols présentent des isothermes nettement plus abruptes, caractéristiques d'une organisation condensée.

A partir de ces graphiques, les paramètres A_0, A_c, Π_c, Cs^{-1} peuvent être calculés et sont présentés en figure 10.

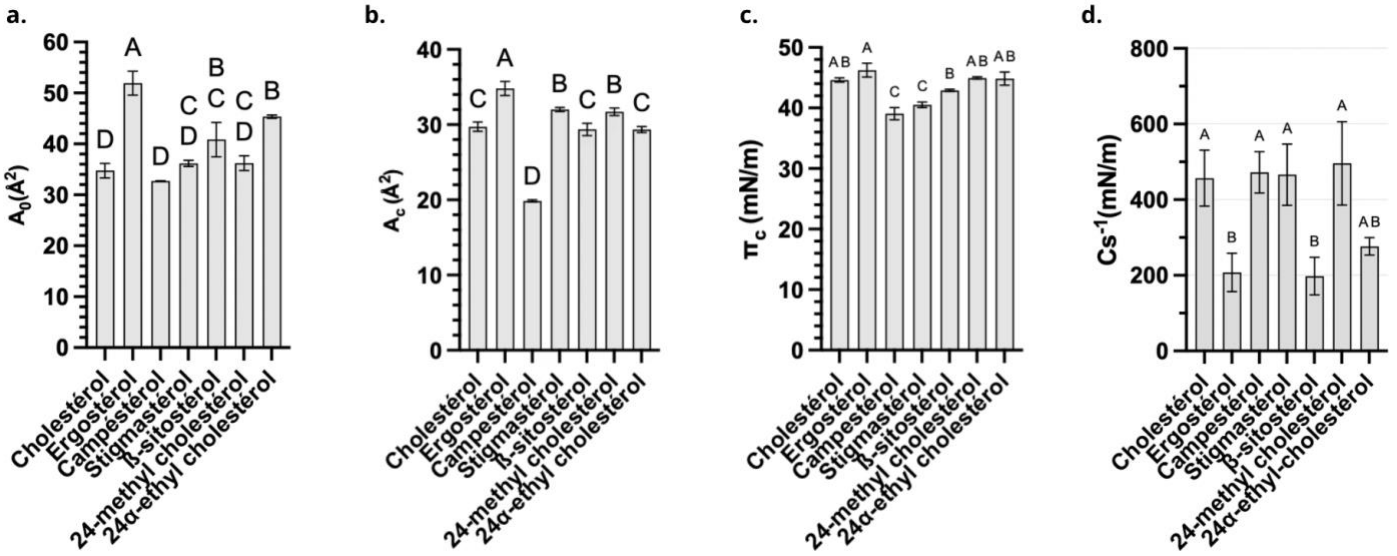


*Figure 10: **Paramètres caractéristiques des isothermes de compression π-A des monocouches de stérols. (a)** Aire moléculaire au take-off (A_0, Å²), **(b)** Aire moléculaire à l'effondrement (Ac, Å²), **(c)** pression d'effondrement (πc, mN/m) et **(d)** module de compressibilité (Cs^{-1}, mN/m) calculé à 25 mN/m, pour les sept stérols étudiés : cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol, β-sitostérol, 24-méthyl cholestérol et 24α-éthyl cholestérol. Pour l'analyse statistiques, les colonnes présentant les mêmes lettres signifient que celles-ci ne sont pas différentes.*

L'ergostérol résulte en une A_0 et une A_c supérieures à celles de tous les autres stérols et une π_c plus basse, traduisant une incapacité à maintenir une monocouche stable sous compression (Figure 10b, c). Cette singularité avait été documentée sur des monocouches de DPPC et de DMPC[101] et s'observe ici sur monocouche, confirmant que ce comportement est intrinsèque à la structure de l'ergostérol et non seulement de la nature du phospholipide environnant.

Les six autres stérols se distinguent par leur aire moléculaire de take-off (A_0) et leur pression d'effondrement. Parmi eux, le cholestérol, le campestérol, le stigmastérol, le β-sitostérol et le 24-méthyl cholestérol présentent des isothermes d'allure générale comparable, mais seul le campestérol diffère par son A_0, cohérent avec leurs structures moléculaires. L'absence de la double liaison Δ7,8 rend le campestérol moins rigide et permet un empilement plus compact, tandis que le stigmastérol, doté d'un groupement éthyle en C24 et d'une double liaison Δ22-23, présente une des plus grandes A_c parmi ce groupe, presque égale à celle du 24-méthyl cholestérol (Figure 10b), reflétant un encombrement stérique plus important de leur chaîne latérale. Le 24-méthyl cholestérol, structurellement très proche du campestérol, présente pourtant une isotherme divergente, suggérant des différences conformationnelles qui modifient l'empilement moléculaire au sein du film. Cette hiérarchie rejoint les observations de Shaghaghi et al.[69] sur des bicouches POPC et de Bernsdorff & Winter[67] sur des monocouches DPPC, confirmant une tendance indépendante du contexte lipidique.

Malgré ces différences dans les isothermes, les pressions d'effondrement ne présentent aucune différence significative entre campestérol et stigmastérol, et pas de différence entre cholestérol et 24-méthyl cholestérol (Figure 10c, d).Les modules de compressibilité à 25 mN/m ne sont pas significativement différent entre ces 4 stérols. Si la géométrie d'empilement à l'interface varie d'un stérol à l'autre, la rigidité mécanique du film une fois condensé est donc comparable, tous atteignent un état condensé de rigidité similaire sous compression. L'ergostérol fait une fois de plus exception, son isotherme atypique ne lui permet pas d'atteindre ce même degré de condensation, ce qui pourrait expliquer en partie les propriétés mécaniques distinctes des membranes fongiques, naturellement riches en ce stérol.

La comparaison entre le β-sitostérol et le 24α-éthyl cholestérol est particulièrement instructive sur le plan stéréochimique. Ces deux molécules ne diffèrent que par la stéréochimie du groupement hydroxyle en C3 et la configuration du groupement éthyle en C24 (alpha pour le 24-éthyl cholestérol et béta pour le sitostérol), et pourtant leurs isothermes divergent. Le film de β-sitostérol se condense à une aire moléculaire plus élevée mais présente une Ac égale à celle du 24α-éthyl cholestérol, suggérant un encombrement interfacial plus important. Leurs π_c et modules

de compressibilité restent néanmoins comparables (Figure 10b, c), indiquant que cette différence stéréochimique influence davantage la géométrie d'empilement que la rigidité finale du film. Cela illustre un principe général qui ressort de l'ensemble des données de compression, des différences structurales parfois très subtiles peuvent modifier la géométrie d'empilement à l'interface sans pour autant altérer la rigidité mécanique du film condensé. Une nuance importante pour interpréter les expériences d'insertion des lipopeptides qui suivent.

5.2 Adsorption des lipopeptides dans des monocouches lipidiques contenant différents stérols

La balance à film en mode adsorption permet d'étudier la capacité d'une molécule amphiphile dispersée dans une phase aqueuse à s'insérer dans une monocouche lipidique préformée à l'interface air-eau[105] (Figure 11). Le principe repose sur la formation préalable d'un film monomoléculaire de stérol comprimé à une pression de surface initiale (π_i) donnée. Une fois le film stabilisé, le lipopeptide est injecté dans la sous-phase aqueuse. Si la molécule est capable de s'intercaler entre les molécules du film, elle induit une augmentation de la pression de surface ($\Delta\pi = \pi_{finale} - \pi_i$), mesurée jusqu'à stabilisation. Un $\Delta\pi$ nul indique que la molécule n'est pas capable de s'adsorber au niveau du film lipidique.

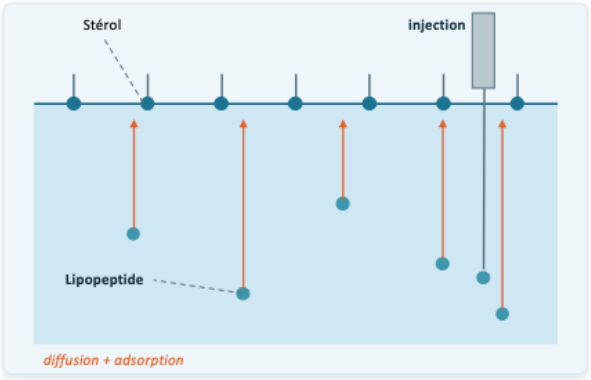


Figure 11: Balance à film en adsorption, schéma d'insertion de lipopeptides dans une monocouche de stérol.

Cette technique fournit deux types d'informations complémentaires. D'une part, en répétant l'expérience à différentes pressions initiales π_0 et en traçant $\Delta\pi$ en fonction de π_0, on obtient une relation linéaire dont l'extrapolation à $\Delta\pi = 0$ donne la pression maximale d'insertion (ou *maximal insertion pressure*, MIP. Cette pression correspond à la pression de surface maximale au-delà de laquelle le lipopeptide ne peut plus pénétrer dans le film (Figure 12). Lorsque la MIP est supérieure à ~30–35 mN/m, valeur communément admise comme équivalente à la pression latérale d'une bicouche membranaire[105], cela indique que le lipopeptide est susceptible d'interagir avec des membranes biologiques *in vivo*. Un autre paramètre important est la valeur théorique de $\Delta\pi$ extrapolée à une pression initiale nulle (Figure 12). En soustrayant à cette valeur théorique la

valeur de Δπ obtenue expérimentalement pour l'adsorption du lipopeptide à une interface vierge, on obtient une information sur l'attractivité des lipides, c'est à dire leur pouvoir de favoriser ou non, ou même de repousser les lipopeptides. En faisant varier la nature du stérol constituant le film, il est ainsi possible de sonder l'influence du stérol composant la monocouche sur la capacité d'insertion de la surfactine et de la fengycine.

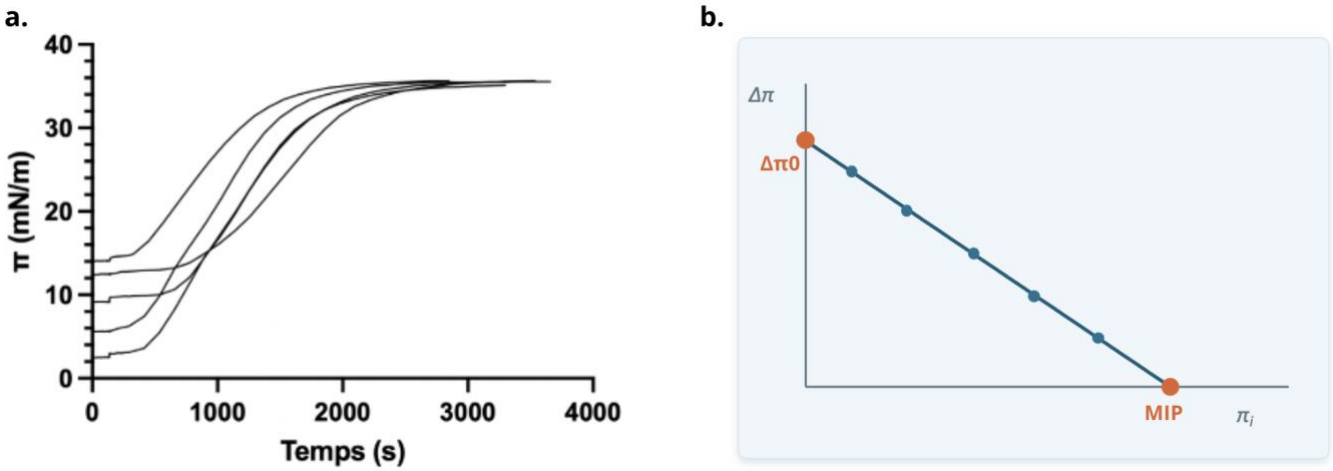


Figure 12: Balance à film en adsorption. (a)Exemple de cinétique d'adsorption de la surfactine dans une monocouche de β-sitostérol. (b) Droite de régression réalisées avec 5 cinétiques à différentes pressions de surface initiale, deltaπ en fonction de πi.

L'analyse des paramètres d'adsorption des lipopeptides, surfactine et fengycine, dans un film monocouche des stérols, cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol et ß-sitostérol, sont présentés en figure 13. Les 5 cinétiques par stérol ayant pu amener à la réalisation du graphique de régression sont en annexes 9-28.

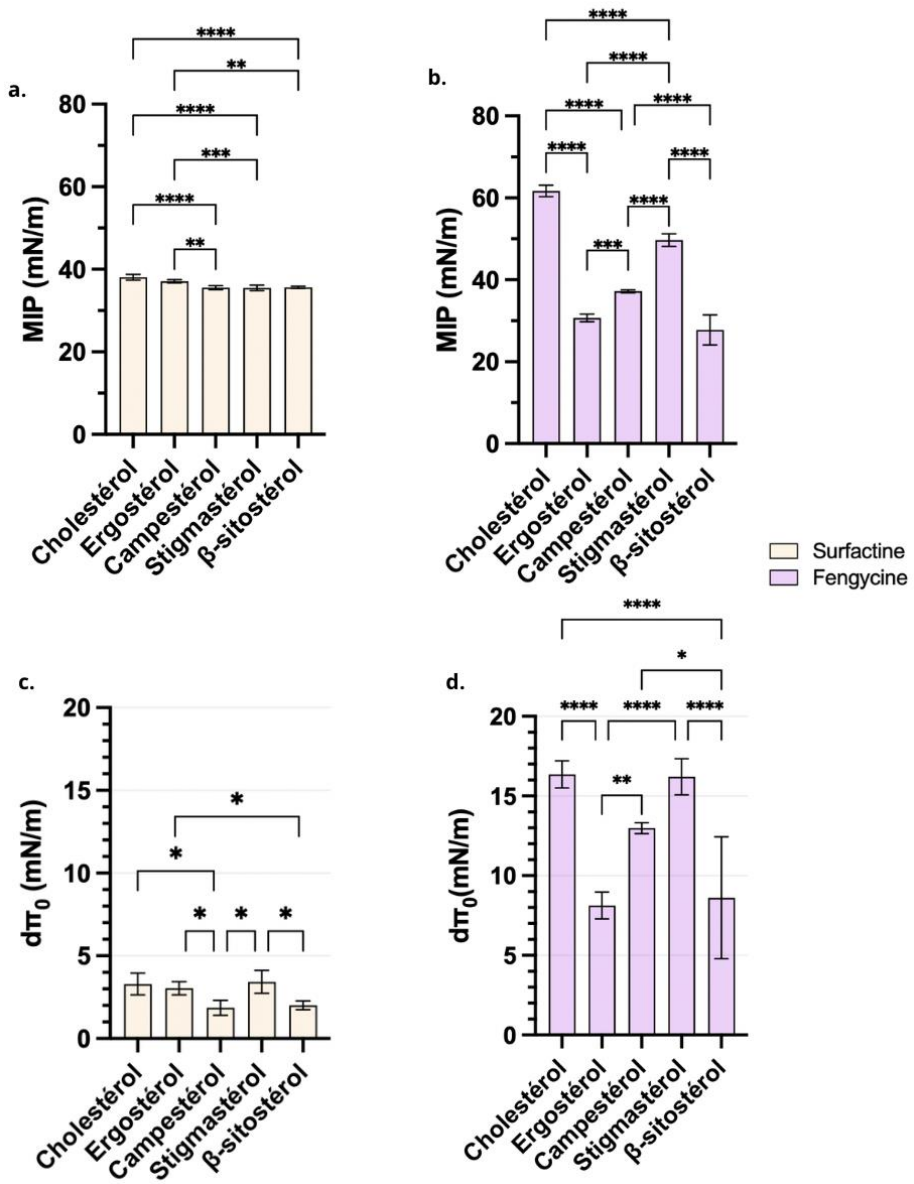


Figure 13: ***Paramètres d'insertion de la surfactine et de la fengycine dans des monocouches de stérols déterminés par balance à film en mode adsorption.*** *Pression maximale d'insertion (MIP, mN/m) de* ***(a)*** *la surfactine et* ***(b)*** *la fengycine dans des monocouches de cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol et β-sitostérol. Ordonnée à l'origine ($d\pi_0$, mN/m) de la droite $\Delta\pi = f(\pi_0)$ pour* ***(c)*** *la surfactine et* ***(d)*** *la fengycine.*

La surfactine présente des MIP similaires pour tous les stérols, avec des valeurs de $d\pi_0$ faibles et peu variables (2–4 mN/m) (Figure 13a, c), indiquant que son affinité pour l'interface est constante même si l'analyse statistique révèle des différences d'adsorption de la surfactine selon les stérols. Ce profil non discriminant confirme ce que la littérature décrit depuis longtemps, la surfactine est un agent membranotrope peu sélectif, capable de s'insérer dans des membranes de composition très diverse[74,75]. Son affinité pour l'interface est principalement pilotée par ses interactions hydrophobes avec les chaînes acyl des lipides, comme l'ont établi Heerklotz & Seelig[76–78] en système POPC, et ne semble pas modulée par la nature du stérol constituant le film. Cette non-sélectivité est cohérente avec son activité biologique large, antibactérienne, antivirale et hémolytique, mais explique également pourquoi son activité antifongique reste constante

comparée à celle de la fengycine, ne possédant pas de cible préférentielle en termes de stérol dans les cellules fongiques[82].

Le comportement de la fengycine est très différent. Son MIP avec le cholestérol est le plus élevé de toutes les conditions testées, largement supérieur à celui de la surfactine dans les mêmes conditions (Figure 13b), et sa $d\pi_0$ avec ce stérol atteint également les valeurs les plus hautes observées, indiquant que cette attractivité s'exprime dès les faibles pressions de surface, indépendamment de la résistance stérique du film (Figure 13c). Ce résultat peut sembler paradoxal au premier abord, puisque la littérature établit que les membranes contenant de l'ergostérol sont plus susceptibles à l'action lytique de la fengycine que celles contenant du cholestérol[82]. Il faut ici distinguer deux niveaux d'interaction, une forte affinité d'insertion dans une monocouche de stérol, telle que mesurée par la MIP, et la capacité à déstabiliser une bicouche phospholipidique. Fiedler et Heerklotz[82] ont montré que le cholestérol forme des liaisons hydrogène spécifiques avec la fengycine qui, paradoxalement, inhibent la formation des clusters membranaires nécessaires à son activité lytique. Ainsi, la forte affinité de la fengycine pour le cholestérol en monocouche ne se traduit pas par une perturbation plus efficace des bicouches POPC/cholestérol, précisément parce que ces interactions immobilisent la molécule sans qu'elle puisse exercer sa fonction déstabilisatrice. Ces deux observations sont donc complémentaires plutôt que contradictoires. Le stigmastérol et le campestérol montrent également une attractivité supérieure pour la fengycine par rapport à la surfactine, suggérant une sensibilité générale de la fengycine à la géométrie du stérol et aux liaisons hydrogène qu'elle peut établir.

À l'opposé, le β-sitostérol est le stérol pour lequel la fengycine affiche la MIP et la $d\pi_0$ les plus basses, indiquant une capacité d'insertion réduite dans cette monocouche (Figure 13d). La comparaison avec le stigmastérol est particulièrement instructive, bien que ces deux phytostérols partagent un groupement éthyle en C24, leurs $d\pi_0$ pour la fengycine divergent significativement, tandis que celles de la surfactine restent similaires. La seule différence structurale entre eux est la double liaison trans Δ22 du stigmastérol[71], en bloquant la rotation à ce niveau et imposant une conformation plus linéaire et étendue à la chaîne latérale réduise l'encombrement stérique latéral et crée un environnement interfacial plus favorable à l'ancrage de la fengycine, une molécule volumineuse qui forme des agrégats à la surface membranaire plutôt que de s'insérer individuellement[86]. La chaîne latérale saturée du β-sitostérol, plus flexible et latéralement encombrante, semble au contraire restreindre sélectivement l'accès de la fengycine au film. Cette distinction fine entre deux phytostérols très proches, qui n'avait à notre connaissance jamais été documentée pour des lipopeptides, illustre la sensibilité de la fengycine à la géométrie moléculaire de son environnement en stérol.

Ces résultats pointent vers deux stratégies membranaires fondamentalement différentes pour les deux lipopeptides. La surfactine agit comme un agent d'insertion peu discriminant, dont l'affinité pour l'interface est homogène quelle que soit la composition en stérol. La fengycine est au contraire sensible à la géométrie moléculaire du stérol environnant, avec une préférence marquée pour le cholestérol. Cette distinction s'explique par leur architecture moléculaire respective, la surfactine, composée majoritairement de résidus leucine et valine, présente une large surface hydrophobe homogène qui lui permet de s'intercaler entre les molécules lipidiques indépendamment du stérol. La fengycine, de plus grande taille, possède des résidus à caractère polaire (L-Tyr^{3}, L-Tyr^{9}, L-Gln^{8}, L-Glu^{1}, D-Orn^{2}, L-Glu^{5}) aux côtés de résidus hydrophobes. À faible concentration (2.10^{-7}M), la fengycine s'insère sous forme monomérique dans la bicouche sans perturber l'organisation interfaciale des phospholipides. Sa chaîne polaire s'oriente parallèlement aux chaînes acyle des lipides environnants, s'intégrant ainsi dans le cœur hydrophobe sans en déstabiliser la structure. C'est cette complémentarité de forme et de distribution amphiphile entre la fengycine et la surface du stérol qui expliquerait sa sensibilité à la géométrie de la chaîne latérale en C-17, et notamment la distinction entre le cholestérol, le stigmastérol et le β-sitostérol observée dans les données d'adsorption.

5.3 Interaction thermodynamique des lipopeptides avec des bicouches lipidiques

La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC, Isothermal Titration Calorimetry) est une technique thermoanalytique qui mesure les flux de chaleur associés à une interaction moléculaire, sans nécessiter de marquage ou de modification des molécules étudiées. Le principe repose sur l'injection successive et contrôlée d'une suspension de liposome dans une cellule contenant le lipopeptide en solution. À chaque injection, la chaleur libérée ou absorbée lors de la partition du lipopeptide dans la membrane lipidique est mesurée et compensée par le calorimètre, produisant un thermogramme dont l'intégration des pics donne la chaleur associée à chaque étape de la titration.

Contrairement aux modèles de liaison classiques, l'interaction d'un lipopeptide avec une membrane lipidique est décrite par un modèle de partition membranaire, selon la formulation de Heerklotz et Seelig[104].

L'ajustement du thermogramme au modèle de partition fournit trois grandeurs thermodynamiques complémentaires. L'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) quantifie la spontanéité de l'interaction, une valeur négative signifie que la partition est thermodynamiquement favorable, indépendamment des contributions relatives de l'enthalpie et de l'entropie. Elle est directement reliée à la constante de partition K par la relation $\Delta G = -RT \ln(K)$. L'enthalpie de partition (ΔH) correspond à la chaleur échangée lors de l'insertion du lipopeptide dans la membrane, une valeur négative (exothermique) traduit la formation nette de liaisons favorables, tandis qu'une valeur

positive (endothermique) indique que le processus est globalement défavorable sur le plan enthalpique et doit donc être compensé par d'autres contributions. Une interaction enthalpiquement favorable traduit davantage la contribution de liaisons non-covalentes, liaisons hydrogène, interactions électrostatiques ou de van der Waals, entre le lipopeptide et les têtes polaires ou la région interfaciale du film lipidique[18,104]. Enfin, l'entropie (ΔS), dérivée des deux grandeurs précédentes, rend compte des changements de désordre moléculaire accompagnant l'interaction, une contribution entropique positive et dominante, associée à un ΔH positif, où la libération de molécules d'eau structurées autour des chaînes apolaires constitue la force motrice principale de l'insertion membranaire.

La figure 14, illustre un exemple de thermogramme de l'effet de la surfactine, la fengycine et la lichenysine sur des liposomes POPC/cholestérol. Les thermogrammes des autres systèmes étudiés sont en annexes .

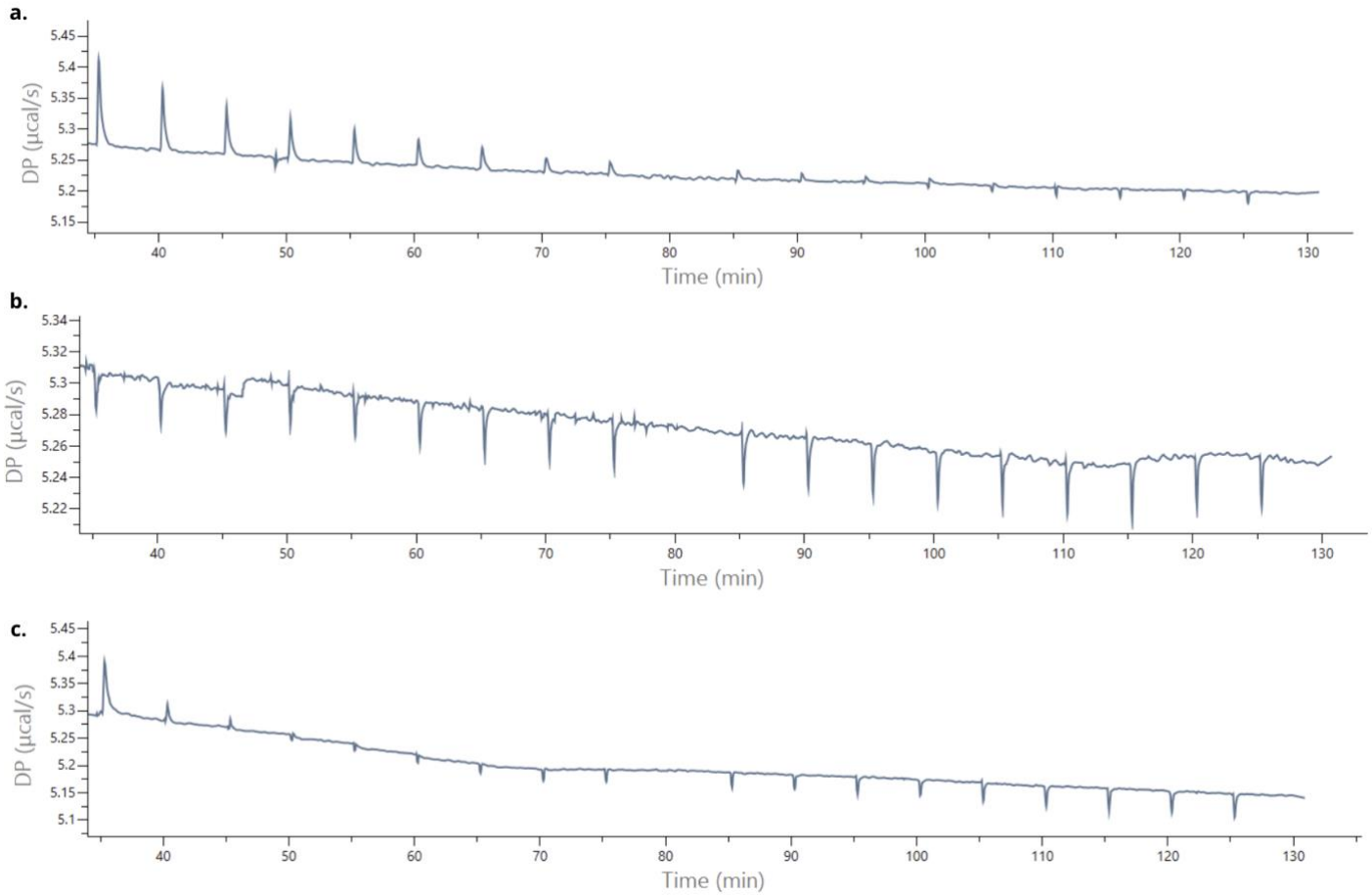


Figure 14: ***Thermogrammes ITC de l'interaction de lipopeptides avec des liposomes de POPC/cholestérol.*** *Données brutes (puissance différentielle en fonction du temps) obtenues par calorimétrie de titration isotherme (ITC) lors de l'injection de* ***(a)*** *surfactine,* ***(b)*** *fengycine et* ***(c)*** *lichenysine dans des vésicules de POPC/cholestérol. Chaque pic correspond à une injection du peptide dans la cellule contenant les liposomes.*

La comparaison des paramètres obtenus pour les liposomes de POPC pur et de POPC/stérol (70/30) permet d'évaluer l'influence de la composition membranaire en stérol sur l'affinité et la thermodynamique de l'insertion des lipopeptides (Figure 29 et 33).

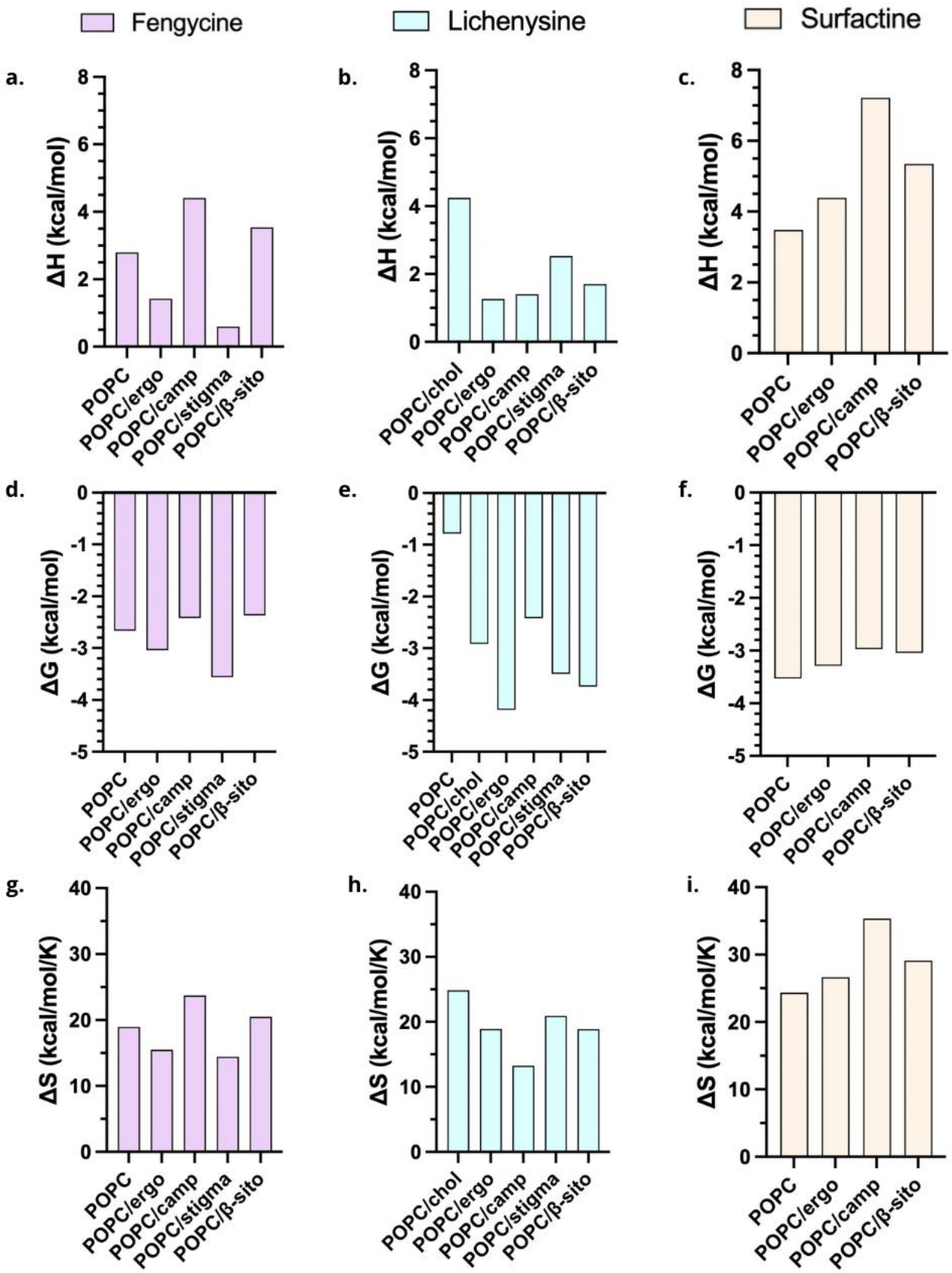


Figure 15: ***Paramètres thermodynamiques de partition des lipopeptides dans des liposomes POPC/stérol déterminés par ITC.*** *Enthalpie (ΔH, a–c), énergie libre de Gibbs (ΔG, d–f) et entropie (ΔS, g–i) de partition de la fengycine (a, d, g), de la lichenysine (b, e, h) et de la surfactine (c, f, i) en présence de liposomes POPC purs ou supplémentés en cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol ou β-sitostérol (ratio molaire POPC/stérol 70:30).*

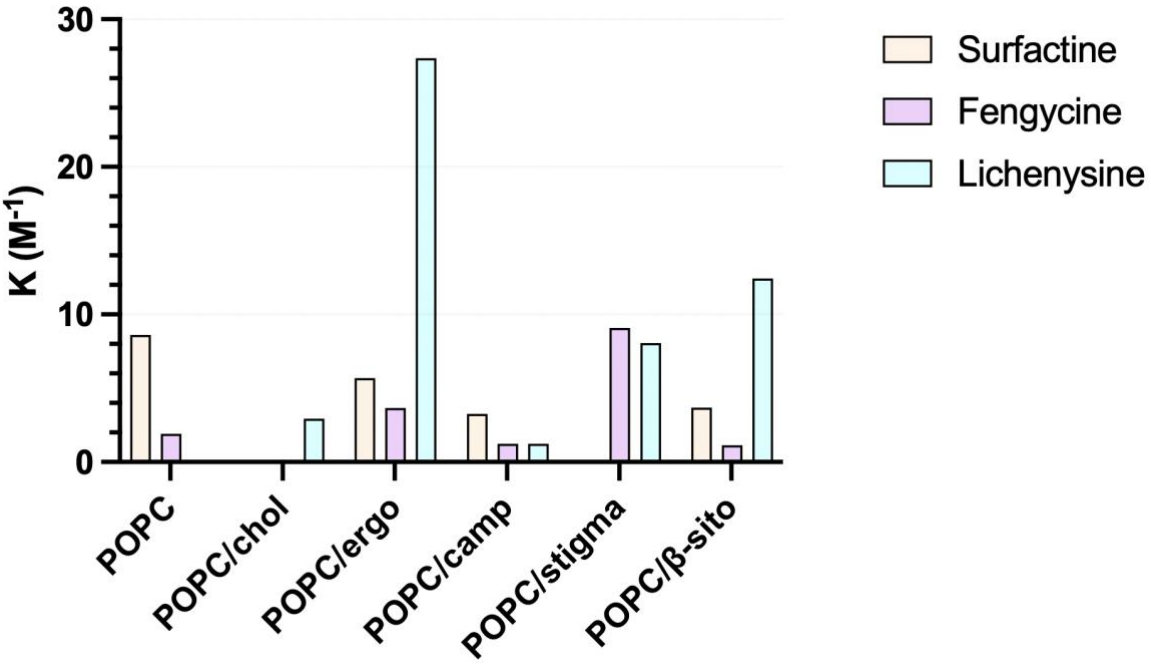


Figure 16: Constantes d'affinités (K), pour chacun des systèmes.

L'analyse par ITC de la partition des trois lipopeptides, fengycine, lichenysine et surfactine, dans des liposomes de POPC pur et de POPC/stérol (70/30) révèle un profil thermodynamique commun et cohérent (Figure 15). Pour l'ensemble des conditions testées, les valeurs de ΔG sont négatives, confirmant que la partition de ces lipopeptides dans la bicouche lipidique est un processus thermodynamiquement spontané, quelle que soit la composition membranaire. Ce résultat est en accord avec la capacité de ces lipopeptides à s'insérer dans les membranes biologiques et à y exercer une activité perturbatrice[104].

Les valeurs de ΔH sont positives pour les trois lipopeptides et l'ensemble des compositions membranaires testées, indiquant que la partition est un processus endothermique. Les valeurs de ΔS sont largement positives, comprises entre environ 13 et 35 kcal/mol/K selon le lipopeptide et la composition membranaire. Cette combinaison, ΔH > 0 et ΔS > 0, est la signature thermodynamique caractéristique de l'effet hydrophobe. Elle reflète la désolvation des chaînes acyles et des régions hydrophobes des lipopeptides lors de leur insertion dans le cœur apolaire de la bicouche, accompagnée de la libération de molécules d'eau structurées autour des groupements hydrophobes, ce qui constitue le moteur entropique dominant de l'interaction. Ce comportement est cohérent avec les données rapportées pour la partition de détergents non-ioniques dans des membranes de POPC, pour lesquels des enthalpies de partition positives et de grandes entropies favorables ont également été observées[104]. Il est également conforme aux études sur la surfactine, pour laquelle l'insertion membranaire a été décrite comme essentiellement entropiquement favorable, résultant de l'ancrage de sa chaîne β-hydroxyle dans la bicouche.

Si les trois lipopeptides partagent le même profil qualitatif, des différences quantitatives significatives sont observées (Figure 15). La surfactine présente les valeurs de ΔS les plus élevées (environ 24–35 kcal/mol/K, panneau i), ainsi que des ΔG parmi les plus négatifs et les plus homogènes selon la composition membranaire (panneau f, environ −3 à −3,5 kcal/mol). Cela suggère que la surfactine développe une forte affinité pour les membranes lipidiques de manière relativement indépendante de la nature du stérol présent (Figure 16), ce qui est en accord avec son spectre d'activité large et son caractère d'agent tensioactif capable de perturber des membranes de compositions variées. En effet, parmi les coefficients d'affinité ayant pu être calculés POPC, POPC/ergo, POPC/camp et POPC/ß-sito, mis à part un K plus élevé pour les liposomes ne contenant pas de stérol, ceux contenant du campestérol et ceux contenant du ß-sitostérol on observe des valeurs similaires aux alentours de $4M^{-1}$ et au-dessus de $5M^{-1}$ pour l'ergostérol. Cependant, aucun test statistique n'a pu être fait étant donné qu'un seul réplicat a été réalisé, une différence significative ne peut donc pas être conclue, de même qu'une égalité.

La lichenysine montre en revanche une plus grande variabilité de ses paramètres thermodynamiques selon la composition membranaire, avec des ΔG moins négatifs pour POPC pur (autour de −0,5 kcal/mol). Parmis les liposomes contenant un stérol, le campestérol est associé au ΔG le moins négatif (environ -2,3 kcal/mol) tandis que l'ergostérol est le plus négatif (environ -4 kcal/mol). Cette sensibilité se retrouve dans les constantes d'affinité, où la valeur obtenue pour POPC/ergostérol est largement supérieure à celle de la surfactine et fengycine dans ce système et tous les autres systèmes, supposant une activité antifongique d'avantage supérieure. La modulation de l'affinité de partition en fonction du stérol membranaire pourrait ainsi constituer un élément de sélectivité moléculaire de ces lipopeptides vis-à-vis de leurs cibles biologiques. Par ailleurs, pour les systèmes comparables avec la surfactine (campestérol, ergostérol et ß-sitostérol), les valeurs de ΔH et ΔS de la lichenysine sont systématiquement inférieures, supposant un mode d'insertion enthalpiquement moins coûteux, mais dont le gain entropique est également plus faible.

Pour la fengycine, les paramètres thermodynamiques présentent une variabilité modérée selon la composition en stérol, montrant également une sensibilité à la nature du stérol. Le stigmastérol est associé au ΔH le plus élevé (environ 4,4 kcal/mol), indiquant un coût enthalpique marqué lors de l'insertion dans le liposome. A l'inverse, le campestérol est associé au ΔH le plus faible (environ 0,6 kcal/mol), suggérant une insertion enthalpiquement peu coûteuse. Ces différences ne se reflètent pas directement dans le ΔG, en raison d'une compensation enthalpie-entropie, le campestérol possède un ΔS élevé, conduisant à un ΔG parmi les plus négatifs, indiquant une

affinité moins favorable dans cet environnement, confirmé par les valeurs de constante d'affinité plus faible pour ce système.

Les trois lipopeptides présentent une partition thermodynamiquement spontanée, endothermique et entropiquement favorable pour l'ensemble des systèmes testés. La surfactine affiche la sélectivité de stérol la plus faible, avec des paramètres homogènes quelle que soit la composition membranaire. La lichenysine se distingue par une variabilité marquée et une affinité élevée pour les membranes à ergostérol. La fengycine présente quant à elle une sensibilité intermédiaire, avec des différences modestes entre stérols mais une compensation enthalpie-entropie variable selon l'environnement membranaire.

5.4 Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes composés de différents stérols.

Pour compléter ce travail, les propriétés mécaniques de la région interfaciale des bicouches a été suivie par la mesure de la polarisation généralisée (GP) d'une sonde solvatochromatique, le Laurdan (6-dodécanoyl-2-diméthylaminonaphtalène), inclue dans la bicouche lipidique des liposomes. Cette molécule amphiphile, associe une chaîne acyle en C12 à un fluorophore naphtalénique portant un groupement diméthylamino donneur d'électrons et un groupement carbonyle accepteur. Cette architecture détermine à la fois son ancrage et sa sensibilité, la chaîne laurique s'insère parallèlement aux chaînes acyles des phospholipides, ce qui positionne le noyau naphtalénique au niveau des glycérols, précisément à la frontière entre la région hydrophobe et la région interfaciale hydratée de la bicouche. Le Laurdan rapporte donc l'état d'une zone très localisée de la membrane, là où se produisent les modifications d'empilement induites par les stérols et où viennent se loger les têtes peptidiques des lipopeptides.

La sensibilité du laurdan à son environnement repose sur un mécanisme de relaxation dipolaire. A l'état fondamentale, la molécule possède un moment dipolaire modéré, mais l'excitation lumineuse, vers 350-360nm, provoque un transfert de charge intramoléculaire du groupement dimethylamino vers le carbonyle, qui augmente fortement ce moment dipolaire. Si les molécules d'eau mobiles sont présentes au voisinage du fluorophore, elles se réorientent autour de ce nouveau dipôle pendant la durée de vie de l'état excité, cette réorganisation dissipe une partie de l'énergie et l'émission se produit alors à une plus faible énergie, c'est-à-dire à plus grande longueur d'onde, autour de 480-490nm. A l'inverse, lorsque la bicouche est densément empilée, l'eau pénètre peu dans la région des glycérols et les rares molécules présentes y sont immobilisées par le réseau de liaisons hydrogène, la relaxation dipolaire ne peut plus s'effectuer avant l'émission du photon, et celle-ci reste à haute énergie, donc à plus petite longueur d'onde autour de 440nm.

Le déplacement du spectre d'émission traduit donc l'hydratation et la mobilité de l'eau dans la région interfaciale, elles-mêmes dictées par la compacité de l'empilement lipidique. Ce déplacement spectral est quantifié par la polarisation généralisée, définie par analogie avec la polarisation de fluorescence classique comme $GP=(I_{440}-I_{480})/(I_{440}+I_{480})$. La GP varie théoriquement entre -1 et +1. En pratique, une bicouche en phase gel ou en phase liquide-ordonnée, riche en stérol, donne des valeurs voisines de 0 ou négatives. Une augmentation de la GP traduit ainsi une déshydratation et une condensation de la région interfaciale, une diminution, l'effet inverse. Parce que la GP repose sur le rapport de deux intensités mesurées sur le même échantillon, elle s'affranchit des variations de concentration en sonde, de la longueur du trajet optique et des fluctuations de la source d'excitation. Le Laurdan présente l'avantage d'être électriquement neutre et de se répartir de façon équivalente entre les phases ordonnées et désordonnées[106].

La taille des liposomes a été contrôlée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Avant l'ajout de lipopeptide, pour confirmer le bon déroulement de l'extrusion avec une taille et l'homogénéité de l'échantillon, d'environ 100nm. Et après l'ajout de lipopeptide, donc après analyse au tecan, pour vérifier l'intégrité des liposomes et analyser l'évolution de leur taille. Tous les liposomes sont intacts après l'analyse au tecan, les résultats sont en annexe 34.

Ces résultats sont séparés en quatre parties : premièrement le POPC seul (Figure 16), ensuite le stérol animal (Figure 17) , après le stérol fongique (Figure 18) et enfin les phytostérols (Figure 19). Sur chacun des systèmes, trois lipopeptides, fengycine, lichenysine et surfactine, ont été testés à deux concentrations (10 et 20 µM).

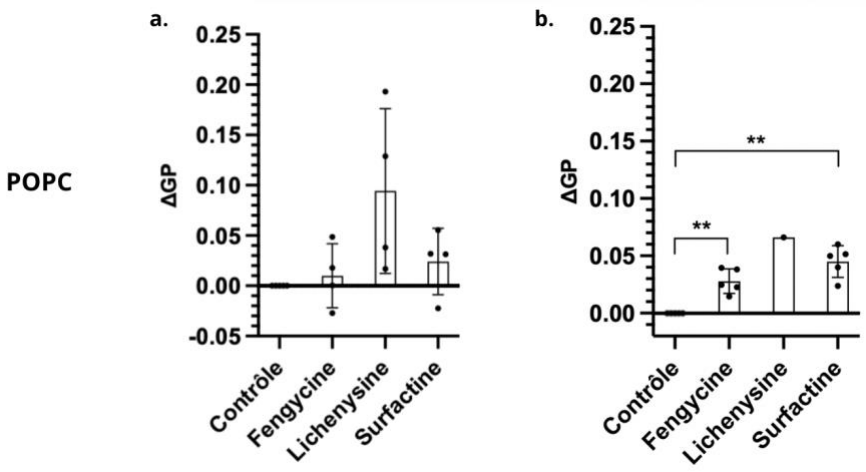


Figure 17: ***Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC mesuré par fluorescence du Laurdan.*** *Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à* ***(a)*** *10 µM et* ***(b)*** *20 µM, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés.*

Sur liposomes de POPC et à 10 µM (figure 16), la lichenysine se démarque clairement de la surfactine et de la fengycine en induisant une augmentation notable du ΔGP par rapport au

contrôle, mais ne montrant pas de différence significative selon les tests statistiques. La fengycine et la surfactine restent quant à elles proches du contrôle, sans perturbation significative de l'état de la bicouche.

À 20 µM, le profil change, les trois lipopeptides tendent vers des valeurs comparables et positives, c'est-à-dire que tous les trois rigidifient la bicouche de POPC. On note aussi une variabilité plus faible entre les réplicats à cette concentration. L'effet différentiel observé entre les deux concentrations pourrait indiquer une saturation à plus haute dose ou un mécanisme d'insertion différent selon la concentration.

Sur les liposomes de POPC/cholestérol, le profil d'action des lipopeptides est distinct des bicouches de POPC pur (Figure 17).

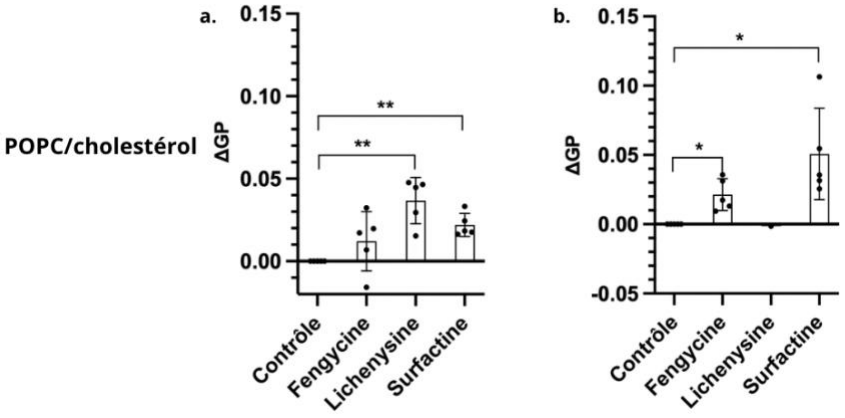


*Figure 18: **Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC/chol mesuré par fluorescence du Laurdan.** Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à **(a)** 10 µM et **(b)** 20 µM, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés.*

À 10 µM, la lichenysine et la surfactine rigidifient la bicouche, avec une rigidification plus marquée par la lichenysine que pour la surfactine.

A 20 µM, la situation se clarifie. La surfactine se démarque, avec un effet plus marqué et significatif, traduisant une augmentation de la rigidité. La fengycine montre un effet de rigidification et une plus petite variabilité. Quant à la lichenysine (un seul réplicat), aucune différence avec le contrôle n'a été observée.

Sur les liposomes de POPC/ergostérol (70/30), la fengycine tend à diminuer légèrement le ΔGP à 10µM, mais n'est pas différent significativement du contrôle(Figure 19).

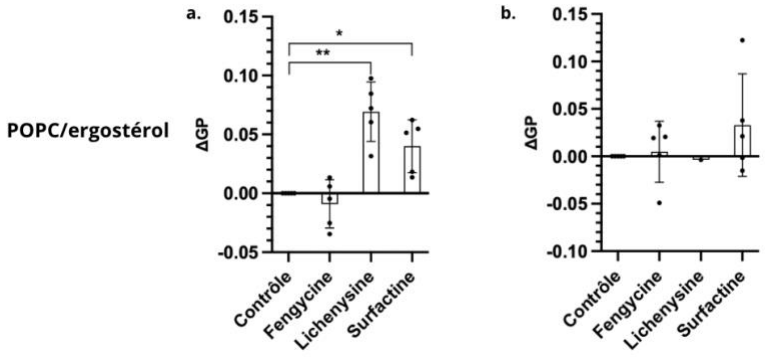


Figure 19: ***Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC/ergo mesuré par fluorescence du Laurdan.*** *Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à* ***(a)*** *10 µM et* ***(b)*** *20 µM, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés.*

À 10 µM, la lichenysine et la surfactine induisent toutes deux une augmentation de la rigidité. À 20 µM, aucun lipopeptides n'est significativement différent du contrôle.

Sur les liposomes de POPC/campestérol, POPC/stigmastérol et POPC/ß-sitostérol (Figure 20), l'effet des lipopeptides sur les bicouches suit la même tendance que pour POPC et POPC/cholestérol.

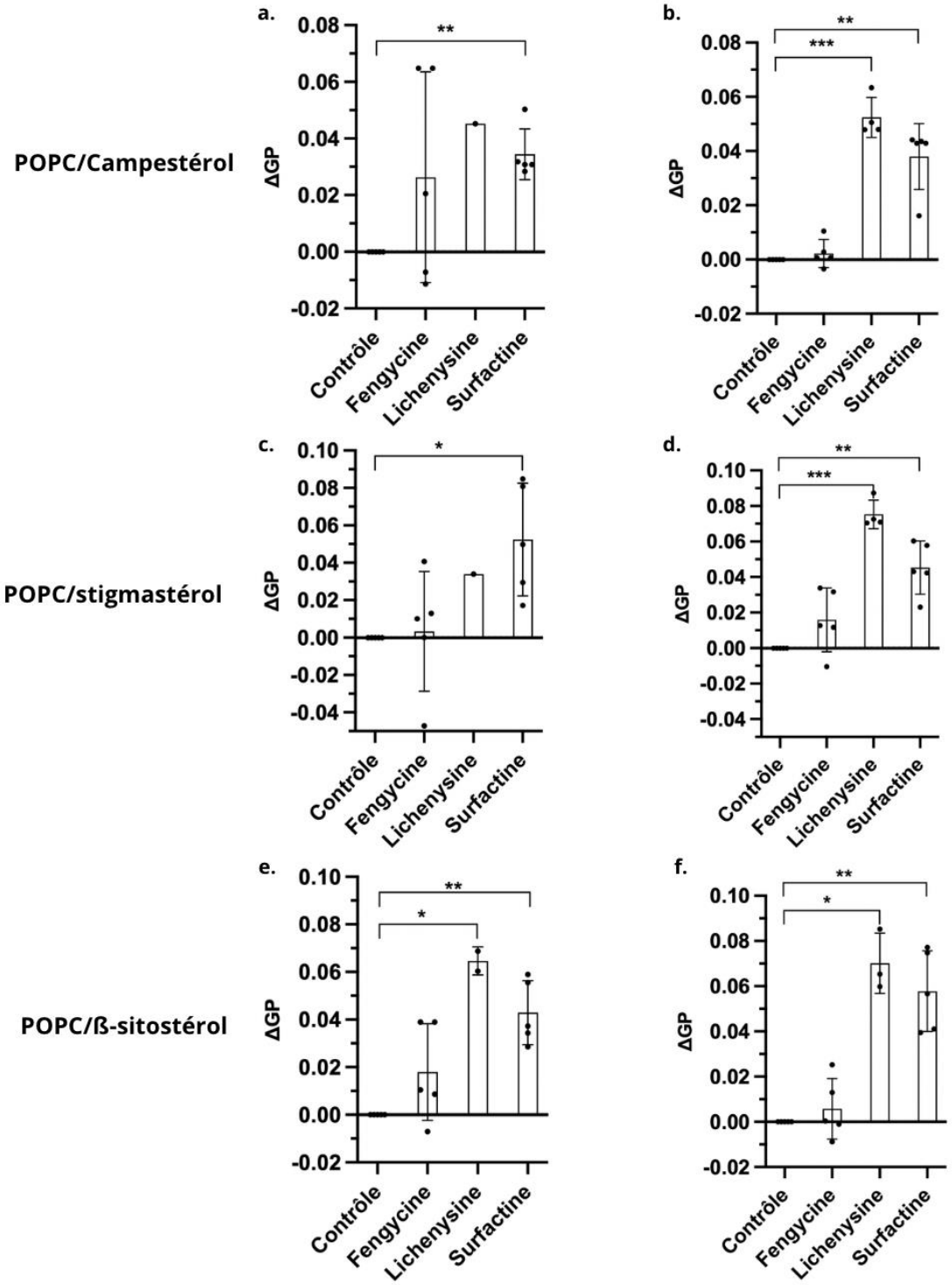


Figure 20: ***Effet des lipopeptides sur la fluidité membranaire de liposomes de POPC/phytostérol (70/30 molaire) mesuré par fluorescence du Laurdan.*** *Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) induite par la fengycine, la lichenysine et la surfactine à 10 µM (panneaux gauches) et 20 µM (panneaux droits), pour les systèmes POPC/campestérol* ***(a, b)****, POPC/stigmastérol* ***(c, d)*** *et POPC/β-sitostérol* ***(e, f)****, par rapport au contrôle. Par soucis de quantité en lichenysine, tous les réplicats n'ont pas pu être réalisés.*

A 10µM et pour les trois systèmes de phytostérols, la lichenysine et la surfactine rigidifient toujours la bicouche, tandis que la fengycine induit une rigidification plus faible non significativement différente du contrôle. POPC/campestérol et POPC/ß-sitostérol présentent des résultats similaires, avec une rigidification plus importante induite par la lichenysine et un ΔGP du même ordre de grandeur. En revanche pour POPC/stigmastérol les variations dans les réplicats rendent l'analyse

complexe. Le seul réplicat de lichenysine indique une rigidification plus faible qui est même surpassée par la surfactine et la fengycine a un ΔGP très faible sans différence significative avec le contrôle.
A 20µM les variations entre les réplicats diminuent. L'effet des lipopeptides est bien marqué. Pour tous les systèmes, les lipopeptides rigidifient la bicouche de la même manière. Quel que soit le système, le ΔGP de la fengycine est inférieur à celui de la surfatine, qui lui-même est plus faible que celui de la lichenysine.

Les mesures de ΔGP par fluorescence du Laurdan enrichissent et complexifient considérablement le tableau dressé par les expériences en monocouches. Un premier constat s'impose, dans la grande majorité des systèmes testés, la surfactine et la lichenysine induisent une augmentation du ΔGP, c'est-à-dire un effet ordonneur sur la région interfaciale de la bicouche. Ce résultat est cohérent avec le modèle de perturbation proposé pour la surfactine[81]. En effet, à des concentrations inférieures à la CMC, la surfactine s'insère préférentiellement à l'interface entre domaines de fluidité différente, et tend à condenser et rigidifier la bicouche plutôt qu'à la fluidifier. Plus généralement, Nazari et al.[76] ont montré que les lipopeptides de *Bacillus* se distinguent des détergents classiques par leur capacité à perméabiliser les membranes sans induire de désordre global significatif des chaînes lipidiques, ce que les valeurs de ΔGP confirment ici, aucun lipopeptides n'induisant de fluidification globale de la région interfaciale.
La lichenysine tend à être le lipopeptide le plus rigidifiant sur la majorité des systèmes testés, bien que le nombre limité de réplicats invite à interpréter ce résultat avec prudence. À 20 µM, l'ordre croissant d'effet est systématiquement fengycine < surfactine < lichenysine pour la plupart des compositions lipidiques (Figure 18). Cette hiérarchie invite à une réflexion sur la localisation membranaire de chaque molécule. Des simulations de dynamique moléculaire ont montré que la lichenysine se distribue homogènement le long de l'axe z de la bicouche en occupant préférentiellement le cœur hydrophobe[25,83]. Cette insertion au contact direct des chaînes acyl, est propice à un effet condensant sur l'empilement lipidique qui se répercute jusqu'à la région interfaciale sondée par la Laurdan. La surfactine, qui s'insère plutôt à l'interface hydrophobe-hydrophile[80], perturbe une zone légèrement différente. La fengycine, dont la tendance à former des agrégats à la surface membranaire est documentée[86], aurait un contact plus superficiel avec la bicouche, ce qui expliquerait son effet rigidifiant plus modeste en moyenne. De plus, la fengycine présente une CMC d'environ 4,6µM. Dans l'expérience à 10µM, une fraction significative des molécules est donc présente sous forme d'agrégats en solution, limitant la concentration en monomère disponible pour l'insertion membranaire. Cette disponibilité réduite pourrait expliquer pourquoi, à 10µM et à 20µM, la fengycine n'a globalement pas d'effet significatif par rapport au contrôle.

Il existe cependant un cas particulier pour la fengycine à 10µM qui a tendance à induire, dans le système POPC/ergostérol, un léger effet fluidifiant, bien que non significatif. Mantil et al.[102] ont montré que la fengycine redistribue les domaines membranaires dans des bicouches contenant de l'ergostérol, en perturbant spécifiquement les phases ordonnées Lo et désordonnées Ld. Zakharova et al.[90] ont confirmé que la fengycine induit des canaux ioniques préférentiellement dans des bicouches mimant les membranes fongiques. Il est donc plausible que, même à des concentrations proches de la CMC, la fengycine conserve une affinité particulière pour les domaines enrichis en ergostérol, ce qui se traduirait par une légère désorganisation interfaciale, insuffisante pour atteindre le seuil de significativité mais cohérente avec sa sélectivité antifongique connue.

Sur les membranes contenant du cholestérol (POPC/cholestérol), la surfactine est le lipopeptide qui se démarque à 20 µM avec un effet ordonneur significatif (Figure 16). Ce résultat est intéressant au regard du modèle biphasique décrit pour la lichenysine par Coronel et al.[83]. A des rapports POPC/cholestérol de 2:1, le cholestérol facilite l'insertion et la perméabilisation, tandis qu'à 1:1 il la freine. Dans notre système à 70/30, le cholestérol, qui induit la phase Lo[40,54], semble créer un état membranaire dans lequel la surfactine s'insère et condense efficacement la région interfaciale. La réponse de la lichenysine dans ce système est plus variable et semble sensible aux conditions expérimentales, comme en témoigne la réduction du nombre de réplicats exploitables.

Pour les phytostérols, le campestérol et le β-sitostérol génèrent des profils d'action des 3 lipopeptides très similaires (Figure 18), ce qui est cohérent avec leur capacité condensante comparable documentée sur des bicouches POPC par spectroscopie ^{2}H NMR[69]. Le système stigmastérol présente une variabilité de fluidité entre réplicats plus importante, notamment pour les concentrations en lipopeptide de 10 µM, qui reflète probablement une organisation membranaire plus hétérogène. Ce phytostérol, dont l'effet condensant est décrit comme inférieur à celui du β-sitostérol en raison de sa double liaison Δ22[67,72], pourrait générer des domaines lipidiques moins stables, et donc des réponses aux lipopeptides plus variables d'un réplicat à l'autre. La même double liaison Δ22 qui favorise l'insertion de la fengycine en monocouche (données BAF) génère donc dans la bicouche un état membranaire plus hétérogène, une dualité qui illustre bien la difficulté de transposer directement les conclusions d'un modèle à l'autre.

6 Discussion générale

La mise en regard des données de monocouches et de bicouches révèle une cohérence globale tout en soulignant les limites de chaque modèle. La non-sélectivité de la surfactine vis-à-vis des stérols, clairement établie par les MIP homogènes en monocouche, se retrouve dans les données de GP où elle induit un effet rigidifiant relativement constant quel que soit le stérol présent. La sensibilité de la fengycine à la structure 3D du stérol documentée en monocouche se traduit, en bicouche, par un comportement singulier sur le système ergostérol, le seul pour lequel elle exhibe un effet fluidifiant.

Cependant, les deux approches ne mesurent pas les mêmes choses. La monocouche de stérol pur, utilisée en BAF adsorption, permet d'analyser la capacité d'un lipopeptide à s'intercaler dans un film ne contenant que des molécules de stérol, une situation qui n'existe pas dans les membranes biologiques, où les stérols sont toujours accompagnés de phospholipides. Les mesures de GP sur bicouches POPC/stérol sont, de ce point de vue, biologiquement plus représentatives, car elles intègrent la coopérativité entre phospholipides et stérols dans la modulation de l'état membranaire. C'est précisément pourquoi les deux approches sont complémentaires plutôt que redondantes.

Il convient également de noter que les concentrations testées (10 et 20 µM) se situent dans une gamme proche ou supérieure aux CMC des lipopeptides étudiés, qui varient typiquement entre 7 et 25 µM pour la surfactine et 4,6µM pour la fengycine[18]. À 20 µM, une fraction des lipopeptides pourrait donc être sous forme micellaire plutôt qu'insérée dans la membrane, ce qui pourrait contribuer à l'homogénéisation des profils observée à cette concentration, notamment la diminution des différences entre lipopeptides pour un même système de stérol. La saturation des effets à 20 µM pourrait refléter non pas un seuil d'interaction membranaire, mais la transition vers un état où l'équilibre micelle/membrane modifie la dose effectivement disponible pour l'interaction. Des expériences à des concentrations plus faibles permettraient de préciser cette interprétation.

Replacés dans leur contexte biologique, ces résultats apportent des éléments nouveaux pour comprendre comment les lipopeptides de *Bacillus* discriminent des membranes de compositions différentes. La non-sélectivité de la surfactine pour les stérols, confirmée à deux niveaux d'organisation membranaire, Gilliard et al.[20] ont récemment montré que la surfactine interagit préférentiellement avec les sphingolipides végétaux (et particulièrement les glucosylcéramides) pour induire un remodelage membranaire et activer les réponses immunitaires chez *Arabidopsis thaliana*. Il s'agit donc d'une sélectivité qui porte davantage sur la nature des sphingolipides que sur celle des stérols, ce qui est cohérent avec l'absence de discrimination stérolique documentée ici.

Pour la fengycine, la capacité à discriminer les membranes selon leur composition en stérol s'inscrit dans sa fonction de biocontrôle antifongique. La légère fluidification des bicouches POPC/ergostérol à faible dose, absente sur tous les autres systèmes, constitue un marqueur biophysique de cette sélectivité. La fengycine perturbe différemment une membrane enrichie en ergostérol. Les travaux de Wise et al.[88] avaient établi une corrélation entre la teneur en ergostérol des champignons pathogènes et leur sensibilité à la fengycine, une observation que les données de Fiedler & Heerklotz[82] ont précisée à l'échelle moléculaire. Notre approche comparative confirme que cette sélectivité est déjà détectable à l'échelle des modèles membranaires simplifiés, et qu'elle oppose l'ergostérol à l'ensemble des autres stérols testés, cholestérol et phytostérols confondus. Du point de vue de la protection des plantes, cela signifie que la fengycine produite par *Bacillus* dans la rhizosphère peut en principe cibler préférentiellement les membranes fongiques sans affecter de manière équivalente les membranes végétales, riches en phytostérols, ni les membranes des cellules bactériennes dépourvues de stérols.

Le cas de la lichenysine est peut-être le plus original de ce travail, car ses interactions membranaires avec des stérols autres que le cholestérol n'avaient jamais été étudiées. Son effet ordonneur prononcé et relativement constant à 20 µM sur l'ensemble des systèmes lipidiques testés, supérieur à celui de la surfactine et de la fengycine, suggère que son mode d'insertion dans le cœur hydrophobe de la bicouche[25,83] génère des perturbations qui se propagent jusqu'à la région interfaciale sondée par le Laurdan, et ce indépendamment du stérol présent. Cette absence de sélectivité de la nature du stérol contraste avec ce que l'on pourrait attendre d'une molécule dotée d'une activité antifongique, mais reste logique étant donné qu'elle fait partie de la famille des surfactines. Elle est cependant cohérente avec les données de Leconte et al.[84] montrant que la lichenysine seule ne présente pas d'activité antifongique significative sur *Venturia inaequalis*, mais qu'elle potentialise l'action de la fengycine en combinaison. Ce phénomène de synergie pourrait s'expliquer précisément par la complémentarité de leurs modes d'action, la lichenysine, en perturbant globalement l'empilement lipidique sans discrimination du stérol, pourrait faciliter l'accès de la fengycine aux domaines d'ergostérols ciblés, abaissant en quelque sorte la barrière énergétique d'insertion de cette dernière.

7 Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail était d'évaluer, de manière comparative et systématique, dans quelle mesure la nature du stérol membranaire influence les interactions de trois lipopeptides de *Bacillus*, la surfactine, la fengycine et la lichenysine, avec des membranes modèles à base de POPC. Pour y répondre, trois approches complémentaires ont été utilisées, la balance à film de Langmuir en mode compression et adsorption, qui permet d'analyser l'organisation interfaciale des stérols et la capacité des lipopeptides à s'insérer dans des monocouches. La calorimétrie de titration isotherme, qui quantifie les paramètres thermodynamiques, enthalpie, entropie et constante

d’affinité, de l’interaction des lipopeptides avec des liposomes contenant les stérols. La fluorescence du Laurdan sur liposomes, qui renseigne sur l’état de fluidité de la région interfaciale de bicouches complètes.

Les isothermes de compression révèlent que l’ergostérol est le seul stérol étudié ayant une isotherme qui se démarque largement des autres, commençant à des A_0 bien plus élevée. Cette singularité, liée à ses deux doubles liaisons conjuguées (Δ5,7) et à sa chaîne latérale insaturée (Δ22), induisent un comportement interfacial fondamentalement différent des phytostérols et du cholestérol. Les six autres stérols forment tous des films condensés, avec des pressions d'effondrement et des surfaces moléculaires minimales comparables, reflétant leur capacité similaire à s'intégrer dans des monocouches ordonnées.

Les expériences d'adsorption mettent en évidence deux stratégies d'interaction membranaire distinctes. La surfactine se comporte comme un agent membranotrope non discriminant, dont la pression d'insertion maximale (MIP) est homogène quel que soit le stérol présent dans la monocouche. La fengycine, à l'inverse, est sensible à la géométrie moléculaire du stérol environnant, avec une MIP maximale pour le cholestérol et une MIP minimale pour le β-sitostérol, illustrant une discrimination fine liée aux propriétés tridimensionnelles de la chaîne latérale en C17.

Les données d'ITC confirment que la partition des trois lipopeptides dans des bicouches POPC/stérol est un processus thermodynamiquement spontané ($\Delta G < 0$), endothermique ($\Delta H > 0$) et entropiquement favorable ($\Delta S > 0$), signature caractéristique de l'effet hydrophobe. La présence de stérols augmente généralement l'affinité de partition par rapport au POPC pur. La surfactine présente les ΔG les plus homogènes selon la composition en stérol, confirmant sa non-sélectivité. La lichenysine affiche une affinité de partition particulièrement élevée pour les liposomes contenant de l'ergostérol, une observation originale n'ayant jamais été rapportée dans la littérature.

Les mesures de fluorescence du Laurdan révèlent que les trois lipopeptides induisent une rigidification de la région interfaciale des bicouches, avec la hiérarchie constante fengycine < surfactine < lichenysine à 10 et 20 µM, indépendamment du stérol présent.

En conclusion, ces résultats démontrent que la nature du stérol membranaire joue un rôle modulateur significatif dans les interactions lipopeptide-membrane, bien que son importance soit inégale selon le lipopeptide considéré. La fengycine est le seul des trois lipopeptides à présenter une sélectivité de la nature du stérol biophysiquement mesurable, cohérente avec son activité antifongique préférentielle sur les organismes productreurs d'ergostérol. La surfactine et la lichenysine, bien que présentant des affinités membranaires différentes selon les stérols, ne discriminent pas de manière fonctionnelle les compositions en stérol étudiées. Ce travail apporte

également les premières données biophysiques sur les interactions de la lichenysine avec des membranes contenant des phytostérols, comblant ainsi une lacune importante dans la littérature.

Ces résultats ouvrent plusieurs perspectives expérimentales et conceptuelles. Sur le plan méthodologique, des expériences à des concentrations sous la CMC de chaque lipopeptide (typiquement 1–5 µM) permettraient de caractériser les interactions membranaires sans compétition micelle-membrane, et de préciser si les hiérarchies d'affinité observées à 10 et 20 µM sont conservées à des concentrations plus physiologiques. L'augmentation du nombre de réplicats biologiques, notamment pour la lichenysine, en fluorescence du Laurdan et pour l'ensemble des expériences d'ITC, est une priorité pour renforcer la robustesse statistique des conclusions thermodynamiques. De plus, il serait intéressant de réaliser les expériences de balance à film en mode adsorption avec la lichenysine. Des expériences de perméabilisation de vésicules (libération de carboxyfluorescéine ou calcéine) en présence des trois lipopeptides permettraient également de relier les paramètres d'insertion membranaire à une mesure fonctionnelle directe de la perturbation de la barrière lipidique. Sur le plan des modèles membranaires, l'incorporation de sphingolipides dans les bicouches représente une étape importante vers des systèmes plus représentatifs des membranes biologiques. Les glucosylcéramides végétaux et les glycosylinositolphosphoséramides (GIPCs) fongiques, absents des modèles utilisés ici, sont susceptibles de moduler fortement les interactions avec les lipopeptides, notamment pour la surfactine dont la sélectivité a été décrite sur ces mêmes sphingolipides[20]. L'utilisation de liposomes biomimétiques reproduisant les profils lipidomiques complets de champignons pathogènes d'intérêt agronomique, comme *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, permettrait de tester si les comportements observés sur des modèles simplifiés se transposent à des systèmes membranaires plus complexes. Sur le plan de la synergie des lipopeptides, l'étude biophysique des interactions membranaires induites par les mélanges lichenysine/fengycine représente une perspective directement motivée par les données de Leconte et al. (2024). Des expériences de fluorescence du Laurdan et de perméabilisation de vésicules en présence simultanée des deux molécules, à des ratios molaires reflétant ceux produits par la souche bactérienne, permettraient de tester l'hypothèse selon laquelle la lichenysine facilite l'accès de la fengycine aux domaines d'ergostérol. Des expériences d'ITC avec des mélanges de lipopeptides, bien que plus complexes, pourraient apporter des informations thermodynamiques sur l'éventuelle coopérativité d'insertion. Sur le plan de la validation biologique, la corrélation entre les données biophysiques obtenues sur modèles membranaires et l'activité antifongique mesurée sur des souches de champignons à composition en stérols modifiée, notamment par mutation ou délétion des gènes ERG2, ERG3 ou ERG6 impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol, représente une perspective particulièrement pertinente. Une telle corrélation permettrait d'établir un lien de causalité direct entre les propriétés

biophysiques caractérisées ici et l'efficacité de biocontrôle des lipopeptides, et de valider les modèles membranaires simplifiés utilisés comme outils prédictifs d'activité. Enfin, des approches de modélisation moléculaire, notamment des simulations de dynamique moléculaire à gros grain ou tout-atome, offriraient une résolution atomistique sur les modes d'insertion des lipopeptides selon la nature du stérol. En particulier, une simulation comparant l'insertion de la fengycine dans des bicouches contenant de l'ergostérol versus du β-sitostérol serait particulièrement informative pour identifier les interactions spécifiques entre les résidus peptidiques de la fengycine et la chaîne latérale de chaque stérol, et pour fournir ainsi une base moléculaire aux différences d'affinité et d'effet sur la fluidité documentée expérimentalement dans ce travail.

8 Bibliographie

1. Bardgett RD, Van Der Putten WH. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*. 2014;515(7528):505-511. doi:10.1038/nature13855

2. Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. 2009;321(1-2):341-361. doi:10.1007/s11104-008-9568-6

3. Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Van Der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(11):789-799. doi:10.1038/nrmicro3109

4. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. THE ROLE OF ROOT EXUDATES IN RHIZOSPHERE INTERACTIONS WITH PLANTS AND OTHER ORGANISMS. *Annu Rev Plant Biol*. 2006;57(1):233-266. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159

5. Badri DV, Vivanco JM. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ*. 2009;32(6):666-681. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x

6. Begum N, Qin C, Ahanger MA, et al. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front Plant Sci*. 2019;10:1068. doi:10.3389/fpls.2019.01068

7. Xu Y, Chen Z, Li X, Tan J, Liu F, Wu J. The mechanism of promoting rhizosphere nutrient turnover for arbuscular mycorrhizal fungi attributes to recruited functional bacterial assembly. *Mol Ecol*. 2023;32(9):2335-2350. doi:10.1111/mec.16880

8. Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. 2008;16(3):115-125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009

9. Balleux G, Höfte M, Arguelles-Arias A, Deleu M, Ongena M. Bacillus lipopeptides as key players in rhizosphere chemical ecology. *Trends Microbiol*. 2025;33(1):80-95. doi:10.1016/j.tim.2024.08.001

10. Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas* : more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(6):1037-1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x

11. Hoff G, Arguelles Arias A, Boubsi F, et al. Surfactin Stimulated by Pectin Molecular Patterns and Root Exudates Acts as a Key Driver of the *Bacillus* -Plant Mutualistic Interaction. Vidaver AK, ed. *mBio*. 2021;12(6):e01774-21. doi:10.1128/mBio.01774-21

12. Boubsi F, Hoff G, Arguelles Arias A, et al. Pectic homogalacturonan sensed by Bacillus acts as host associated cue to promote establishment and persistence in the rhizosphere. *iScience*. 2023;26(10):107925. doi:10.1016/j.isci.2023.107925

13. Aranda FJ, Teruel JA, Ortiz A. Recent advances on the interaction of glycolipid and lipopeptide biosurfactants with model and biological membranes. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2023;68:101748. doi:10.1016/j.cocis.2023.101748

14. Luong AD, Moorthy M, Luong JH. Microbial Biosurfactants: Antimicrobial Agents Against Pathogens. *Macromol*. 2026;6(1):6. doi:10.3390/macromol6010006

15. D'Souza C, Nakano MM, Zuber P. Identification of comS, a gene of the srfA operon that regulates the establishment of genetic competence in Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci USA*. Published online 1994.

16. Hamoen LW, Eshuis H, Jongbloed J, Venema G, Van Sinderen D. A small gene, designated *comS* , located within the coding region of the fourth amino acid-activation domain of *srfA* , is required for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 1995;15(1):55-63. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02220.x

17. Stiegelmeyer SM, Giddings MC. Agent-based modeling of competence phenotype switching in Bacillus subtilis. *Theor Biol Med Model*. 2013;10(1):23. doi:10.1186/1742-4682-10-23

18. Hausmann R, Henkel M, eds. *Biosurfactants for the Biobased Economy*. Vol 181. Springer International Publishing; 2022. doi:10.1007/978-3-031-07337-3

19. Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol*. 2007;9(4):1084-1090. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x

20. Gilliard G, Pršić J, Crowet JM, et al. Membrane remodelling mediates lipopeptide-induced immunity in Arabidopsis. *Nat Plants*. Published online April 20, 2026. doi:10.1038/s41477-026-02270-3

21. Konz D, Doekel S, Marahiel MA. Molecular and Biochemical Characterization of the Protein Template Controlling Biosynthesis of the Lipopeptide Lichenysin. *J Bacteriol*. 1999;181(1):133-140. doi:10.1128/JB.181.1.133-140.1999

22. Grangemard I, Bonmatin JM, Bernillon J, Das BC, Peypoux F. Lichenysins G, a Novel Family of Lipopeptide Biosurfactants from Bacillus licheniformis IM 1307: Production, Isolation and Structural Evaluation by NMR and Mass Spectrometry. *J Antibiot (Tokyo)*. 1999;52(4):363-373. doi:10.7164/antibiotics.52.363

23. Joshi SJ, Geetha SJ, Desai AJ. Characterization and Application of Biosurfactant Produced by Bacillus licheniformis R2. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;177(2):346-361. doi:10.1007/s12010-015-1746-4

24. Yakimov MM, Timmis KN, Wray V, Fredrickson HL. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface Bacillus licheniformis BAS50. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(5):1706-1713. doi:10.1128/aem.61.5.1706-1713.1995

25. Coronel JR, Aranda FJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa Á, Ortiz A. Kinetic and Structural Aspects of the Permeabilization of Biological and Model Membranes by Lichenysin. *Langmuir*. 2016;32(1):78-87. doi:10.1021/acs.langmuir.5b04294

26. Madslien EH, Rønning HT, Lindbäck T, Hassel B, Andersson MA, Granum PE. Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains. *J Appl Microbiol*. 2013;115(4):1068-1080. doi:10.1111/jam.12299

27. Banat IM, Carboué Q, Saucedo-Castañeda G, De Jesús Cázares-Marinero J. Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. *Bioresour Technol*. 2021;320:124222. doi:10.1016/j.biortech.2020.124222

28. Leal E, Teixeira JA, Gudiña EJ. Development of Foam-Free Biosurfactant Production Processes Using Bacillus licheniformis. *Fermentation*. 2024;10(7):340. doi:10.3390/fermentation10070340

29. Botcazon C, Bergia T, Lecouturier D, et al. Rhamnolipids and fengycins, very promising amphiphilic antifungal compounds from bacteria secretomes, act on Sclerotiniaceae fungi through different mechanisms. *Front Microbiol*. 2022;13:977633. doi:10.3389/fmicb.2022.977633

30. Chen M, Wang H, Zhang C, et al. Recent advances in antimicrobial lipopeptide fengycin secreted by Bacillus: Structure, biosynthesis, antifungal mechanisms, and potential application in food preservation. *Food Chem*. 2025;489:144937. doi:10.1016/j.foodchem.2025.144937

31. Hausmann R, Henkel M, eds. *Biosurfactants for the Biobased Economy*. Vol 181. Springer International Publishing; 2022. doi:10.1007/978-3-031-07337-3

32. Reszczyńska E, Hanaka A. Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochem Biophys*. 2020;78(4):401-414. doi:10.1007/s12013-020-00947-w

33. Nakamura Y. Plant Phospholipid Diversity: Emerging Functions in Metabolism and Protein–Lipid Interactions. *Trends Plant Sci*. 2017;22(12):1027-1040. doi:10.1016/j.tplants.2017.09.002

34. Colin LA, Jaillais Y. Phospholipids across scales: lipid patterns and plant development. *Curr Opin Plant Biol*. 2020;53:1-9. doi:10.1016/j.pbi.2019.08.007

35. Cacas JL, Buré C, Grosjean K, et al. Revisiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: A Focus on Sphingolipids. *Plant Physiol*. 2016;170(1):367-384. doi:10.1104/pp.15.00564

36. Mamode Cassim A, Gouguet P, Gronnier J, et al. Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog Lipid Res*. 2019;73:1-27. doi:10.1016/j.plipres.2018.11.002

37. Hartmann M. Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci*. 1998;3(5):170-175. doi:10.1016/S1360-1385(98)01233-3

38. Schaller H. New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol Biochem*. 2004;42(6):465-476. doi:10.1016/j.plaphy.2004.05.012

39. Vogel P, Persson S, Moreno-Pescador G, Noack LC. Sterols in plant biology – Advances in studying membrane dynamics. *Cell Surf*. 2025;13:100147. doi:10.1016/j.tcsw.2025.100147

40. Dufourc EJ. Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol*. 2008;1(1-4):63-77. doi:10.1007/s12154-008-0010-6

41. Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, Dufourc EJ. Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J*. 2007;21(8):1714-1723. doi:10.1096/fj.06-7809com

42. Weete JD, Abril M, Blackwell M. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. Butler G, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10899. doi:10.1371/journal.pone.0010899

43. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res*. 2002;41(6):457-500. doi:10.1016/S0163-7827(02)00006-1

44. Subczynski WK, Kusumi A. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2003;1610(2):231-243. doi:10.1016/S0005-2736(03)00021-X

45. Sonawane PD, Pollier J, Panda S, et al. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nat Plants*. 2016;3(1):16205. doi:10.1038/nplants.2016.205

46. De Vriese K, Pollier J, Goossens A, Beeckman T, Vanneste S. Dissecting cholesterol and phytosterol biosynthesis via mutants and inhibitors. Lunn J, ed. *J Exp Bot*. 2021;72(2):241-253. doi:10.1093/jxb/eraa429

47. Chen Q, Steinhauer L, Hammerlindl J, Keller W, Zou J. Biosynthesis of Phytosterol Esters: Identification of a Sterol *O* -Acyltransferase in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2007;145(3):974-984. doi:10.1104/pp.107.106278

48. Ferrer A, Altabella T, Arró M, Boronat A. Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Prog Lipid Res*. 2017;67:27-37. doi:10.1016/j.plipres.2017.06.002

49. Grille S, Zaslawski A, Thiele S, Plat J, Warnecke D. The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res*. 2010;49(3):262-288. doi:10.1016/j.plipres.2010.02.001

50. Ramirez-Estrada K, Castillo N, Lara JA, et al. Tomato UDP-Glucose Sterol Glycosyltransferases: A Family of Developmental and Stress Regulated Genes that Encode Cytosolic and Membrane-Associated Forms of the Enzyme. *Front Plant Sci*. 2017;8:984. doi:10.3389/fpls.2017.00984

51. Schrick K, Shiva S, Arpin JC, et al. Steryl Glucoside and Acyl Steryl Glucoside Analysis of *Arabidopsis* Seeds by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Lipids*. 2012;47(2):185-193. doi:10.1007/s11745-011-3602-9

52. Simons K, Vaz WLC. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004;33(1):269-295. doi:10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803

53. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):112-124. doi:10.1038/nrm2330

54. Hjort Ipsen J, Karlström G, Mourtisen OG, Wennerström H, Zuckermann MJ. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 1987;905(1):162-172. doi:10.1016/0005-2736(87)90020-4

55. Dupont S, Lemetais G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P, Beney L. ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS: A FUNGAL PATHWAY FOR LIFE ON LAND? *Evolution*. 2012;66(9):2961-2968. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x

56. Kodedová M, Valachovič M, Sychrová H. The replacement of ergosterol with alternative sterols affects the physiological function of the yeast plasma membrane, including its H+-ATPase activity and resistance to antifungal drugs. *Microbes Infect*. 2025;27(2):105409. doi:10.1016/j.micinf.2024.105409

57. Frallicciardi J, Melcr J, Siginou P, Marrink SJ, Poolman B. Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nat Commun*. 2022;13(1):1605. doi:10.1038/s41467-022-29272-x

58. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):125-138. doi:10.1038/nrm2336

59. Urbina JA, Pekerar S, Le H biao, Patterson J, Montez B, Oldfield E. Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using 2H-, 13C- and 31P-NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 1995;1238(2):163-176. doi:10.1016/0005-2736(95)00117-L

60. Smondyrev AM, Berkowitz ML. Molecular Dynamics Simulation of the Structure of Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers with Cholesterol, Ergosterol, and Lanosterol. *Biophys J*. 2001;80(4):1649-1658. doi:10.1016/S0006-3495(01)76137-1

61. Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(9):603-616. doi:10.1038/nrd.2017.46

62. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol*. 2014;10(5):400-406. doi:10.1038/nchembio.1496

63. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *J Fungi*. 2020;6(4):321. doi:10.3390/jof6040321

64. Sanglard D, Odds FC. Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(2):73-85. doi:10.1016/S1473-3099(02)00181-0

65. Robbins N, Caplan T, Cowen LE. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71(1):753-775. doi:10.1146/annurev-micro-030117-020345

66. Benveniste P. BIOSYNTHESIS AND ACCUMULATION OF STEROLS. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55(1):429-457. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141616

67. Bernsdorff C, Winter R. Differential Properties of the Sterols Cholesterol, Ergosterol, β-Sitosterol, *trans* -7-Dehydrocholesterol, Stigmasterol and Lanosterol on DPPC Bilayer Order. *J Phys Chem B*. 2003;107(38):10658-10664. doi:10.1021/jp034922a

68. 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. doi:10.1021/jp803193s

69. Shaghaghi M, Chen MT, Hsueh YW, Zuckermann MJ, Thewalt JL. Effect of Sterol Structure on the Physical Properties of 1-Palmitoyl-2-oleoyl- *sn* -glycero-3-phosphocholine Membranes Determined Using^2 H Nuclear Magnetic Resonance. *Langmuir*. 2016;32(30):7654-7663. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01401

70. Hodzic A, Rappolt M, Amenitsch H, Laggner P, Pabst G. Differential Modulation of Membrane Structure and Fluctuations by Plant Sterols and Cholesterol. *Biophys J*. 2008;94(10):3935-3944. doi:10.1529/biophysj.107.123224

71. Morikawa T, Mizutani M, Aoki N, et al. Cytochrome P450 *CYP710A* Encodes the Sterol C-22 Desaturase in *Arabidopsis* and Tomato. *Plant Cell*. 2006;18(4):1008-1022. doi:10.1105/tpc.105.036012

72. Grosjean K, Mongrand S, Beney L, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P. Differential Effect of Plant Lipids on Membrane Organization. *J Biol Chem*. 2015;290(9):5810-5825. doi:10.1074/jbc.M114.598805

73. Fujioka S, Yokota T. Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol*. 2003;54(1):137-164. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134921

74. Heerklotz H, Seelig J. Detergent-Like Action of the Antibiotic Peptide Surfactin on Lipid Membranes. *Biophys J*. 2001;81(3):1547-1554. doi:10.1016/S0006-3495(01)75808-0

75. Gilliard G, Furlan AL, Smeralda W, Pršić J, Deleu M. Added Value of Biophysics to Study Lipid-Driven Biological Processes: The Case of Surfactins, a Class of Natural Amphiphile Molecules. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22):13831. doi:10.3390/ijms232213831

76. Nazari M, Kurdi M, Heerklotz H. Classifying Surfactants with Respect to Their Effect on Lipid Membrane Order. *Biophys J*. 2012;102(3):498-506. doi:10.1016/j.bpj.2011.12.029

77. Heerklotz H. Interactions of surfactants with lipid membranes. *Q Rev Biophys*. 2008;41(3-4):205-264. doi:10.1017/S0033583508004721

78. Heerklotz H, Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J*. 2007;36(4-5):305-314. doi:10.1007/s00249-006-0091-5

79. Balleza D, Alessandrini A, Beltrán García MJ. Role of Lipid Composition, Physicochemical Interactions, and Membrane Mechanics in the Molecular Actions of Microbial Cyclic Lipopeptides. *J Membr Biol*. 2019;252(2-3):131-157. doi:10.1007/s00232-019-00067-4

80. Heerklotz H, Wieprecht T, Seelig J. Membrane Perturbation by the Lipopeptide Surfactin and Detergents as Studied by Deuterium NMR. *J Phys Chem B*. 2004;108(15):4909-4915. doi:10.1021/jp0371938

81. Deleu M, Lorent J, Lins L, et al. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2013;1828(2):801-815. doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.007

82. Fiedler S, Heerklotz H. Vesicle Leakage Reflects the Target Selectivity of Antimicrobial Lipopeptides from Bacillus subtilis. *Biophys J*. 2015;109(10):2079-2089. doi:10.1016/j.bpj.2015.09.021

83. Coronel JR, Marqués A, Manresa Á, Aranda FJ, Teruel JA, Ortiz A. Interaction of the Lipopeptide Biosurfactant Lichenysin with Phosphatidylcholine Model Membranes. *Langmuir*. 2017;33(38):9997-10005. doi:10.1021/acs.langmuir.7b01827

84. Leconte A, Jacquin J, Duban M, et al. Deciphering the mechanisms involved in reduced sensitivity to azoles and fengycin lipopeptide in Venturia inaequalis. *Microbiol Res*. 2024;286:127816. doi:10.1016/j.micres.2024.127816

85. Ali F, Ahmad S, Abbas Q, et al. Identification of potential therapeutic targets and epithelial cell signaling pathway for Helicobacter pylori infection using biosurfactants as a novel green antimicrobials: A network pharmacology approach. *Microb Pathog*. 2025;206:107767. doi:10.1016/j.micpath.2025.107767

86. Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by Bacillus subtilis, on Model Biomembranes. *Biophys J*. 2008;94(7):2667-2679. doi:10.1529/biophysj.107.114090

87. Deleu M, Paquot M, Nylander T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J Colloid Interface Sci*. 2005;283(2):358-365. doi:10.1016/j.jcis.2004.09.036

88. Wise C, Falardeau J, Hagberg I, Avis TJ. Cellular Lipid Composition Affects Sensitivity of Plant Pathogens to Fengycin, an Antifungal Compound Produced by *Bacillus subtilis* Strain CU12. *Phytopathology®*. 2014;104(10):1036-1041. doi:10.1094/PHYTO-12-13-0336-R

89. Patel H, Tscheka C, Edwards K, Karlsson G, Heerklotz H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from Bacillus subtilis QST713. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2011;1808(8):2000-2008. doi:10.1016/j.bbamem.2011.04.008

90. Zakharova AA, Efimova SS, Malev VV, Ostroumova OS. Fengycin induces ion channels in lipid bilayers mimicking target fungal cell membranes. *Sci Rep*. 2019;9(1):16034. doi:10.1038/s41598-019-52551-5

91. Botcazon C, Ramos-Martín F, Rodríguez-Moraga N, et al. Rhamnolipids and fengycins interact differently with biomimetic lipid membrane models of Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum: Lipidomics profiles and biophysical studies. *Biophys Chem*. 2024;314:107305. doi:10.1016/j.bpc.2024.107305

92. Eeman M, Deleu M. From biological membranes to biomimetic model membranes.

93. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 1985;812(1):55-65. doi:10.1016/0005-2736(85)90521-8

94. Eeman M, Francius G, Dufrêne YF, Nott K, Paquot M, Deleu M. Effect of Cholesterol and Fatty Acids on the Molecular Interactions of Fengycin with *Stratum Corneum* Mimicking Lipid Monolayers. *Langmuir*. 2009;25(5):3029-3039. doi:10.1021/la803439n

95. Nagle JF, Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr*. 2000;1469(3):159-195. doi:10.1016/S0304-4157(00)00016-2

96. Kučerka N, Nieh MP, Katsaras J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2011;1808(11):2761-2771. doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.022

97. Ferreira TM, Coreta-Gomes F, Ollila OHS, Moreno MJ, Vaz WLC, Topgaard D. Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state^{1} H–^{13} C NMR and MD simulation studies. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15(6):1976-1989. doi:10.1039/C2CP42738A

98. Henriksen J, Rowat AC, Brief E, et al. Universal Behavior of Membranes with Sterols. *Biophys J*. 2006;90(5):1639-1649. doi:10.1529/biophysj.105.067652

99. Hsueh YW, Chen MT, Patty PJ, et al. Ergosterol in POPC Membranes: Physical Properties and Comparison with Structurally Similar Sterols. *Biophys J*. 2007;92(5):1606-1615. doi:10.1529/biophysj.106.097345

100. Cournia Z, Ullmann GM, Smith JC. Differential Effects of Cholesterol, Ergosterol and Lanosterol on a Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Membrane: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Phys Chem B*. 2007;111(7):1786-1801. doi:10.1021/jp065172i

101. Sabatini K, Mattila JP, Kinnunen PKJ. Interfacial Behavior of Cholesterol, Ergosterol, and Lanosterol in Mixtures with DPPC and DMPC. *Biophys J*. 2008;95(5):2340-2355. doi:10.1529/biophysj.108.132076

102. Mantil E, Crippin T, Avis TJ. Domain redistribution within ergosterol-containing model membranes in the presence of the antimicrobial compound fengycin. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2019;1861(4):738-747. doi:10.1016/j.bbamem.2019.01.003

103. Monnier N, Furlan AL, Buchoux S, et al. Exploring the Dual Interaction of Natural Rhamnolipids with Plant and Fungal Biomimetic Plasma Membranes through Biophysical Studies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1009. doi:10.3390/ijms20051009

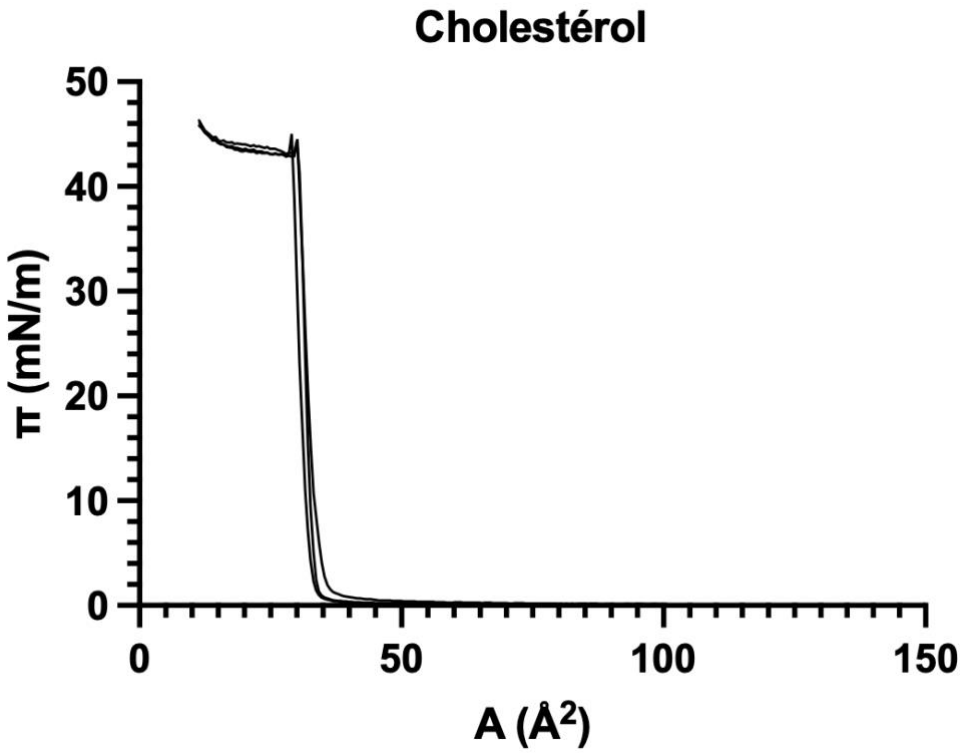
104. Heerklotz H, Seelig J. Titration calorimetry of surfactant–membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2000;1508(1-2):69-85. doi:10.1016/S0304-4157(00)00009-5

105. Maget-Dana R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 1999;1462(1-2):109-140. doi:10.1016/S0005-2736(99)00203-5

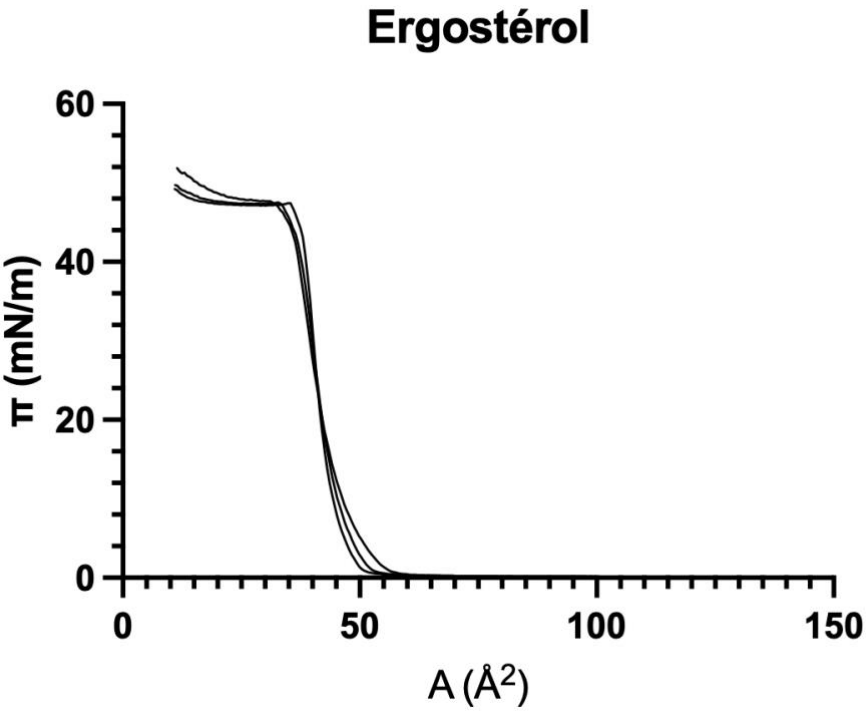
106. Parasassi T, Krasnowska EK, Bagatolli L, Gratton E. Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes.

9 Annexes

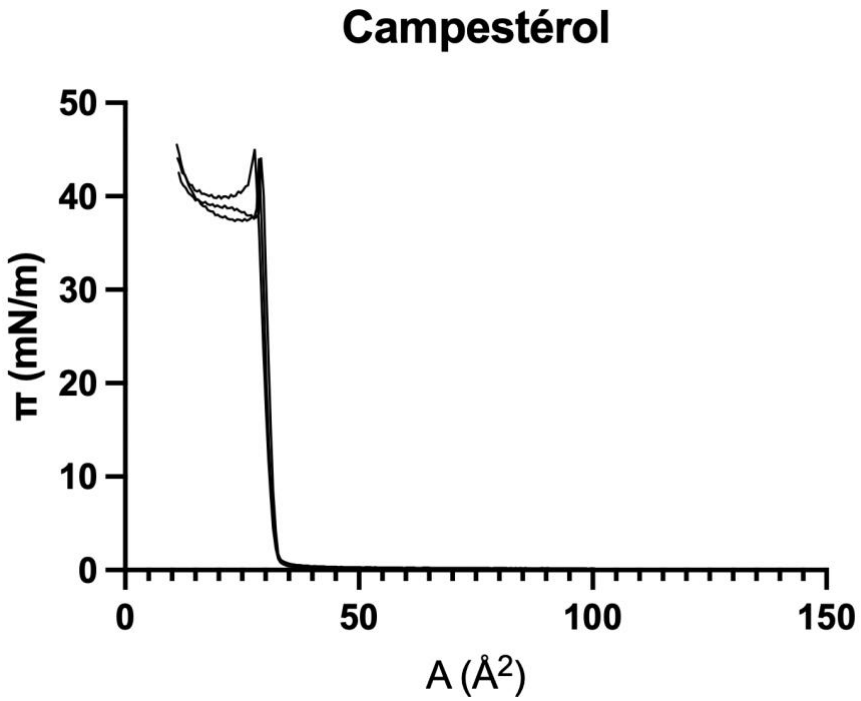
Annexe 1: Isothermes de compression pour les 3 réplicats du cholestérol.



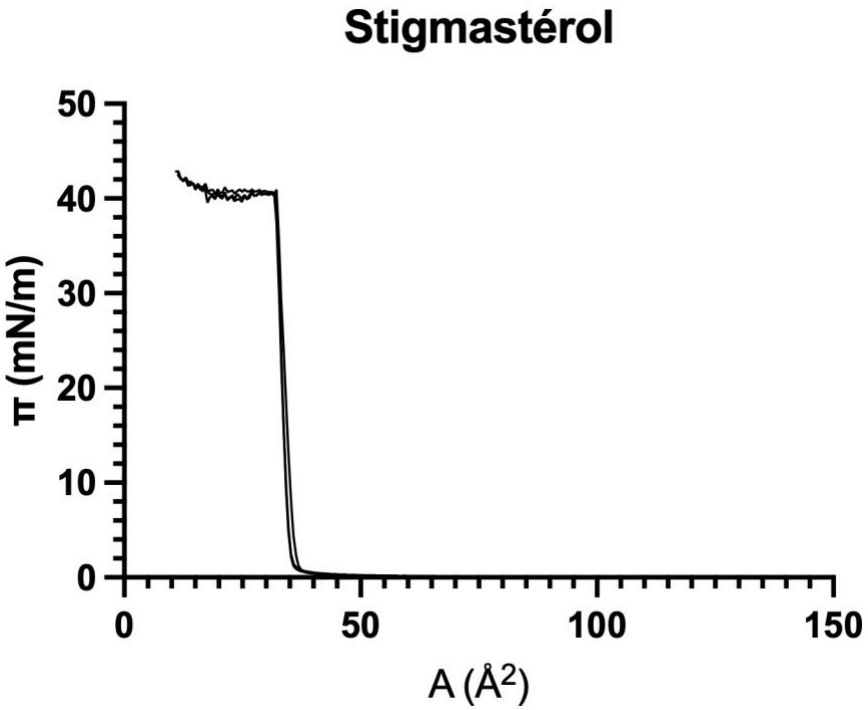
Annexe 2: othermes de compression pour les 3 réplicats d'ergostérol.



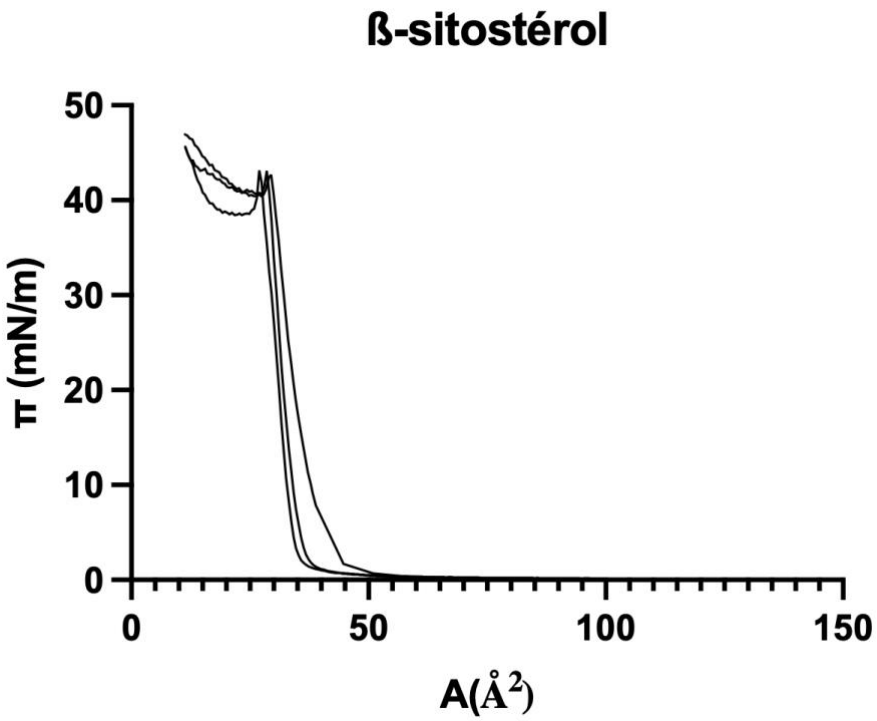
Annexe 3: Isothermes de compression pour les 3 réplicats du campestérol.



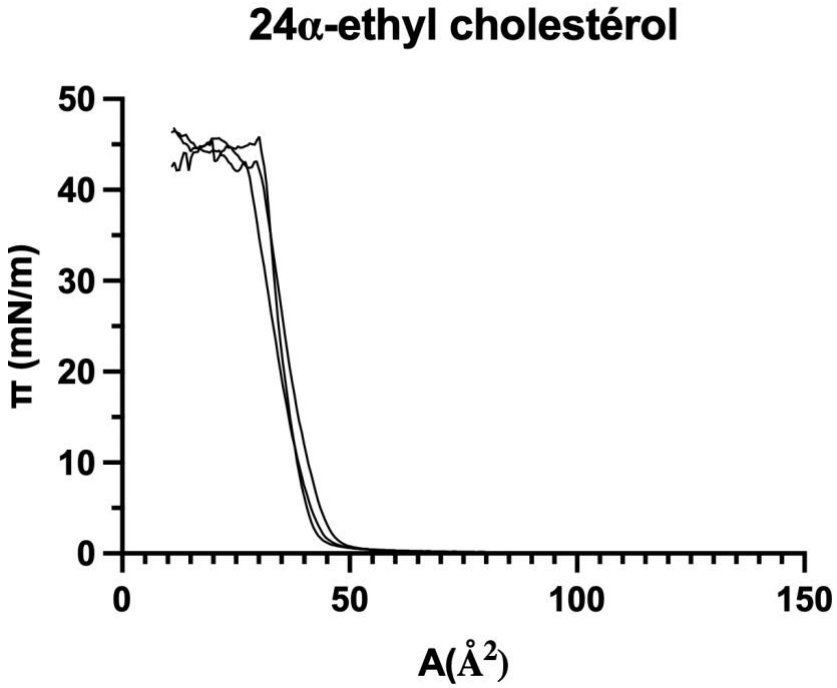
Annexe 4: Isothermes de compression pour les 3 réplicats du stigmastérol.



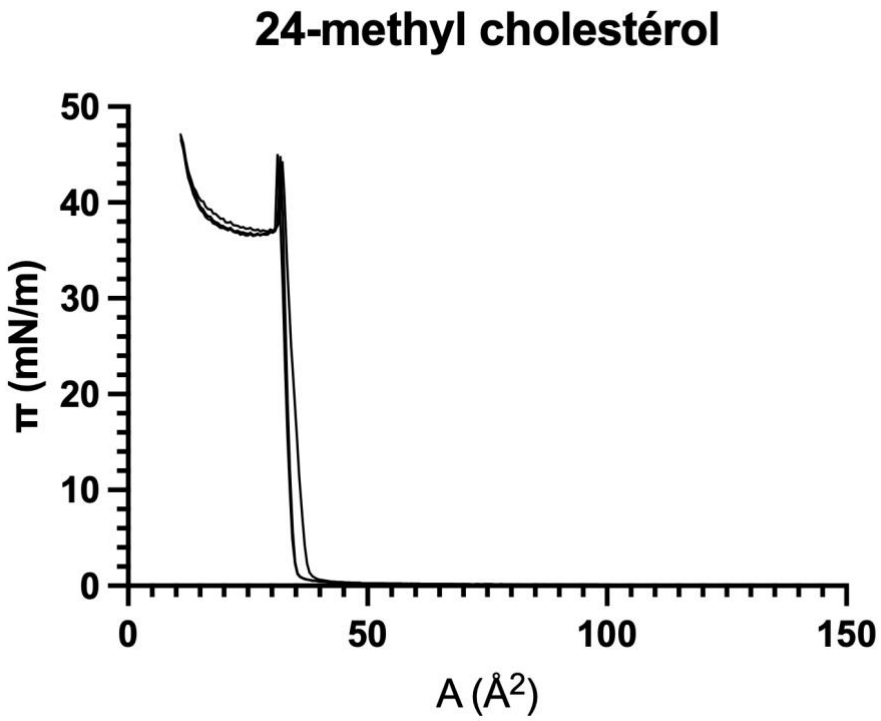
Annexe 5: Isothermes de compression pour les 3 réplicats du ß-sitostérol.



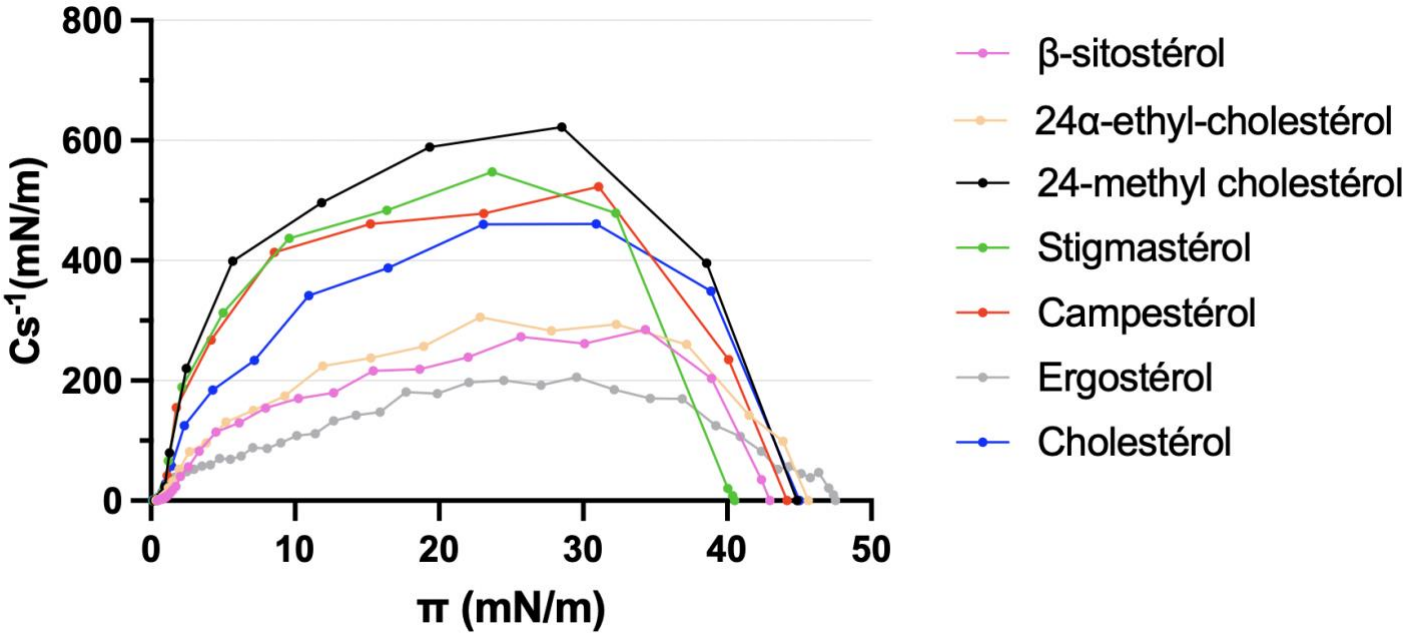
Annexe 6:Isothermes de compression pour les 3 réplicats du 24α-éthyl cholestérol.



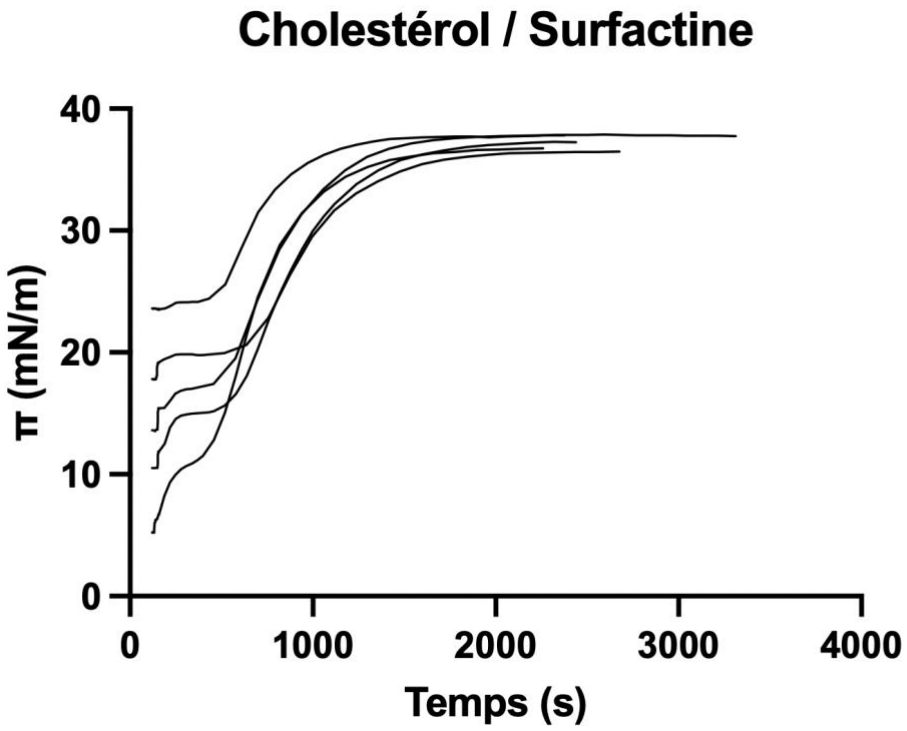
Annexe 7:Isothermes de compression pour les 3 réplicats du 24-méthyl cholestérol.



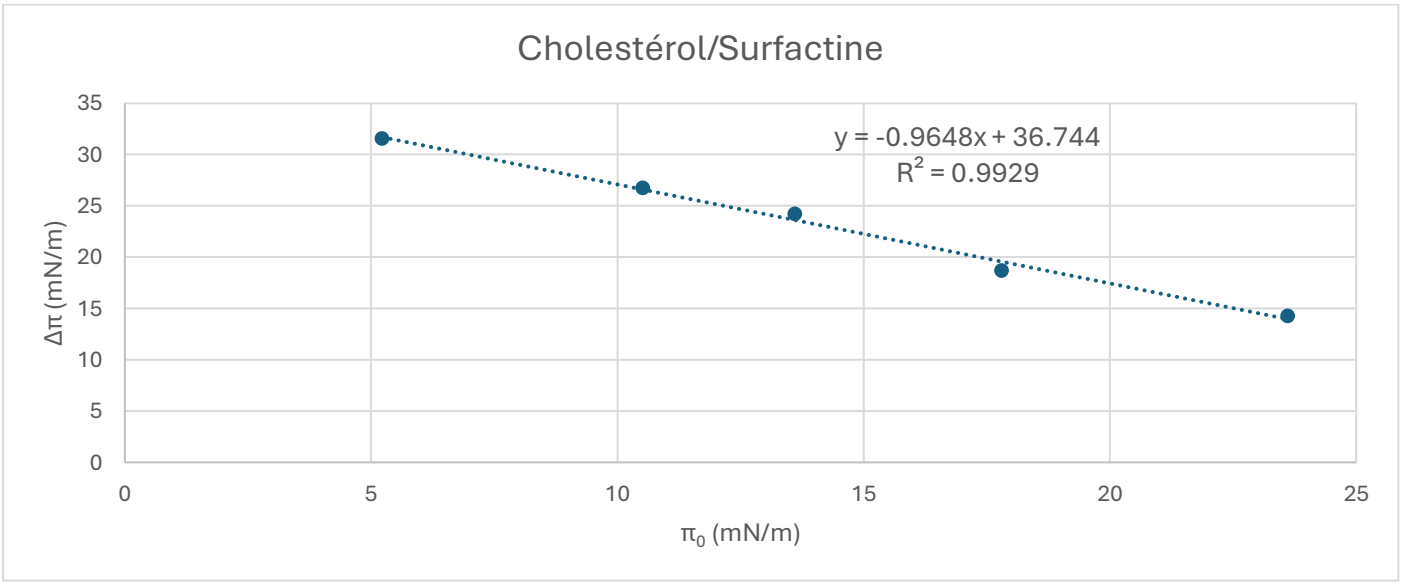
Annexe 8 : Profils de compression des 7 stérols étudiés.



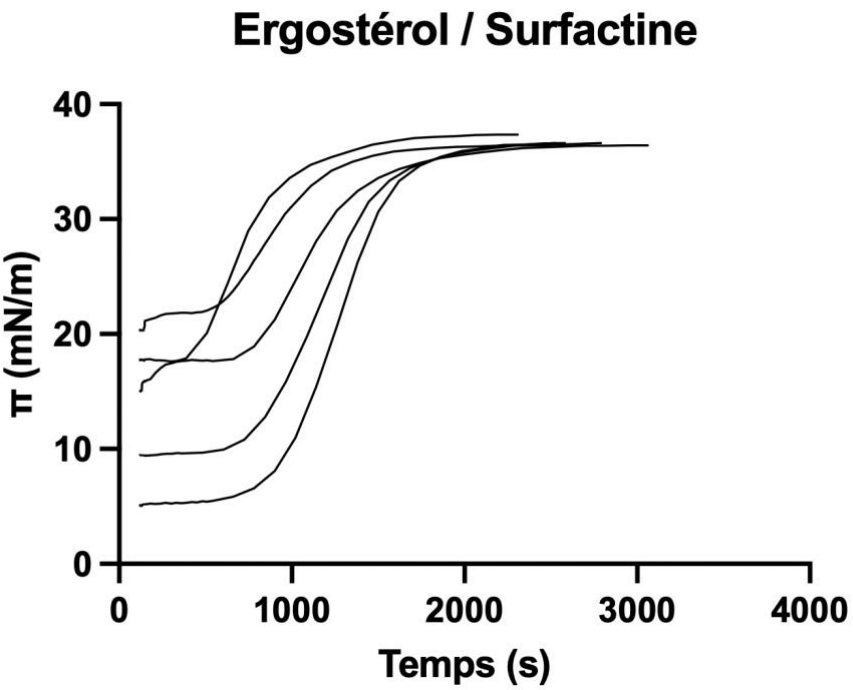
Annexe 9: Cinétiques d'adsorption de la surfactine dans une monocouche de cholestérol.



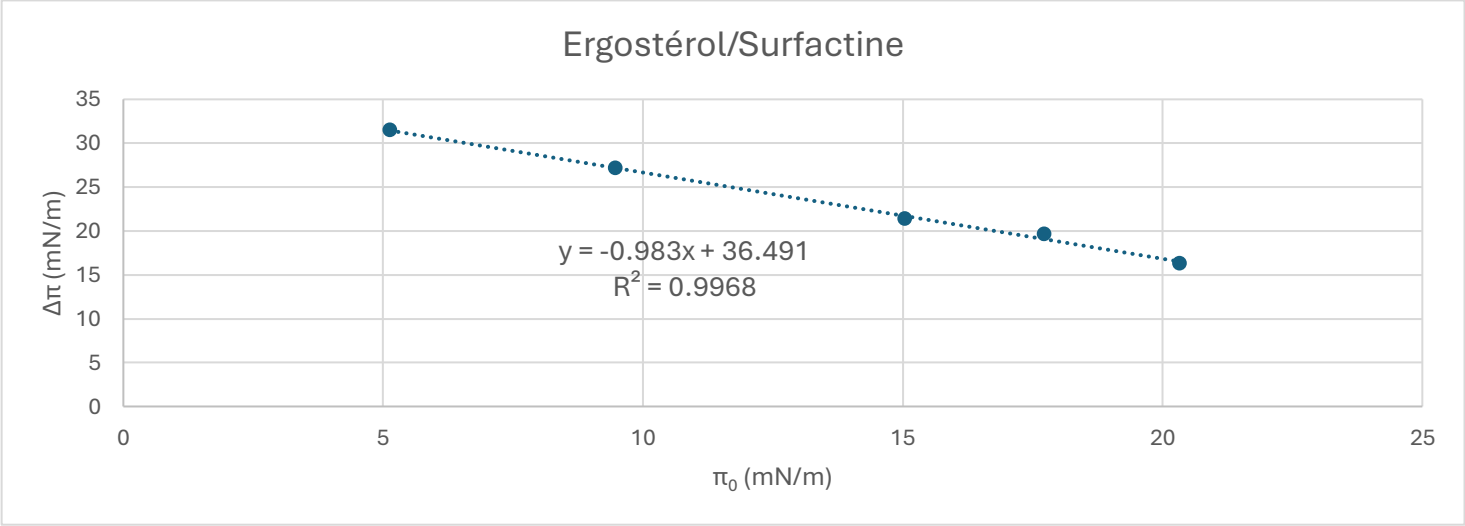
Annexe 10: Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la surfactine sur une monocouche de cholestérol.



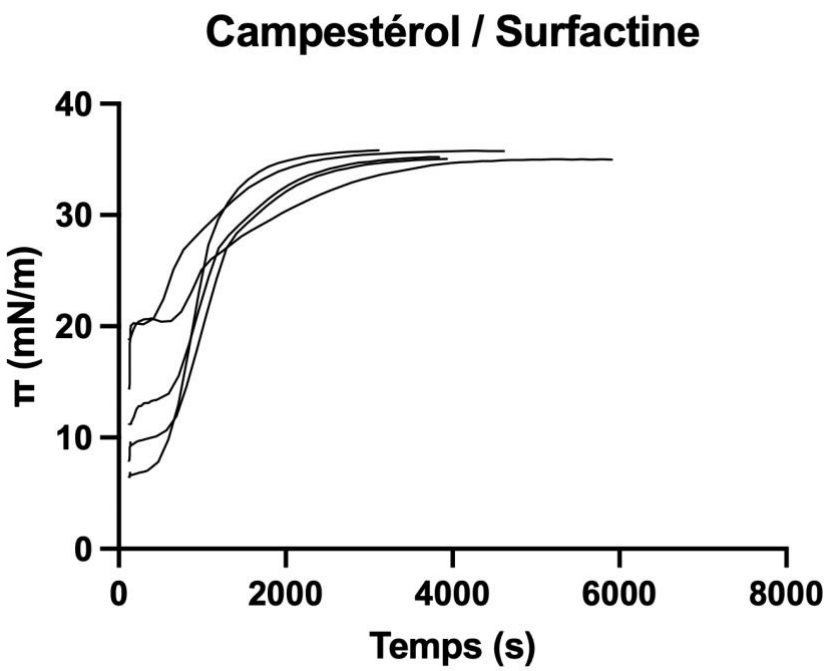
Annexe 11: Cinétiques d'adsorption de la surfactine dans une monocouche d'ergostérol.



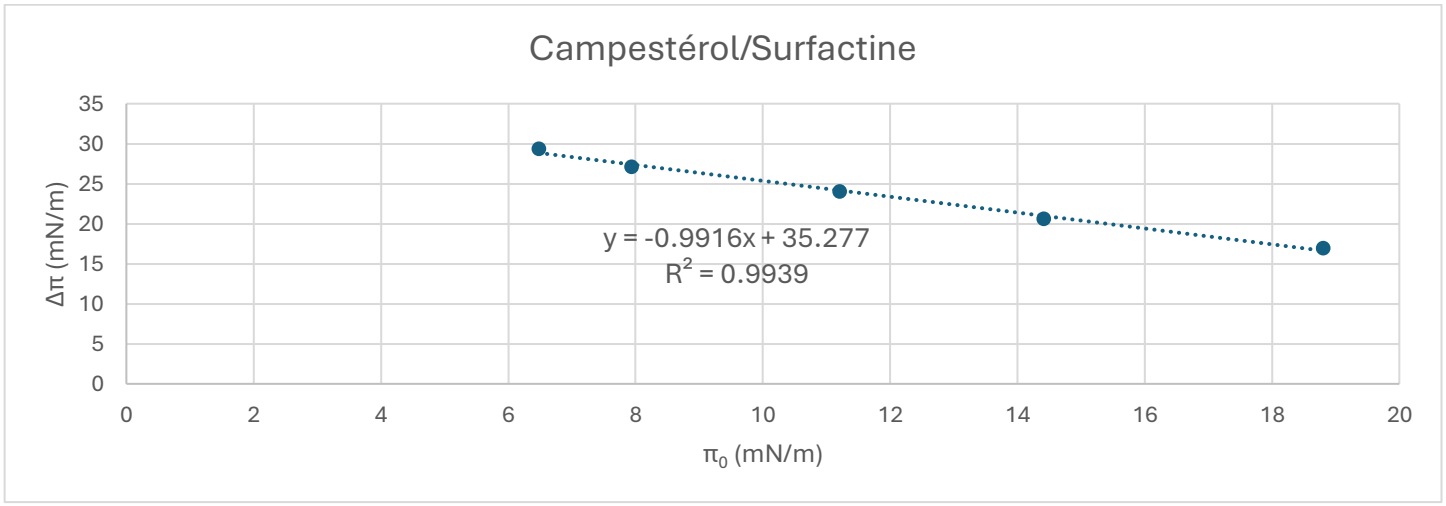
Annexe 12 : Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la surfactine sur une monocouche d'ergostérol.



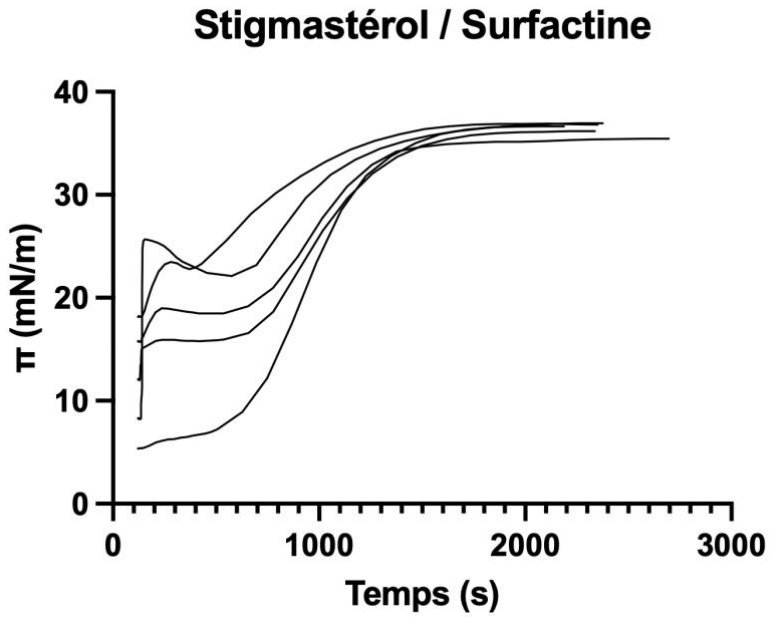
Annexe 13:Cinétiques d'adsorption de la surfactine dans une monocouche de campestérol.



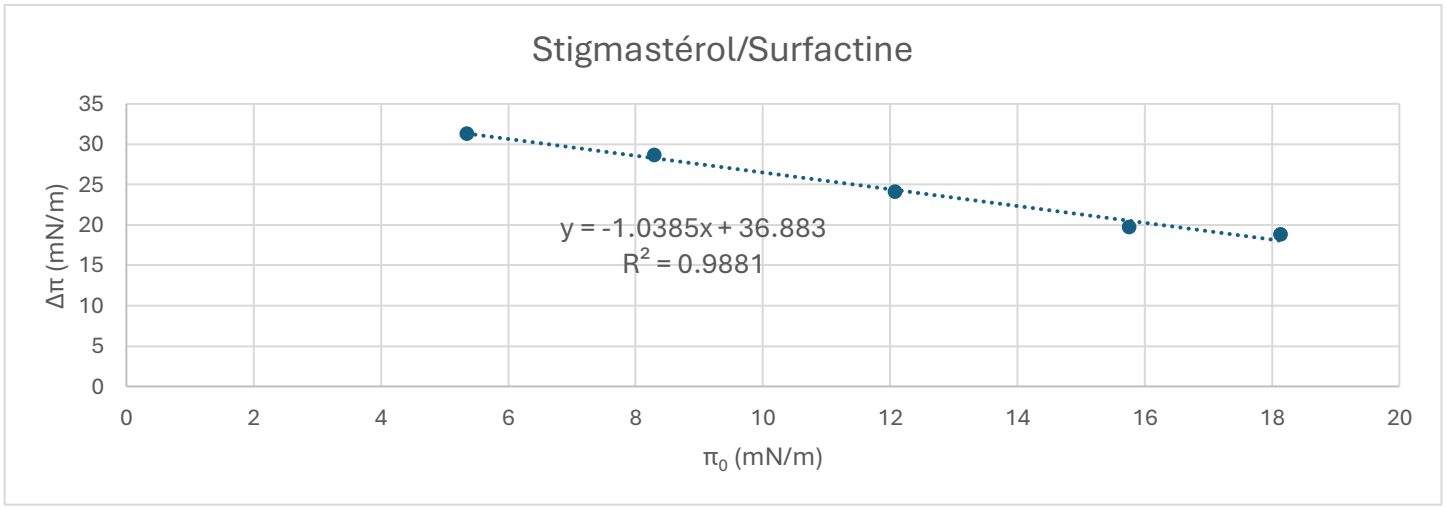
Annexe 14 : Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la surfactine sur une monocouche de campestérol.



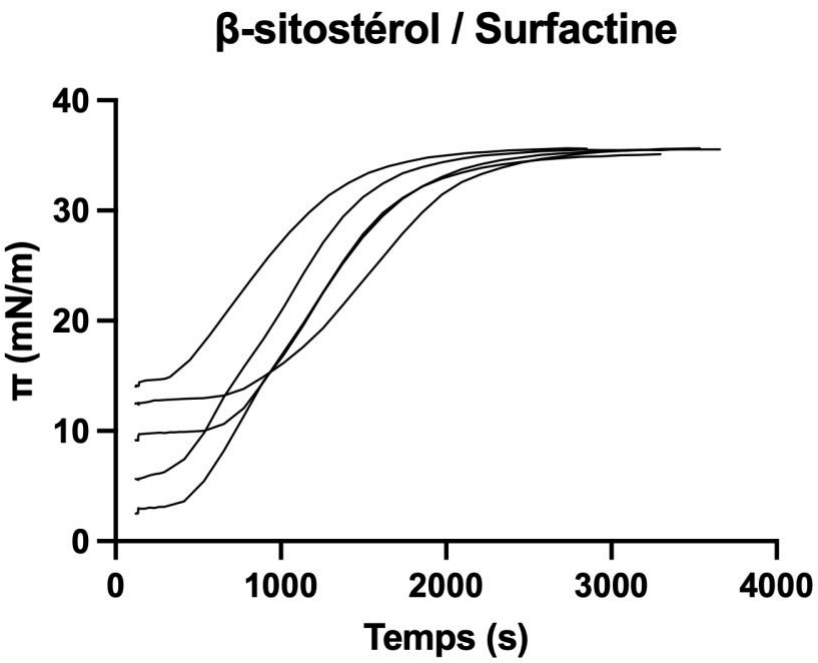
Annexe 15:Cinétiques d'adsorption de la surfactine dans une monocouche de stigmastérol.



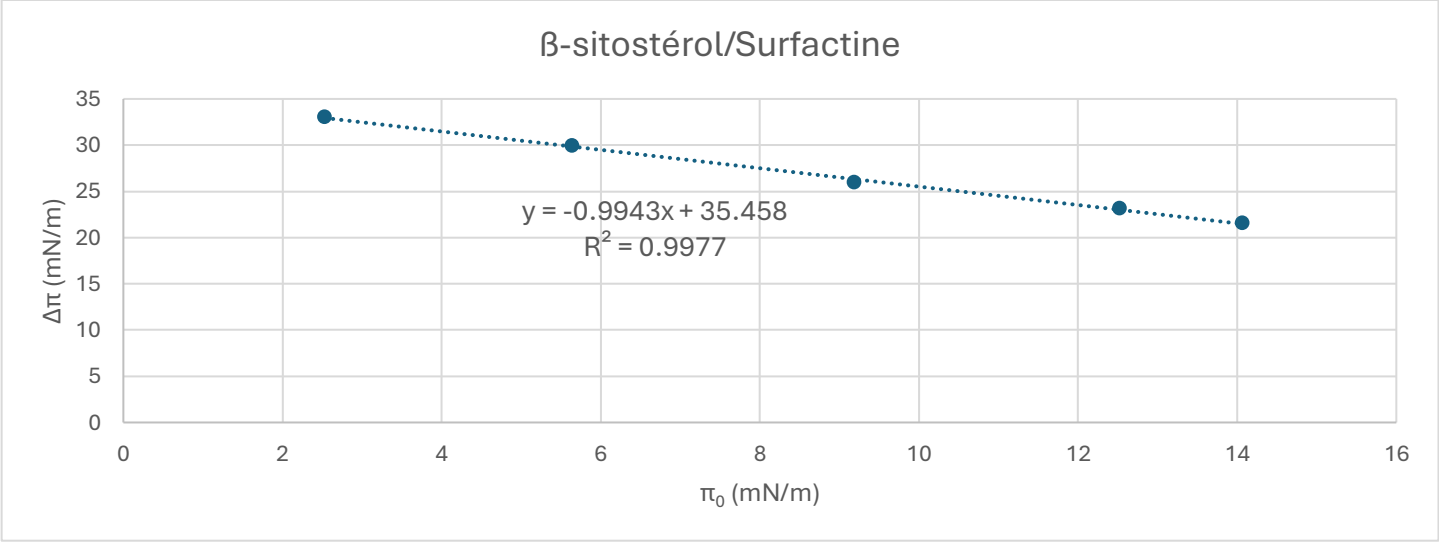
Annexe 16 : Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la surfactine sur une monocouche de stigmastérol.



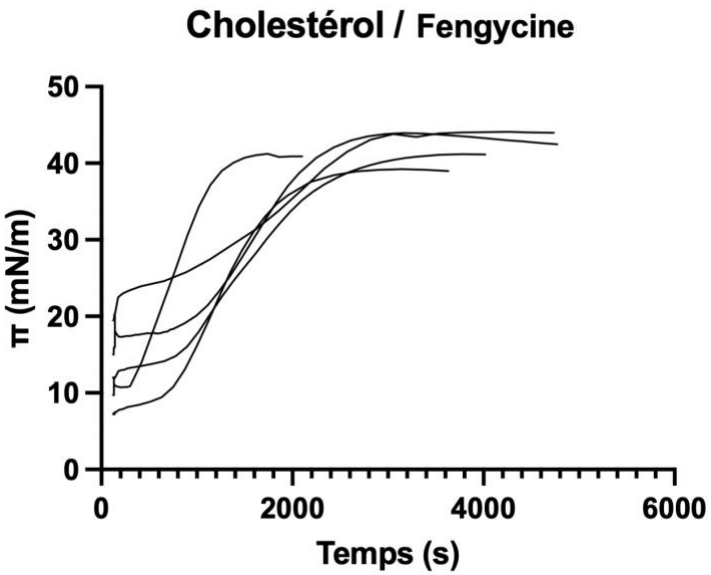
Annexe 17 : Cinétiques d'adsorption de la surfactine dans une monocouche de ß-sitostérol.



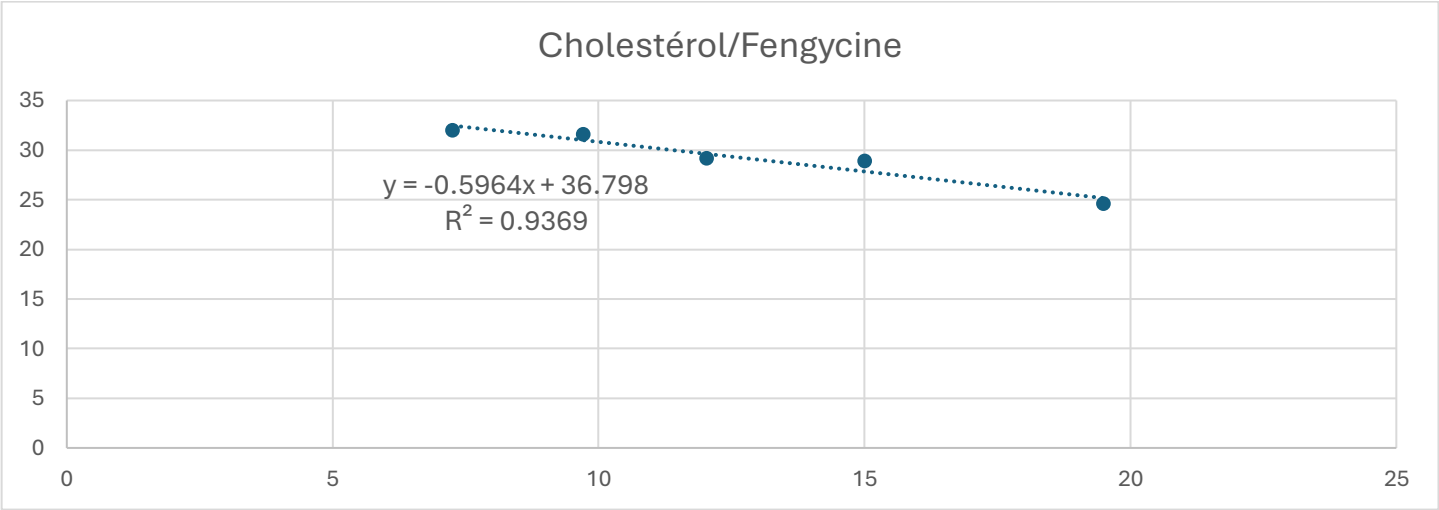
Annexe 18 : Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la surfactine sur une monocouche de ß-sitostérol.



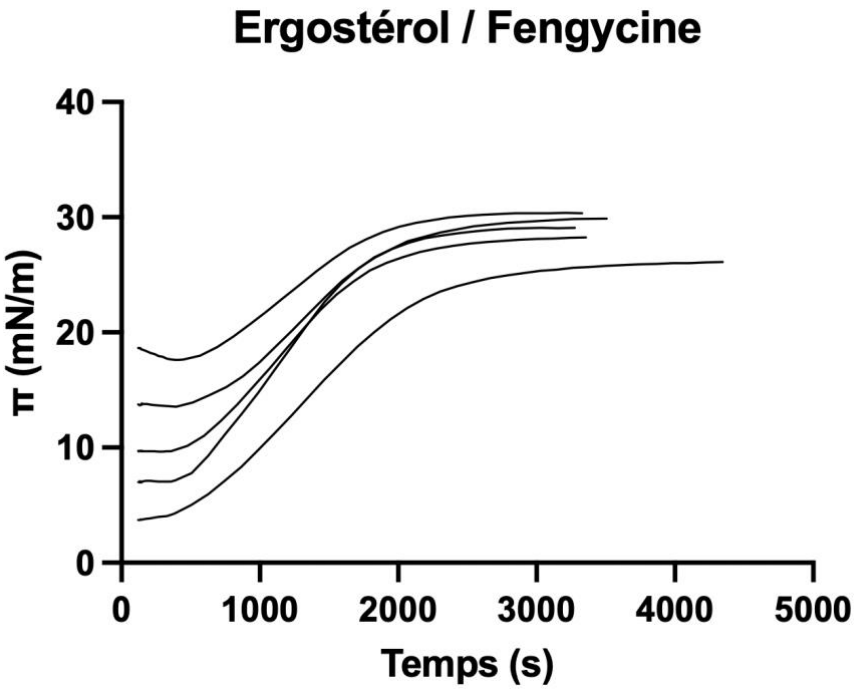
Annexe 19:Cinétiques d'adsorption de la fengycine dans une monocouche de cholestérol.



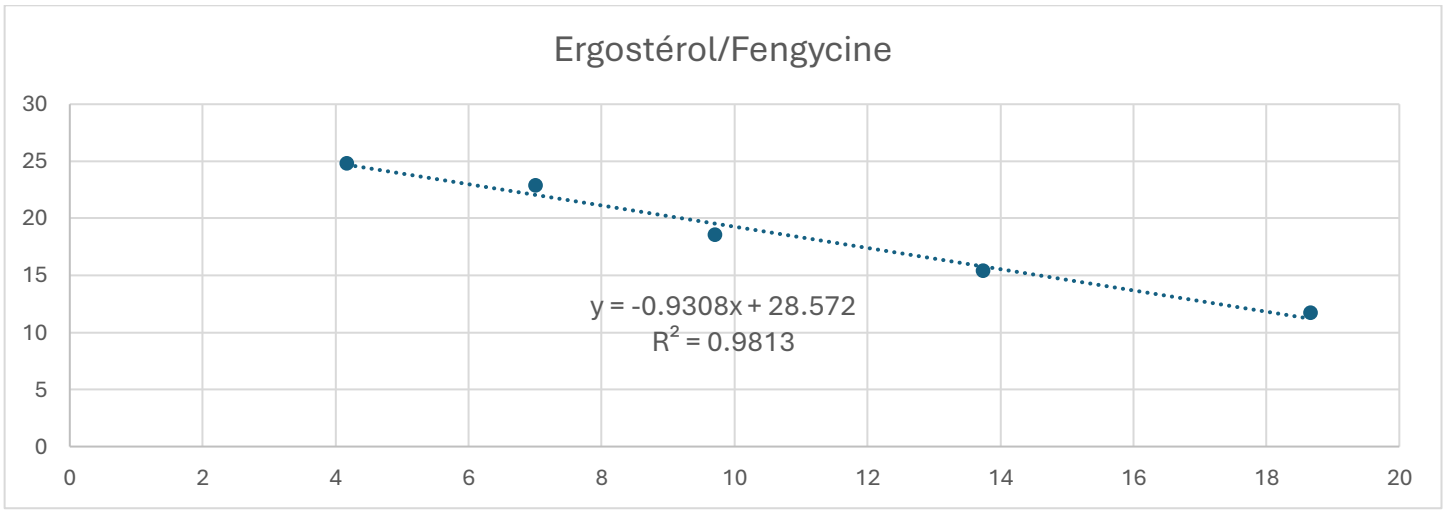
Annexe 20 : Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la fengycine sur une monocouche de cholestérol.



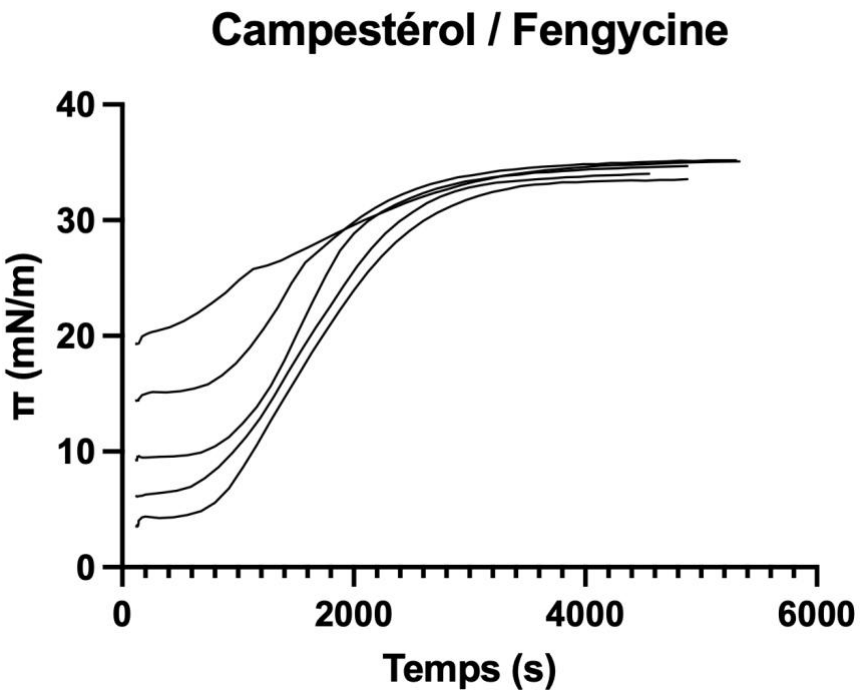
Annexe 21: Cinétiques d'adsorption de la fengycine dans une monocouche d'ergostérol.



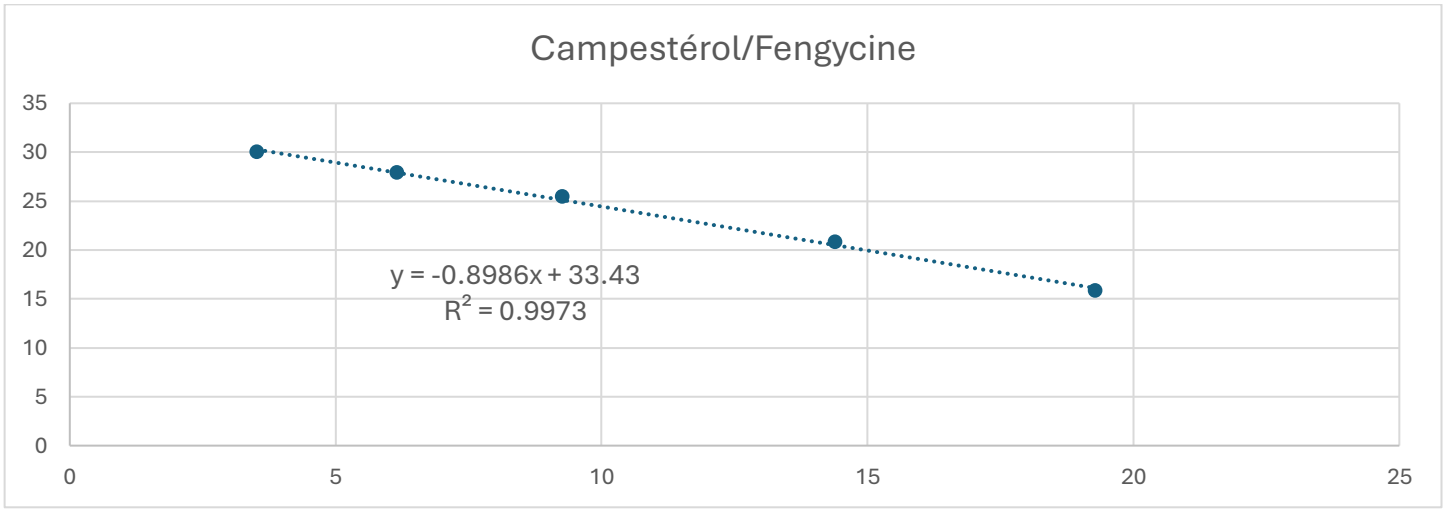
Annexe 22 : Variation de $\Delta\pi$ en fonction de π_0 pour la fengycine sur une monocouche d'ergostérol.



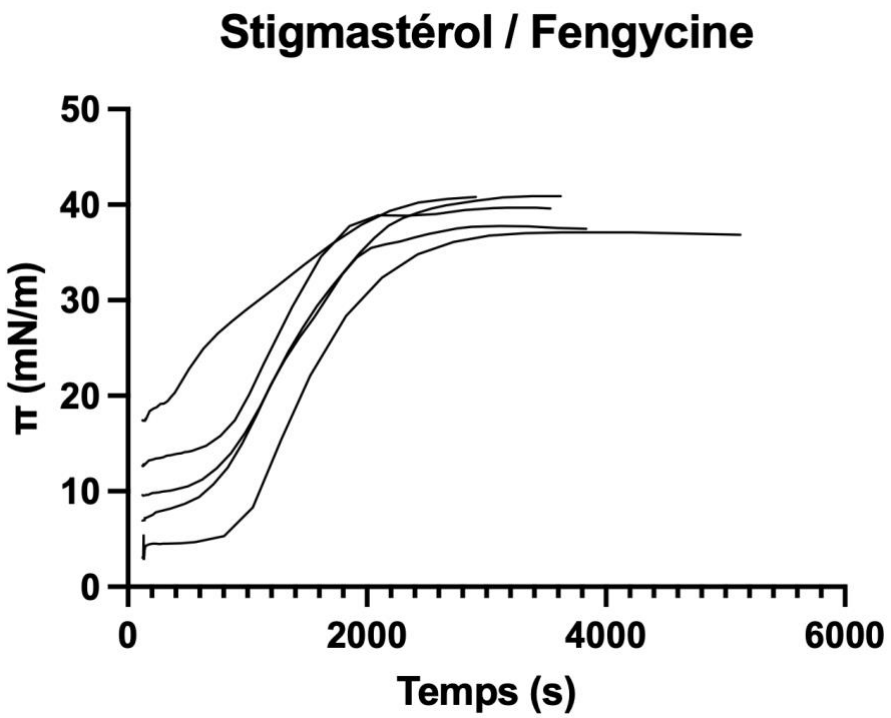
Annexe 23:Cinétiques d'adsorption de la fengycine dans une monocouche de campestérol.



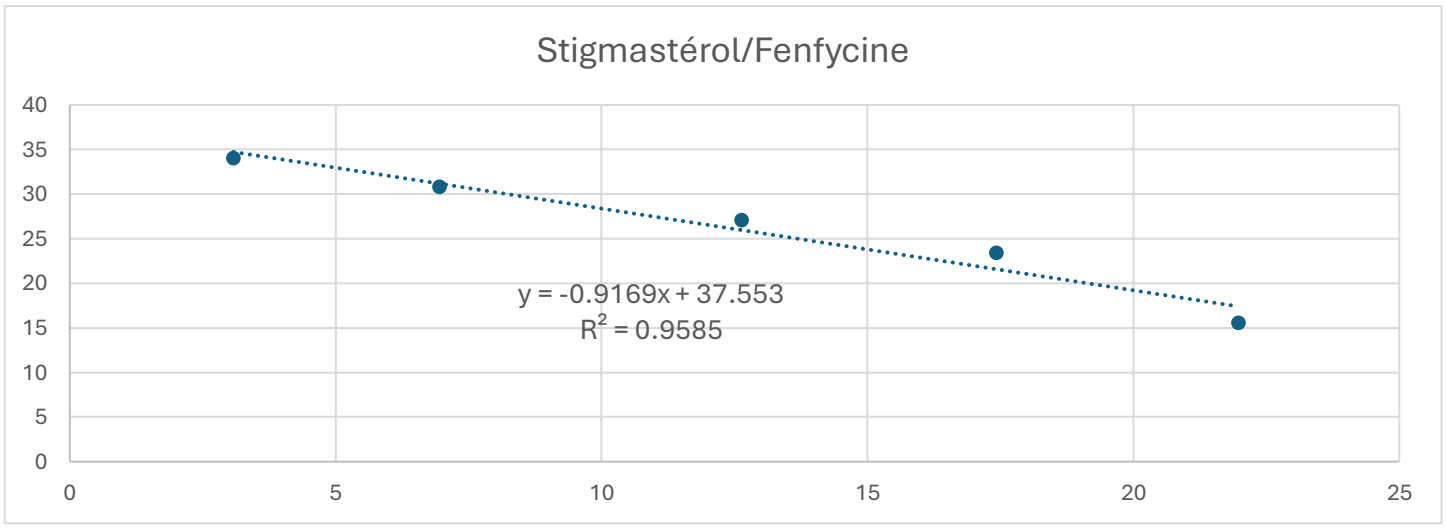
Annexe 24 : Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la fengycine sur une monocouche de campestérol.



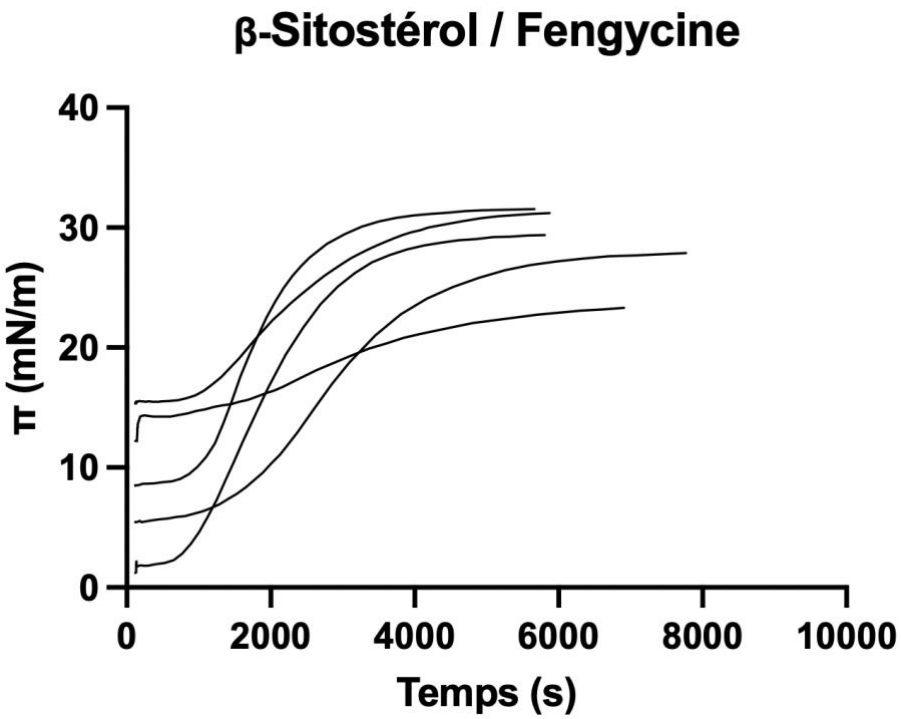
Annexe 25:Cinétiques d'adsorption de la fengycine dans une monocouche de stigmastérol.



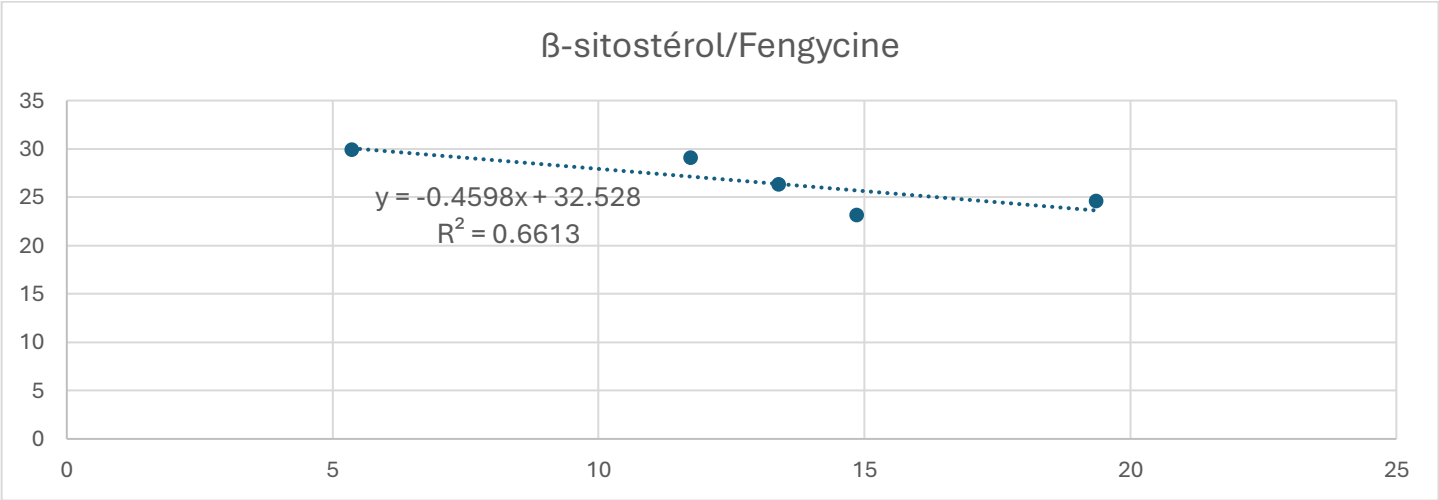
Annexe 26 : Variation de Δπ en fonction de π_0 pour la fengycine sur une monocouche de stigmastérol.



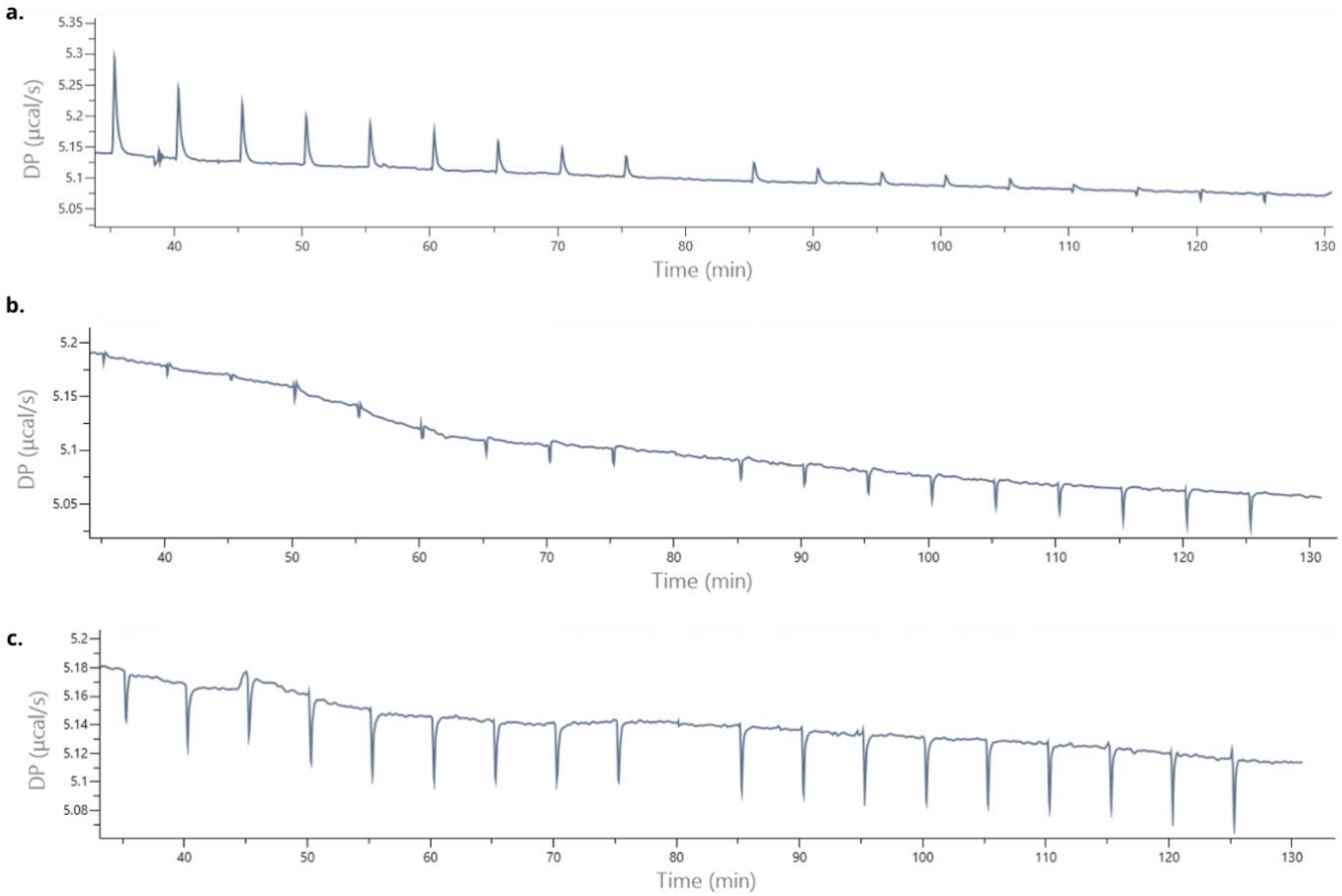
Annexe 27:Cinétiques d'adsorption de la fengycine dans une monocouche de ß-sitostérol.



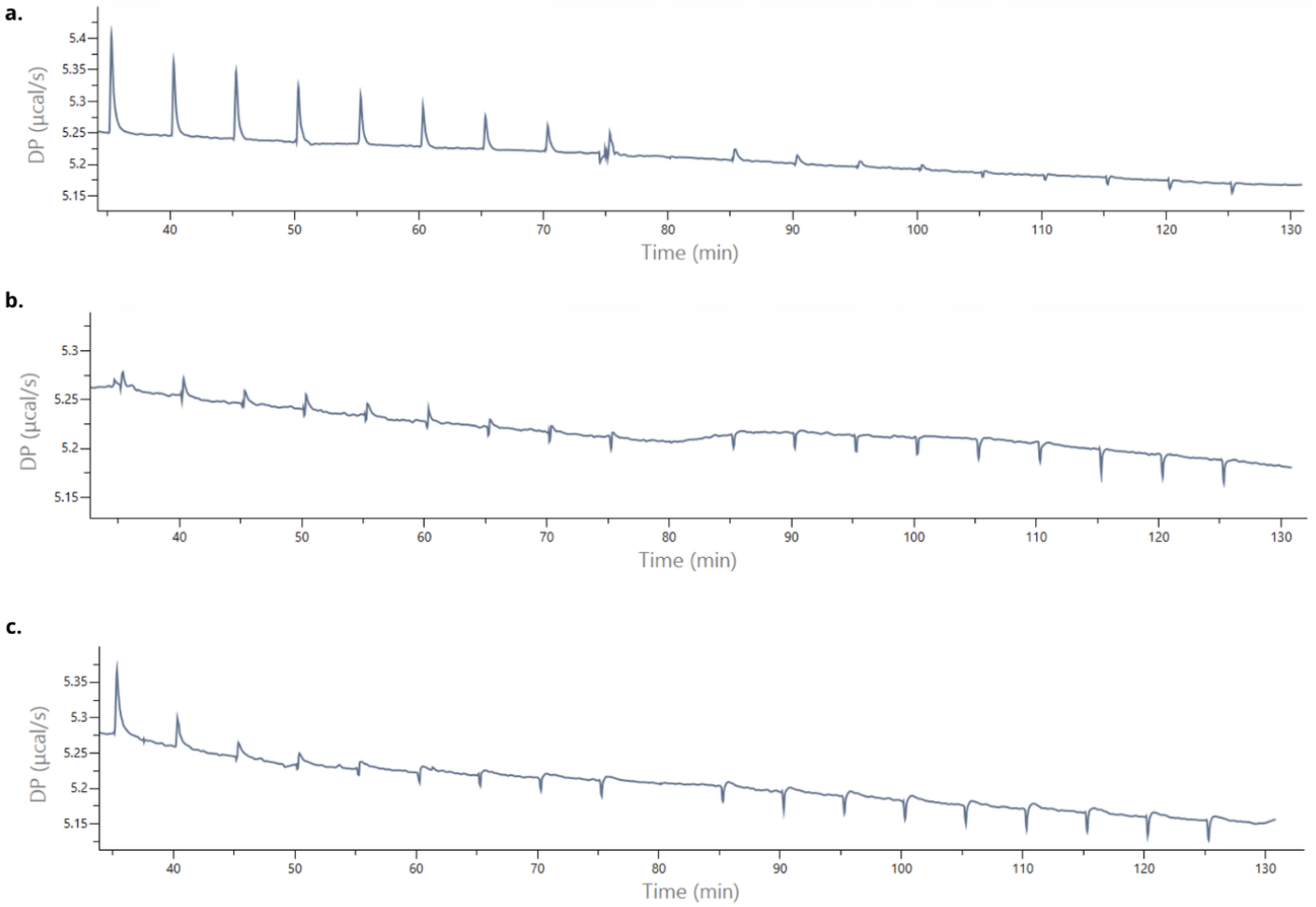
Annexe 28 : Variation de $\Delta\pi$ en fonction de π_0 pour la fengycine sur une monocouche de ß-sitostérol.



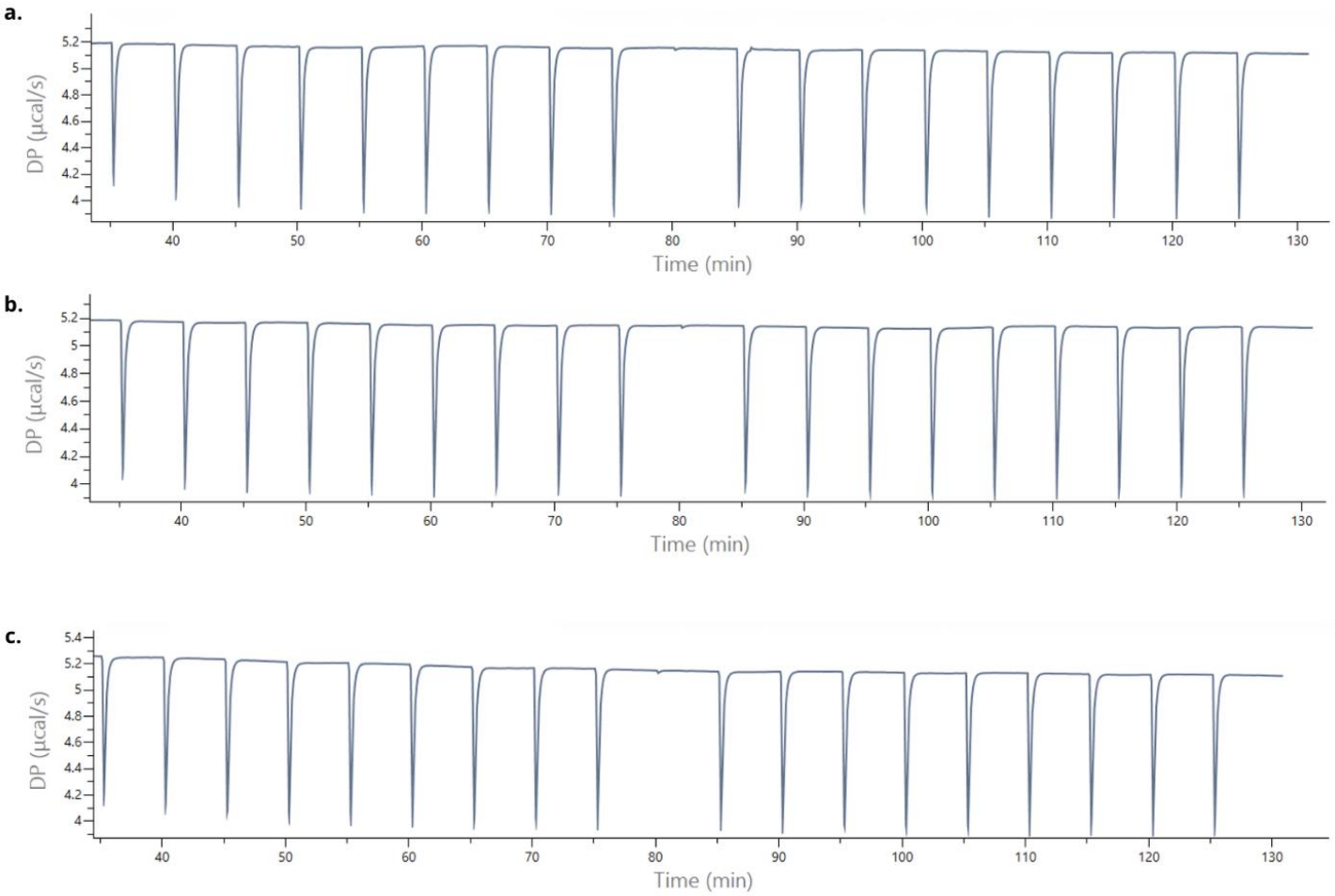
Annexe 29: Thermogrammes ITC de l'interaction de lipopeptides avec des liposomes de POPC/camp. Lors de l'injection de (a) surfactine, (b) fengycine et (c) lichenysine.



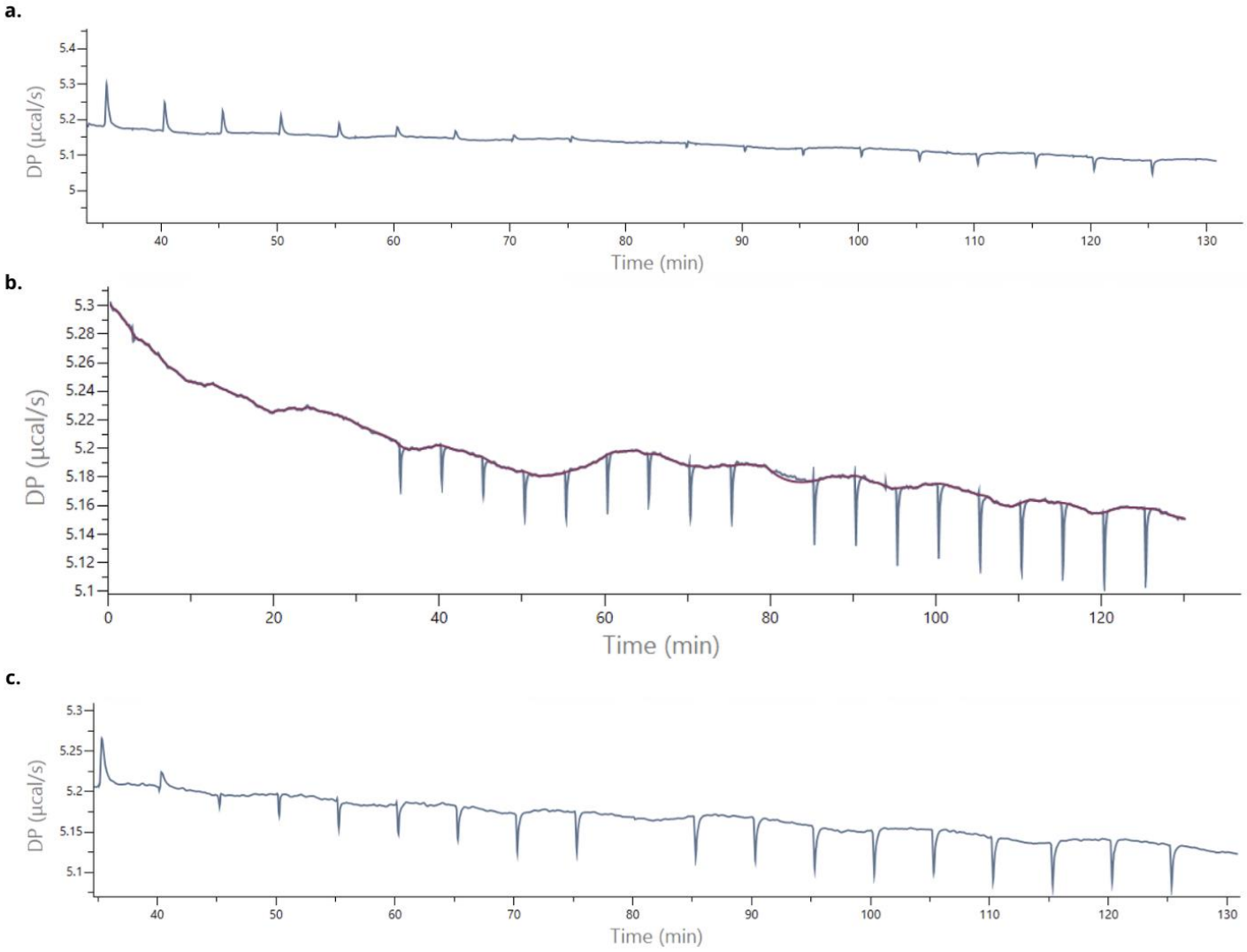
Annexe 30: Thermogrammes ITC de l'interaction de lipopeptides avec des liposomes de POPC/ergo. Lors de l'injection de (a) surfactine, (b) fengycine et (c) lichenysine.



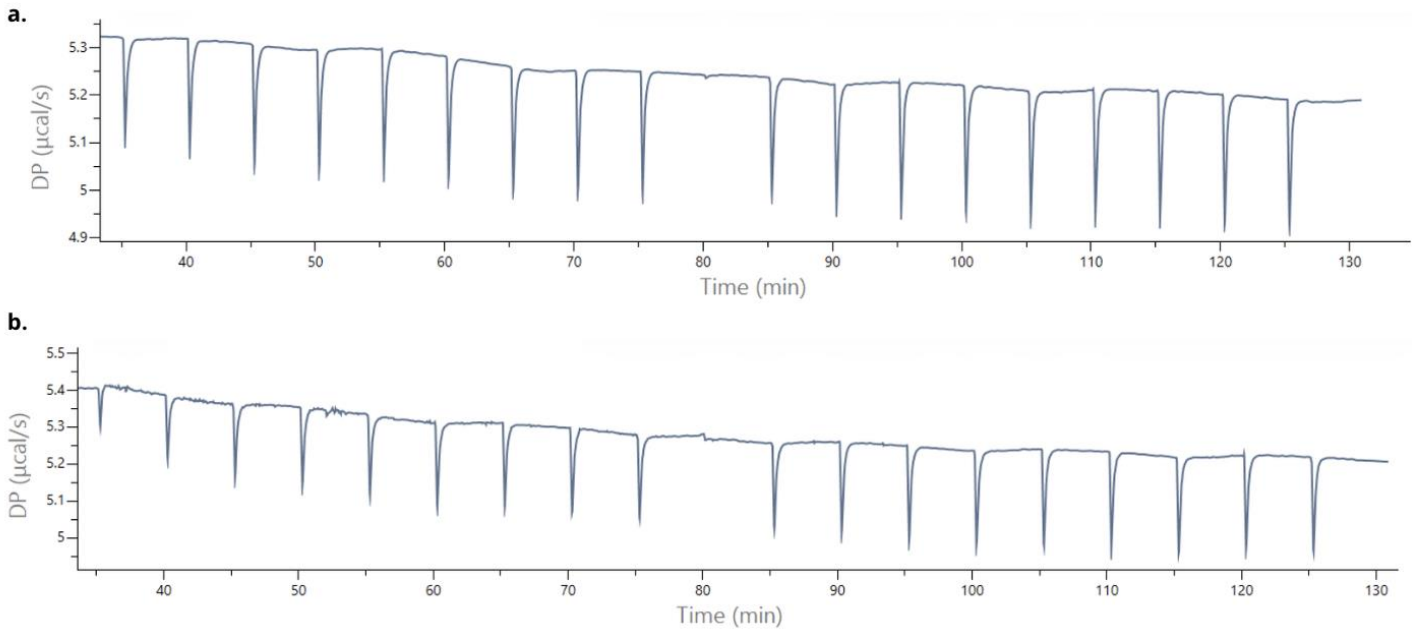
Annexe 31: Thermogrammes ITC de l'interaction de lipopeptides avec des liposomes de POPC. Lors de l'injection de (a) surfactine, (b) fengycine et (c) lichenysine.



Annexe 32: Thermogrammes ITC de l'interaction de lipopeptides avec des liposomes de POPC/sito. Lors de l'injection de (a) surfactine, (b) fengycine et (c) lichenysine.



Annexe 33: Thermogrammes ITC de l'interaction de lipopeptides avec des liposomes de POPC/stigma. Lors de l'injection de (a) surfactine et (b) fengycine.



Annexe 34: Résultats DLS des liposomes avant et après analyse de fluorescence au Laurdan.

	Avant		Surfactine à 20µM		
Système	Diamètre avant (nm)	PDI	D (nm)	PDI	delta d (nm)
POPC	112,8	0,094	114,3	0,129	1,5
POPC/chol	127,2	0,018	126,9	0,173	-0,3
POPC/ergo	122	0,074	108,8000	0,1290	-13,2
POPC/camp	141,9	0,122	116,6	0,214	-25,3
POPC/stigma	137,2	0,08	123,3000	0,2240	-13,9
POPC/ß-sito	143,7	0,084	123,3000	0,2010	-20,4

	Avant		Fengycine à 20µM		
Système	Diamètre avant (nm)	PDI	D (nm)	PDI	delta d (nm)
POPC	112,8	0,094	119,3	0,116	6,5
POPC/chol	127,2	0,018	137,8	0,195	10,6
POPC/ergo	122	0,074	104,9000	0,1040	-17,1
POPC/camp	141,9	0,122	126,9	0,26	-15
POPC/stigma	137,2	0,08	124,2000	0,2050	-13
POPC/ß-sito	143,7	0,084	127,9000	0,1060	-15,8

	Avant		Lichenysine à 20µM		
Système	Diamètre avant (nm)	PDI	D (nm)	PDI	delta d (nm)
POPC/chol	127,2	0,018	137,1	0,199	9,9
POPC/ergo	122	0,074	/	/	/
POPC/camp	141,9	0,122	127,5	0,246	-14,4

POPC/stigma	137,2	0,08	128,1000	0,1950	-9,1
POPC/ß-sito	143,7	0,084	125,9000	0,2290	-17,8

	Contrôle Avant		Contrôle Après		
Système	Diamètre avant (nm)	PDI	D (nm)	PDI	delta d (nm)
POPC	112,8	0,094	118	0,069	5,2
POPC/chol	127,2	0,018	126	0,135	-1,2
POPC/ergo	122	0,074	113	0,07	-9
POPC/camp	141,9	0,122	125,1000	0,2050	-16,8
POPC/stigma	137,2	0,08	117,0000	0,1570	-20,2
POPC/ß-sito	143,7	0,084	116,4000	0,1400	-27,3

9.1 Contribution personnelle

Premièrement, j'ai réalisé une recherche bibliographique approfondie portant sur le rôle du cholestérol, ergostérol, campestérol, stigmastérol et ß-sitostérol dans les membranes biologiques. J'ai également recherché dans la littérature, les propriétés des différents lipopeptides, surfactine, fengycine et lichenysine, et leur effets sur des membranes plasmique.

Sur le plan expérimental, j'ai réalisé des expériences à l'aide d'une balance à film de Langmuir, en mode compression et adsorption. Des expériences de calorimétrie de titration isothermes. Des mesures de fluorescence au Laurdan.

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.