



HAL
open science

Caractérisation physicochimique des membranes cellulaires lors de la cancérogénèse : application à la plasticité cellulaire

Sébastien Ibanez

► **To cite this version:**

Sébastien Ibanez. Caractérisation physicochimique des membranes cellulaires lors de la cancérogénèse : application à la plasticité cellulaire. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1338 . tel-04642676

HAL Id: tel-04642676

<https://theses.hal.science/tel-04642676>

Submitted on 10 Jul 2024

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

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



N°d'ordre NNT :

2021LYSE1338

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole doctorale interdisciplinaire sciences - santé

Spécialité de doctorat : Biochimie du cancer

Soutenue publiquement le 13/12/2021, par :

Sébastien IBANEZ

Caractérisation physicochimique des membranes cellulaires lors de la cancérogénèse : application à la plasticité cellulaire

Devant le jury composé de :

GIRARD-EGROT, Agnès	Professeur – ICBMS, Lyon	Examinatrice
ANDRIEU-ABADIE, Nathalie	Directeur de recherche – CRCT, Toulouse	Rapporteur
ROSSI, Claire	Professeur – GEC, Compiègne	Rapporteur
KLYMCHENKO, Andrey	Directeur de recherche – LBP, Strasbourg	Rapporteur
PICART, Catherine	Professeur – IRIG, Grenoble	Examinatrice
PAYEN-GAY, Léa	Professeur – CICYL, Lyon	Examinatrice
GRANJON, Thierry	Maître de conférence – ICBMS, Lyon	Directeur de thèse
VIGNERON, Arnaud	Maître de conférence – ICBMS, Lyon	Co-directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI



L'ensemble des travaux constituant cette thèse ont été réalisés :

Au sein de l'équipe CO2-GLYCO de l'ICBMS à l'université Claude Bernard Lyon 1, sous la direction du Dr. Thierry GRANJON ainsi qu'au sein de l'équipe Signalisation, métabolisme et progression tumorale au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, sous la direction du Dr. Arnaud VIGNERON

Chimie Organique 2-Glycochimie
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires

UMR 5249 Université Lyon 1 / CNRS

Bâtiment Lederer

1 rue Victor Grignard

69100 Villeurbanne – France



Signalisation, métabolisme et progression tumorale

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

UMR INSERM 1052 CNRS 5286

28 rue Laennec

69008 Lyon France



Au sein de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé



**ÉCOLE
DOCTORALE**

205

EDISS
INTERDISCIPLINAIRE
SCIENCES- SANTÉ
UNIVERSITÉ DE LYON

« Il nous faut nous rappeler que ce que nous observons, ce n'est pas la Nature en soi, mais la Nature exposée à notre méthode d'investigation. »

Werner Heisenberg

REMERCIEMENT



Je tiens d'abord à remercier les trois rapporteurs : la Pr Claire ROSSI, la Dr Nathalie Andrieu-Abadie et le Dr Andrey KLYMCHENKO, pour avoir accepté et pris du temps à juger mon travail de ces trois années de thèse. J'aimerais aussi remercier les autres membres du jury : la Pr Catherine PICART, la Pr Agnès GIRARD-EGROT et la Pr Léa PAYEN, pour votre présence lors de ma soutenance de thèse et votre participation à son évaluation.

Je remercie chaleureusement le Dr Thierry GRANJON et le Dr Arnaud VIGNERON pour votre confiance et la liberté que vous m'avez laissé. Je tiens également à vous remercier sur la qualité de ma formation et votre pédagogie durant ces trois ans. Tout particulièrement pour le temps pris sur des notions conceptuelles en cancérologie qui ne m'était pas familier au vu de ma formation d'origine. J'ai aimé durant ces trois ans baigner dans le milieu de la biochimie et de la biologie, renforçant en moi l'idée que l'intégration de différents domaines scientifiques est nécessaire pour la compréhension des mécanismes du vivant.

Je remercie également les différentes personnes des équipes avec qui j'ai pu travailler. Je commencerai par les directeurs d'équipes, le Pr Alain PUISIEUX pour avoir accepté de me laisser manipuler au sein de son équipe (EMT et plasticité cellulaire), mais aussi le Pr Loïc BLUM (GEMBAS).

Je remercie l'ensemble de l'équipe GEMBAS et notamment la Pr Agnès GIRARD-EGROT et la Dr Ofélia MANITI pour leurs soutiens expérimentaux et privés ainsi que pour les échanges de réflexions scientifiques que nous avons pu avoir durant ces trois ans.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe EMT et plasticité cellulaire, tout particulièrement Freddie et Cricri qui ont été d'un soutien technique sans faille durant ces trois ans, et qui le sont restées malgré les remaniements d'équipes. Je remercie bien évidemment la Dr Samia RUBY, pour les échanges professionnels et son aide sur l'expérimentation in vivo, mais aussi pour les discussions de la vie quotidienne qui m'a permis de sortir mon esprit hors de la thèse de temps en temps.

Je remercie l'équipe LCO2-GLYCO pour leurs aides sur la compréhension des notions de chimie. Tout particulièrement le Dr David GUEYRARD et le Pr Peter GOEKJIAN qui ont toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Je remercie également le corps d'enseignant qui m'a permis d'exercer une activité pédagogique durant ma thèse. Je pense notamment aux Drs Leyre BRIZUELA-MADRID, Dr Sébastien VILOLOT, Dr Bastien DOUMECHÉ et Dr Alexandre NOIRIEL.

Je remercie tous les étudiants, thésards et postdoctorants pour les moments professionnels, mais aussi ceux et celles passés dans un contexte hors professionnel. J'ai particulièrement une pensée pour Julien, Chloé, Thomas, Milène, Leith, Hadrien, Gaël, Noémie, Rhama, Maxime, Simon, Himaïji, Pauline, Lauriane, Enzo et Clara.

J'aimerais dire un énorme remerciement à ma famille, tout particulièrement mes parents et ma sœur qui ont toujours été présents pour me soutenir et qui ont toujours cru en moi. Si j'ai pu m'épanouir dans le travail et la recherche, c'est grâce à la sérénité que m'apporte ma famille.

De la même manière, j'aimerais aussi remercier mes amis qui ont eu la même importance pour mon épanouissement. Mes pensées vont à Rémi, Fleur, JF, Johann, Maximax, Julian, Thomas, Aurore, Philou, Do, Alexis et j'ai une pensée particulière pour Zach qui avait la patience de m'écouter parler de science pendant nos séances de sport.

Enfin le meilleur pour la fin. Toutes mes pensées et mon cœur vont pour Virginia qui m'a permis d'obtenir une stabilité que je n'aurais jamais eue sans elle. Tu as toujours été là et d'un soutien indéniable tout au long de cette thèse et je n'aurais jamais assez de mots pour te remercier.

TABLE DES MATIÈRES



Introduction

A. Cancer

1. Causes et principes de l'initiation tumorale _____ p8
2. Développement macroscopique et hétérogénéité tumorale _____ p11
 - a) Hétérogénéité intertumorale _____ p14
 - b) Hétérogénéité intratumorale _____ p16
3. Perte d'identité cellulaire et plasticité, support du développement tumoral _____ p19
4. La transition épithélio-mésenchymateuse perturbatrice majeure de l'identité épithéliale _____ p21
5. Métabolisme associé à l'acquisition d'un phénotype au caractère souche _____ p31

B. Membrane cellulaire, métabolisme lipidique et plasticité cellulaire

1. Généralité _____ p37
2. Structure des lipides et membrane _____ p39
 - a) Les Acides Gras _____ p39
 - b) Les Glycérides et Glycérophospholipides _____ p40
 - c) Les Sphingolipides _____ p42
 - d) Le Cholestérol _____ p43
 - e) Les membranes _____ p44
3. Modulation du métabolisme lipidique dans un contexte tumoral _____ p47
 - a) Adaptation du métabolisme lipidique lors de la croissance tumorale _____ p47
 - b) Métabolisme lipidique associé à la plasticité cellulaire _____ p48
4. Technique de mesure des propriétés biophysiques des membranes _____ p54
 - a) Résonance paramagnétique électronique _____ p55
 - b) Microscopie à force atomique _____ p55
 - c) Redistribution de fluorescence après photoblanchiment _____ p55
 - d) Spectroscopie par corrélation de fluorescence _____ p56
 - e) Suivi de particule unique _____ p56
5. Fluidité membranaire, Fluorescence et Solvatochromisme _____ p56

C. Objectif de thèse _____ p62

Résultats

Résultat n°1 : Caractérisation de la sonde Dioll _____ p63

Résultat n°2 : Suivi de la plasticité cellulaire par mesure de la fluidité _____ p97

Résultat contributeur n°1 : DiphénylPhosphate (DPP) modulateur du métabolisme lipidique	p126
Résultat contributeur n°2 : Dosage lipidique des membranes par marquage au Dioll	p149
Discussion	p159
Conclusion	p178
Bibliographie	p179

TABLE DES ILLUSTRATIONS



<i>Figure 1 : Schéma représentatif des « Cancer Hallmarks »</i>	8
<i>Figure 2 : Histologie du tissu mammaire</i>	12
<i>Figure 3: Hiérarchie mammaire dans un tissu sain</i>	13
<i>Figure 4 : Probables origines des différents sous-groupes des cancers mammaires</i>	16
<i>Figure 5 : La dynamique phénotypique permettant l'acquisition d'un phénotype CCDD</i>	19
<i>Figure 6: Le continuum de l'EMT corrélé à la plasticité cellulaire</i>	22
<i>Figure 7: Facteurs solubles et leur voie de signalisation participant à l'induction du programme de l'EMT par l'activation des gènes des EMT-TF lors du développement tumoral</i>	23
<i>Figure 8 : Structure des différentes classes lipidiques</i>	39
<i>Figure 9 : Voies de synthèse des acides gras de novo, mais aussi à partir des lipides essentiels retrouvés dans l'alimentation</i>	40
<i>Figure 10 : Voies de synthèses des différentes classes de phospholipides ainsi que les lipides neutres</i>	42
<i>Figure 11 : Voies de synthèse des sphingolipides</i>	43
<i>Figure 12 : Répartition asymétrique des lipides entre le feuillet interne de la membrane plasmique et le feuillet externe</i>	44
<i>Figure 13 : Répartition des phases lipidiques ordonnées ou désordonnées en fonction de la température</i>	45
<i>Figure 14 : Effet du cholestérol sur la membrane</i>	46
<i>Figure 15 : Effet de la tête polaire et des lysophospholipides sur la courbure membranaire</i>	47
<i>Figure 16 : Mécanismes anti- ou pro-ferroptoses et les molécules les inhibant</i>	54
<i>Figure 17 : Diagramme de Jablonski simplifié</i>	57
<i>Figure 18 : Mécanisme de fluorescence ratiométrique du Laurdan</i>	58

ABRÉVIATION

AA : Acide arachidonique	HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2
ACSL4 : Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4	HIF : Hypoxia Inducible Factor
ADN : Acide désoxyribonucléique	HMGCR : 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase
AFM : Atomic force microscopy	iPS : Induces pluripotent stem cell
AG : Acide Gras	KEAP1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor	KDM : JmJC-containing Lysine demethylases
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase	HMOX : Heme Oxygenase
ATP : Adénosine triphosphate	LFS : Li-Fraumeni Syndrome
BH4 : Tétrahydrobioptérides	LXR : Liver X receptor
BRAC1 : Breast Cancer	M β CD : Méthyl- β -cyclodextrine
CAF : Cancer associated fibroblast	MAG : Monoacylglycérol
CCDD : Cellule cancéreuse dynamiquement dédifférenciée	MUFA : monounsaturated fatty acid
CoQ ₁₀ : Coenzyme Q10	NQO1 : NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
CTC : Cellule tumorale circulante	NRF2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
DAG : Diacylglycérol	OIS : Oncogene-induced cellular senescence
DHA : Acide docosahexénoïque	OSM : Oncostatine M
DPP : Diphénylphosphate	OXPHOS : Phosphorylation oxydative
EMT : Epithelial-mesenchymal transition	PC : Phosphatidylcholine
EPR : Electron paramagnetic resonance	PE : Phosphophatidyléthanolamine
ER : Estrogen receptor	PGE2 : Prostaglandine E2
EV : Extracellular vesicles	PR : Progesterone receptor
FADS : Fatty acids desaturases	PS : Phosphatidylsérine
FBP1 : Fructose-1.6-biphosphatase	PUFA : <i>polyunsaturated fatty acid</i>
FCS : Fluorescence correlation spectroscopy	PI3KC : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic 1
FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching	PI : Phosphatidylinositol
FSP1 : Ferroptosis suppressor protein 1	RE : Réticulum endoplasmique
FTL : Ferritin Light Chain	ROS : Reactive oxygen species
FTH : Ferritin Heavy Chain 1	SCD : Stearoyl-CoA desaturases
GP : Generalized Polarisation	SPT : <i>Single-Particle Tracking</i>
GPL : glycérophospholipide	TAG : Triacylglycérol
GPX4 : Glutathione peroxidase 4	TF : Transcription factor
GUV : Giant unilamellar vesicle	TGF β : Transforming growth factor beta
H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène	Tm : Melting temperature
HAT : Histones acetyltransferase	TPP : Triphénylphosphate
	UPR : Unfolded protein response

INTRODUCTION

A. Cancer

1. Causes et principes de l'initiation tumorale

Le cancer, avec environ 10 millions de morts par an, est l'une des premières causes de décès dans le monde ce qui fait de cette maladie un problème de santé publique majeur, tant dans les pays développés que ceux en voie de développement¹. La tumorigenèse peut toucher l'ensemble des cellules de l'organisme que ce soit au sein d'un tissu épithélial (carcinome), d'un tissu conjonctif (sarcome), ou encore les cellules liées au système hématopoïétique (leucémie et lymphome). La majorité des cancers chez l'adulte proviennent des tissus épithéliaux qui comme nous le reverrons ensuite présentent le plus grand risque d'altérations génétiques en raison du fort taux de division des cellules les constituant. En effet, l'une de leurs caractéristiques est notamment un renouvellement tissulaire élevé, l'épithélium intestinal se renouvelant par exemple totalement en 5 jours. De plus ces tissus sont fortement exposés aux agressions extérieures, qui peuvent avoir des effets génotoxiques et/ou épigénétiques directs sur les cellules. Les benzopyrènes par exemple, molécules retrouvées dans la fumée de cigarette ou dans notre alimentation présentent de tels effets, tandis que les réponses inflammatoires lors du processus de cicatrisation peuvent les induire de façon indirecte^{2,3,4}. La première étape du processus tumorigénique se définit par la transformation néoplasique d'une cellule saine, c'est-à-dire un mécanisme permettant l'obtention d'un phénotype caractéristique d'une cellule cancéreuse. Ce phénotype se traduit notamment par l'acquisition d'une prolifération cellulaire élevée, indépendante de la présence de facteurs de croissance et associée à une morphologie et un métabolisme altérés permettant son maintien. De façon plus globale, des caractères spécifiquement liés aux cellules cancéreuses ont été définis et regroupés sous l'anglicisme « Cancer Hallmarks », caractéristiques résumées dans la Figure 1.

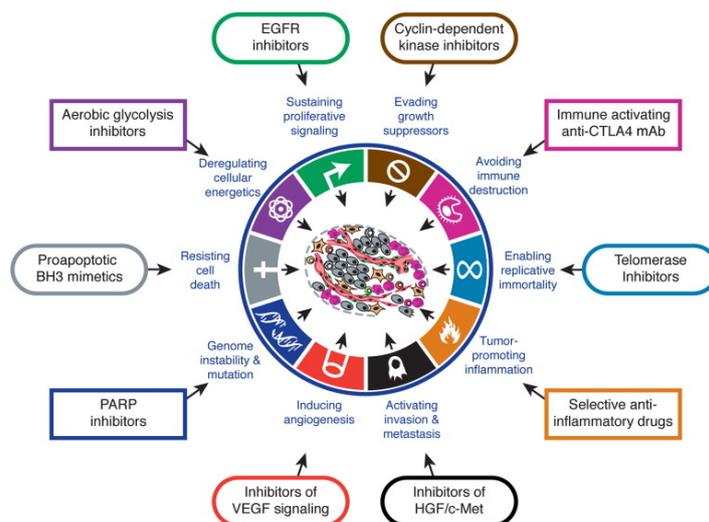


Figure 1 : Schéma représentatif des « Cancer Hallmarks ». L'ensemble des caractères associés aux cellules cancéreuses sont représentés sur ce schéma (d'après D. Hanahan et R.A. Weinberg)⁵

En terme cinétique maintenant, la transformation néoplasique survient lorsque la cellule subit des altérations génétiques augmentant l'expression des gènes de proto-oncogènes ou l'activité des protéines qu'ils encodent, avec en parallèle une inactivation de gènes connus sous le nom de suppresseurs de tumeurs. Les oncoprotéines issues des proto-oncogènes, tel que *RAS*, *PI3K* ou *MYC*, peuvent activer la croissance cellulaire, la production de biomasse ou encore le cycle cellulaire de façon incontrôlée suite à des mutations leur conférant des activités constitutives⁶⁻⁹. Initialement, ces activités associées à une production de biomasse et une réplication de l'ADN excessive s'accompagnent d'un nombre important de stress homéostatiques, par exemple l'augmentation des dérivés de réactifs de l'oxygène ou un stress réplicatif au niveau de l'ADN induisant des effets similaires à des cassures du génome¹⁰. Face à ce stress, la cellule va mettre en place des réponses permettant dans un premier temps de tenter un retour à une homéostasie normale. Cependant si la réponse est inefficace des réponses plus drastiques induites par des mécanismes dits « suppresseurs de tumeurs » s'appuyant notamment sur le facteur de transcription p53, permettront alors de bloquer le potentiel prolifératif de la cellule anormale, par un mécanisme de sénescence prématurée induite par les oncogènes (*Oncogene-induced cellular senescence* : OIS) ou encore par une mort cellulaire programmée comme l'apoptose. Le rôle clé de p53 sur la répression des oncogènes a notamment été décrit chez l'Homme dans le syndrome de Li-Fraumeni (LFS). Cette pathologie se caractérise par l'acquisition d'un allèle P53 muté généralement par transfert héréditaire, se traduisant par un développement précoce de divers cancers pouvant toucher n'importe quels tissus de l'organisme¹¹. L'OIS se définit par la mise en place d'un arrêt définitif du cycle cellulaire, notamment par les protéines p16 et 21 produites respectivement par les gènes *CDKN2A* et *CDKN1A* ce dernier contrôlé positivement par p53. Leur activation lors du stress oncogénique induit l'inhibition des complexes kinases Cyclin/CDK, qui ne peuvent alors plus empêcher la répression des facteurs de transcription E2F1 par phosphorylation de Rb, effet se traduisant le plus souvent par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1¹². Concernant l'apoptose, l'activation de p53 lors du stress oncogénique permet l'induction de l'expression des protéines de la famille de Bcl-2 proapoptotique (par exemple : BAX, PUMA). Ces protéines vont alors pouvoir inhiber l'activité des protéines Bcl-2 anti-apoptotique et permettre ainsi la perméabilisation de la mitochondrie, la libération du Cytochrome C dans le cytosol et ainsi l'activation des caspases entraînant la mort de la cellule¹³. De façon générale, les protéines comme p53 engagées dans ces mécanismes oncosuppresseurs ont pour origine des gènes fréquemment mutés dans les tumeurs et sont par conséquent nommées suppresseurs de tumeurs. Cette définition de gènes suppresseurs de tumeur répond d'autre part le plus souvent à une hypothèse établie pour la première fois par Alfred Knudson indiquant que les deux copies alléliques d'un gène suppresseur de tumeur doivent être altérées par des mécanismes génétiques ou épigénétiques¹⁴.

Un des concepts importants associés aux mécanismes moléculaires précédemment indiqués est la nécessité pour qu'une tumeur se développe d'un processus permettant de limiter les stress homéostatiques initiaux ou d'empêcher la conversion d'un signal issu de ces stress en une réponse suppressive de tumeur. À cette fin, deux mécanismes sont principalement à l'œuvre. Le premier est un processus génétique, de type mutationnel ou de délétion de régions génétiques dans lequel l'activation des mécanismes associés à l'élimination des cellules stressées devient impossible par inactivation des gènes suppresseurs de tumeur le plus souvent. Le second est un

processus adaptatif par une reprogrammation plutôt épigénétique ou biochimique permettant alternativement de limiter l'expression des gènes suppresseurs de tumeur ou d'adapter la cellule au stress homéostatique induit par l'oncogène afin d'en limiter leur portée. Afin d'illustrer ces concepts, je vais m'attarder dans un premier temps sur les mécanismes de régulation du facteur oncosuppresseur p53. Les altérations génétiques les plus intuitives sont les lésions génétiques touchant directement sa fonction suppresseur de tumeurs. Il a été montré qu'en fonction du type et du stade des tumeurs qu'environ 5 à 80% ont le gène *TP53* altéré, avec principalement une mutation faux-sens au niveau du domaine de liaison à l'ADN de la protéine impactant ainsi son activité transcriptionnelle¹⁵. Cette perte d'activité transcriptionnelle empêche alors l'activation de gènes impliqués dans la sénescence (*CDKN1A*) et l'apoptose (*BAX*) lors d'un stress oncogénique¹⁶. D'autres altérations génétiques peuvent diminuer de façon importante l'activité de p53, notamment l'amplification du gène *MDM2* qui, par l'action de type ubiquitine ligase de sa protéine, facilite la dégradation de p53¹⁷. De façon complémentaire à ces régulations génétiques, des mécanismes épigénétiques peuvent aussi intervenir dans les processus d'inactivation de la fonction de p53. Le locus *INK4A* codant les protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF} est ainsi fréquemment inactivé de façon épigénétique dans les tumeurs. p14^{ARF} est notamment impliquée dans la conversion des signaux de stress nucléolaires en une réponse activatrice de p53. Le stress oxydant et la forte sollicitation des processus de synthèses des ARN ribosomiaux activés par les oncoprotéines favorisent l'apparition de ces stress nucléolaires en induisant des cassures de l'ADN plus spécifiquement au niveau des nucléoles. Ces cassures entraînent la formation de complexes entre les protéines p14^{ARF} et MDM2, limitant la capacité de cette dernière à interagir avec p53 qui voit alors sa stabilité et son expression augmentées. L'inactivation épigénétique du locus *INK4A* permet donc de limiter l'activation de p53 en réponse au stress oncogénique¹⁸. Je tiens à souligner, que j'ai insisté ici sur l'exemple de p53, mais qu'il n'est bien sûr pas l'unique suppresseur de tumeurs et que ces processus d'inactivations de gènes ou des mécanismes suppresseurs de tumeurs se retrouvent pour d'autres protéines comme PTEN, celles appartenant à la voie Hippo, ou encore APC.

On peut ensuite s'intéresser au processus d'adaptation ou de limitation des stress homéostatiques induit par l'oncogène afin d'éviter la mise en place des mécanismes suppresseurs de tumeurs et de maintenir une homéostasie compatible avec la survie et la prolifération de la cellule. Le concept général sous-tendant ces mécanismes est de considérer que la cellule doit sortir d'un cadre métabolique rigide associé à sa fonction ou son identité, afin d'adopter de nouvelles configurations métaboliques plus propices à produire de la biomasse tout en limitant les stress connectés à cette production. Les mécanismes épigénétiques sont vraisemblablement aussi à l'œuvre dans ce contexte puisque l'identité et la fonction de nos cellules sont ancrées dans ces contrôles épigénétiques autorisant ou interdisant normalement l'expression de façon différentielle de régions spécifiques d'un génome commun à toutes nos cellules. Des remodelages épigénétiques observés à large échelle prennent ainsi place de façon précoce dans les cellules cancéreuses favorisant une plus grande souplesse phénotypique susceptible d'adapter le métabolisme des cellules aux contraintes homéostatiques imposées par l'oncogène. Ces concepts rejoignent les mécanismes connus sous le nom de plasticité cellulaire caractérisée phénotypiquement par une dédifférenciation cellulaire, rendant notamment plus facile la modulation métabolique par régulation de l'expression des gènes codant les enzymes ou les

transporteurs nutritifs impliqués dans les voies métaboliques. Les cellules les plus plastiques, celles aux plus grandes capacités de remodelage d'expression de leur génome, peuvent alors adopter plus facilement un métabolisme permettant de répondre au stress oncogénique. Ce stress associé à l'oncogène étant régulé, les mécanismes suppresseurs de tumeurs ne seront alors pas mis en place¹⁹. En résumé, une cellule cancéreuse est donc une cellule qui possède une suractivation anormale d'un ou plusieurs proto-oncogène(s) exacerbant alors les mécanismes de production de biomasse et de division cellulaire, et dans laquelle les stress homéostatiques ou leur conversion en des réponses suppressives de tumeurs sont atténués.

2. Développement macroscopique et hétérogénéité tumorale

Ayant vu les mécanismes impliqués dans l'initiation d'un processus tumoral, il est important de s'intéresser ensuite aux propriétés des tumeurs se développant à un stade macroscopique, et d'identifier dans ces propriétés quelles sont celles leur conférant une plus grande agressivité pour le patient. Les tumeurs sont notamment le plus souvent hétérogènes. Deux modèles principaux ont tenté d'expliquer l'origine et la dynamique d'acquisition de cette hétérogénéité tumorale, celui de « l'évolution clonale » et celui introduisant la notion de « cellules souches cancéreuses » que je détaillerai dans les prochaines parties. Nous verrons aussi que ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent être compris dans un mécanisme plus général utilisant la notion de perte d'identité cellulaire. De façon schématique, on peut dire à ce stade que cette hétérogénéité prend sa source dans des phénomènes d'instabilités génétiques, caractéristiques des tumeurs, mais aussi dans la plus grande plasticité épigénétique et phénotypique des cellules cancéreuses qui découlent vraisemblablement très directement des processus initiaux de perte d'identité cellulaire pouvant être ensuite amplifiés lors du développement de la tumeur. Ces deux caractéristiques promeuvent l'émergence de cellules à fort potentiel adaptatif et donc résistantes aux nouvelles contraintes qu'elles peuvent rencontrer que ce soit dans le cadre du développement métastatique ou de la résistance aux traitements, les deux problèmes majeurs associés à la morbidité. L'instabilité génétique et la plasticité cellulaire ont donc des conséquences cliniques très importantes sur le développement de la maladie et comme nous le reverrons par la suite, voilà pourquoi mon projet de thèse s'est concentré sur la mise au point d'un nouvel outil pour mesurer ce paramètre de plasticité cellulaire dans l'espoir de mieux traiter les patients.

Avant de détailler ces concepts, il est important de préciser que dans le cadre de cette thèse je me suis intéressé à un cancer en particulier, celui du sein. Cette précision est importante, car les niveaux et les types d'hétérogénéités tumorales observés dépendent très directement des cellules d'origines des tumeurs et des identités initiales des cellules qui les composent. Je commencerai donc par préciser les raisons m'ayant conduit à m'intéresser plus précisément aux cancers du sein et à rappeler quelques concepts développementaux et tissulaires importants pour comprendre l'identité de ces cellules mammaires.

Les tumeurs mammaires sont tout d'abord caractérisées par une forte hétérogénéité inter- et intrapatient et peuvent être associées à une plasticité cellulaire élevée. Le groupement des patients par les outils de diagnostics existants permet la mise en place de traitements en lien avec l'appartenance à une classe pronostic (en fonction de critères histologiques et génétiques).

Malgré le bon pouvoir prédictif de ces outils, le manque d'information sur le niveau de plasticité cellulaire au sein des tumeurs fait que pour un même groupe, certaines patientes verront la stratégie thérapeutique insuffisante, car possédant quelques cellules très plastiques à l'origine des récurrences, tandis que pour d'autres cette stratégie sera excessive avec des traitements aux effets secondaires réels afin d'éviter d'hypothétiques récurrences qui ne se développeront jamais dues à l'inexistence de cellules plastiques. Le deuxième point pour lequel je me suis intéressé au cancer du sein, c'est qu'il est chez la femme celui de plus forte incidence (25% de l'ensemble des cancers) et qui se traduit, toujours chez la femme, par le taux de mortalité le plus élevé sur l'ensemble des cancers (15,5%)¹.

Concernant maintenant l'histologie et le développement du tissu mammaire, on peut tout d'abord préciser que la glande mammaire est composée de plusieurs systèmes sécréteurs tubulo-alvéolaires qui forment des lobules, eux-mêmes composant une structure plus grande, les lobes. Plusieurs lobes sont ensuite reliés au système de canaux dit galactophore permettant le drainage du lait jusqu'au mamelon. La glande mammaire est un épithélium organisé en bicouche cellulaire, les cellules myoépithéliales étant au contact d'une membrane basale et les luminales au contact de la lumière alvéolaire, l'ensemble entouré d'un stroma riche en adipocytes (Figure 2). Les cellules luminales sont impliquées dans la synthèse du colostrum et du lait lors des périodes de lactation tandis que les cellules myoépithéliales présentent des activités contractiles favorisant l'expulsion du lait dans les galactophores. Le processus de développement de ce tissu débute au cours de l'embryogenèse et se poursuit jusqu'au stade adulte, le tissu mammaire dérivant de l'ectoderme. La première étape est l'invagination de ce tissu formant alors des bourgeons. Ils se ramifient ensuite pour former des canaux primaires. Ces canaux vont croître de façon proportionnelle à l'individu, jusqu'à la puberté où l'action des œstrogènes permet une croissance rapide des glandes mammaires avec notamment l'ajout de nouvelles ramifications²⁰.

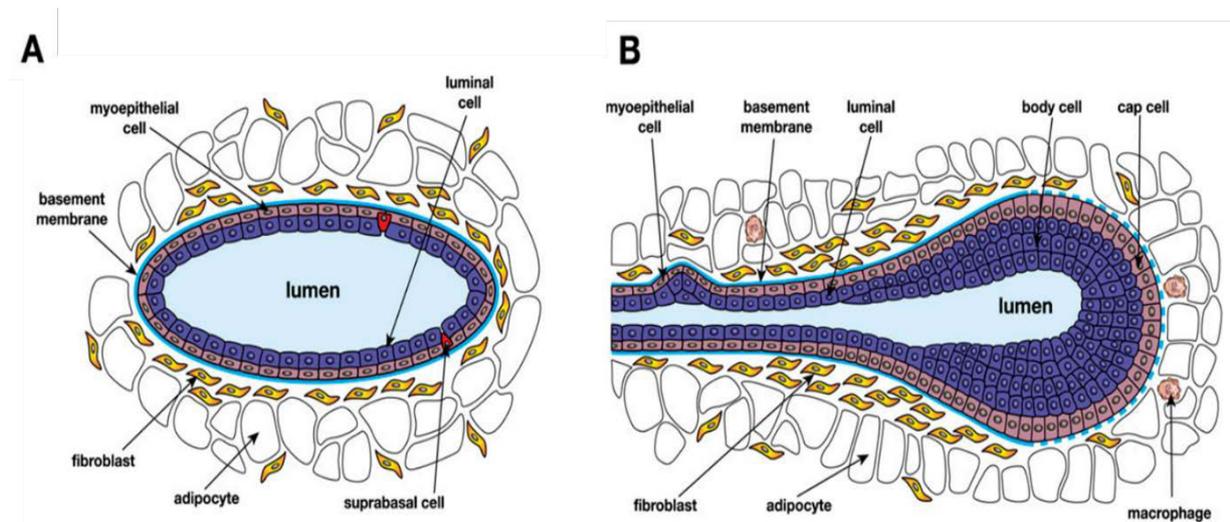


Figure 2 : Histologie du tissu mammaire. Le schéma représente les canaux (A) et les bourgeons terminaux (B). Les cellules myoépithéliales sont au contact de la lame basale tandis que les cellules luminales sont au contact de la lumière du tissu (d'après J.E. Visvader)²¹

Au niveau cellulaire le développement mammaire précoce est soutenu par des cellules multipotentes. Cette multipotence est à rapprocher du concept de plasticité précédemment décrit

pour les cellules cancéreuses à la différence près qu'elle constitue ici un caractère physiologique et non pathologique. Cette propriété est ensuite rapidement perdue après la naissance conduisant au maintien de progéniteurs unipotent soutenant respectivement la prolifération du lignage luminal ou basal, ce dernier étant à l'origine des cellules myoépithéliales. Ces progéniteurs unipotents vont ensuite rester fonctionnels durant la puberté et tout au long de la vie adulte²². J'aimerais souligner deux points intéressants sur la hiérarchie mammaire. Premièrement, c'est le caractère hybride de la signature génétique des cellules multipotentes. Cette signature possède la particularité de contenir simultanément des signatures luminales et basales²². Je reparlerai plus tard de cette notion d'état hybride de cellules plastiques que l'on retrouve dans un contexte tumoral et qui joue un rôle essentiel sur l'hétérogénéité tumorale. Le deuxième point que j'aimerais aborder porte sur la dynamique de la plasticité cellulaire dans un tissu sain. En effet, comme je l'ai indiqué précédemment, dans un contexte normal, l'intégrité du tissu mammaire est soutenue par des progéniteurs unipotents luminaux et basaux, engagés donc un processus différent de différenciation. Cependant, les progéniteurs basaux ont la capacité de se dédifférencier et de réacquérir un statut multipotent suite à une déplétion des cellules luminales. Ces dernières exercent donc un rétrocontrôle négatif permettant de maintenir l'engagement de ces progéniteurs basaux²³, cet engagement n'étant donc pas ancré de façon définitive dans un paysage épigénétique. D'autre part, dans ce contexte, l'acquisition du statut multipotent des progéniteurs basaux s'accompagne de la réacquisition d'une signature génomique hybride luminaire et basale (Figure 3). Comme nous le verrons dans le prochain paragraphe, les cellules luminales peuvent dans un contexte tumoral acquérir de façon similaire ce statut multipotent. L'ensemble de ces observations permettent donc de mettre en lumière le lien entre plasticité cellulaire et dynamique phénotypique de la hiérarchie mammaire, ces concepts jouant un rôle important dans la compréhension des processus de transformation néoplasique prenant place au sein de ce tissu.

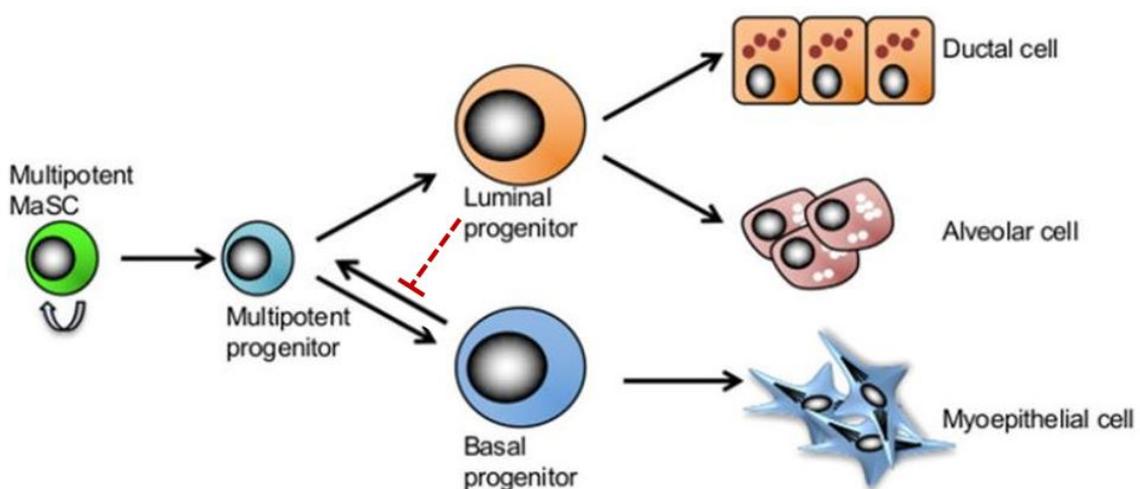


Figure 3: Hiérarchie mammaire dans un tissu sain. Durant l'embryogenèse et le développement juvénile, le développement de tissu mammaire est soutenu par les cellules aux caractères multipotentes. Suite à la puberté, les progéniteurs unipotents luminaux et basaux permettent de conserver l'intégrité du tissu tout au long de la vie de la femme. En absence de rétrocontrôle des cellules luminales sur les progéniteurs basaux, ces derniers peuvent réacquérir un phénotype multipotent pour redistribuer l'ensemble de la hiérarchie. (D'après Eunmi Lee *et al.*)²⁴

a) *Hétérogénéité intertumorale*

Les cancers mammaires possèdent une hétérogénéité intertumorale, avec des sous-groupes cellulaires qui se caractérisent par des différences de réponses au traitement ou d'évolution clinique. Traditionnellement, la classification s'effectue principalement par les caractéristiques physiologiques du cancer avec notamment: la taille de la tumeur primaire, l'envahissement des glandes lymphatiques, le grade histologique, ou encore le statut aux récepteurs aux œstrogènes (ER pour « estrogen receptor »), aux récepteurs à la progestérone (PR pour « progesterone receptor ») et au récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2 pour « human epidermal growth factor receptor 2 »). Cependant, ces caractéristiques sont insuffisantes pour la stratégie thérapeutique ou pour la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et la progression tumorale. C'est pourquoi dans les années 2000 avec l'avènement de la transcriptomique, des analyses d'expressions génomiques ont permis de déterminer des signatures génétiques et de classer les cancers du sein en sous-groupe, tout en les associant à des paramètres cliniques tels que l'agressivité tumorale ou encore la réponse aux traitements.

En premier lieu, il y a les tumeurs Luminal A et B, qui se définissent par une expression élevée des gènes associés aux cellules luminales de la glande mammaire. En raison de cette signature, il a été établi que ces tumeurs ont pour origine des cellules luminales différenciées. Elles sont souvent corrélées avec l'expression du récepteur aux œstrogènes et celui de la progestérone, et sont donc majoritairement (ER⁺, PR⁺). De plus sur l'ensemble des groupes, ces tumeurs sont corrélées avec le niveau d'agressivité tumorale et de métastase le plus faible, et ont une excellente réponse aux traitements hormonaux^{25,26}.

Le second groupe représente les tumeurs qui ont un enrichissement de l'oncogène HER2, on parle cette fois-ci de tumeur HER2⁺. Ces tumeurs ont une forte agressivité en lien avec une vitesse de prolifération très importante. Cependant, grâce au développement d'anticorps humanisés anti-HER2 bloquant le signal de ce récepteur et en raison de la dépendance de ces cellules à l'activité de HER2, ces tumeurs ont une excellente réponse à ce type de traitement de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante^{25,26}.

Le troisième groupe correspond aux tumeurs ayant pour signature génétique celle de la couche basale de la glande mammaire, zone où sont localisées les cellules myoépithéliales et progénitrices basales et qui peuvent sous certaines conditions réacquérir un statut plus plastique, multipotent. Ces tumeurs sont principalement des tumeurs de type triples négatives n'exprimant pas ER, PR et HER2 et sont nommées Basal-like^{25,26}. À la différence des tumeurs Luminal, elles sont extrêmement agressives et avec un fort potentiel métastatique. De plus étant triples négatifs, leurs réponses aux traitements hormonaux ou de cytotoxicité induite par des anticorps ciblant HER2 sont très limitées. L'origine de ces tumeurs peut être diverse, elle peut provenir des cellules basales, mais aussi des cellules luminales dans lesquelles des mutations oncogéniques réactivent l'état multipotent. Pour soutenir cette hypothèse, je prendrai pour exemple les mutations sur *BRCA1* et *PI3KCA*. Les premières évidences que les cellules progénitrices luminales pouvaient être les cellules d'origines de ce type de cancer étaient démontrées dans un contexte où les cellules portaient une mutation sur le gène *BRCA1*²⁷. En effet, cette mutation, joue un rôle très important sur l'intégrité génomique, mais aussi sur la

différenciation mammaire avec un rôle pro-différenciant²⁸. Ainsi lorsqu'une femme possède une mutation sur ce gène, les cellules mammaires sont plus prônes à perdre leur identité différenciée et de gagner des caractères plus souches, proches de ceux des progéniteurs basaux multipotents²⁹. De la même manière, une mutation sur le gène *PI3KCA* couplé avec la protéine P53 mutée permet l'acquisition d'un état multipotent des cellules luminales formant alors des tumeurs Basal-like hétérogène³⁰. Ainsi l'acquisition de mutations au niveau des cellules luminales permet d'outrepasser des mécanismes de différenciations et d'acquérir un phénotype plastique qui comme nous l'avons vu avait pour origine les progéniteurs unipotents basaux en temps normal²³.

Le quatrième groupe correspond au sous-groupe normal-like. Tout comme les Basal-like, ceux sont principalement des tumeurs triples négatives avec des signatures d'expression de gènes caractéristiques du tissu adipeux et d'origine non épithéliale^{25,26}. Cependant, il est à noter que la véracité de ce sous-groupe est remise en question, car refléterait un artefact technique dû à une contamination des échantillons par le stroma³¹.

Enfin le dernier groupe, les tumeurs Claudin-low ont été décrites *a posteriori*, par l'analyse de tumeurs rares métaplasiques. La métaplasie est une réponse physiologique lors d'une agression du tissu qui peut aboutir à un changement phénotypique d'une cellule différenciée en un autre type de phénotype. Dans ce type de tumeur, on peut ainsi retrouver des cellules cancéreuses aux caractéristiques de cellules de sarcomes, ou encore ceux de cellules de types chondroïdes ou osseuses. Cette grande hétérogénéité cellulaire sous-entend la mise en place de processus de transdifférenciation par l'acquisition d'une plasticité cellulaire élevée. Ces tumeurs ont aussi pour caractéristiques d'être triples négatives et très agressives. Leurs signatures sont associées notamment à la perte de l'expression des protéines des jonctions cellulaires (les claudines), mais aussi un enrichissement des marqueurs de cellules souches et du processus épithélio-mésenchymateux^{32,33}.

Il est ainsi intéressant de voir qu'à travers cette classification, l'existence d'un lien entre l'agressivité tumorale et le niveau de différenciation cellulaire (Figure 4). Pour mettre en relief ce lien, je vais maintenant décrire l'hétérogénéité cellulaire au sein même d'une tumeur afin d'introduire la notion de perte d'identité cellulaire lors du processus tumorigénique, puis dans un second temps développer les processus en lien avec ce mécanisme.

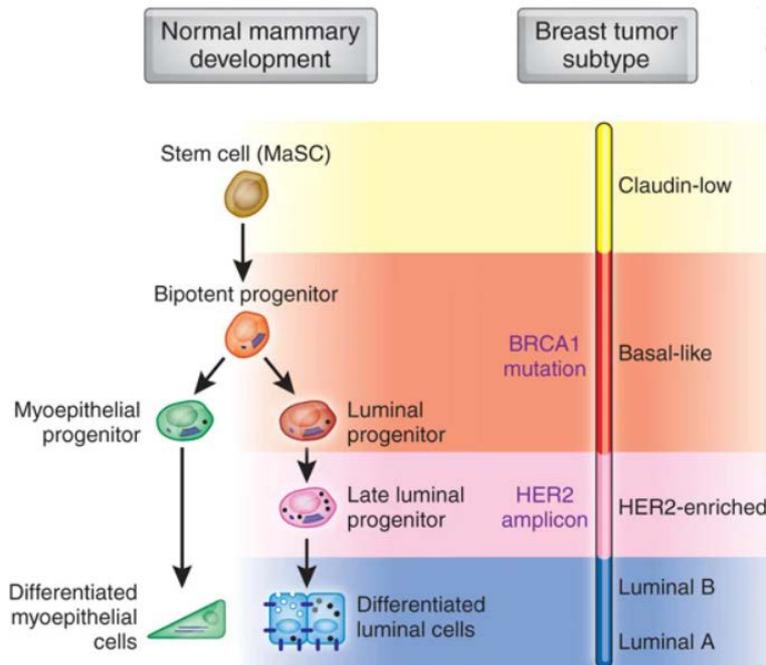


Figure 4 : Probables origines des différents sous-groupes des cancers mammaires. Les sous-groupes Luminal A et B caractérisés par un niveau de différenciation importante auraient pour origines les cellules luminales différenciées. Les sous-groupes HER2 et Basal-like sont le plus souvent corrélés avec une signature moins différenciée qui pourrait traduire une origine des cellules bipotentes ou après la mise en place de mécanismes de dédifférenciation des cellules luminales. Le sous-groupe Claudin-low quant à eux par la plasticité élevée de ces cellules aurait pour origines des cellules aux caractères souches (d’après A. Prat et C.M. Perou)³⁴

b) *Hétérogénéité intratumorale*

En plus de la diversité intertumorale, il existe au sein même des tumeurs une hétérogénéité phénotypique des cellules cancéreuses qui la constitue. C’est durant la seconde moitié du XX^e siècle que la question de l’origine de l’hétérogénéité intratumorale a commencé à être étudiée donnant naissance à deux modèles.

Le premier correspond à l’évolution clonale, qui se base sur une vision évolutive darwinienne. Dans le cadre de ce modèle, l’initiation tumorale s’installe lorsque de multiples mutations ont eu lieu au sein d’une cellule, lui conférant un avantage prolifératif face aux cellules saines. Lors de la progression tumorale, l’instabilité génétique et la prolifération incontrôlée permettent de façon stochastique l’émergence de nouvelles mutations se traduisant par de nouveaux clones de caractéristiques phénotypiques différents. Ces clones sont exposés à différentes pressions environnementales (disponibilité en nutriment, pH de l’environnement, traitement médicamenteux, etc.) qui permettent la sélection de clones les plus aptes à survivre dans leur environnement. Ce processus dynamique est relié à la disparition et l’émergence de clones au cours du temps et est dépendant de leur localisation au sein de la tumeur, résultant à une architecture sous clonale complexe^{35,36}.

Le second modèle correspond à celui des cellules souches cancéreuses. Il a notamment émergé dans les années 90 lorsque des travaux sur des cellules de leucémie myéloïde aiguë ont montré que seule une population cellulaire souche rare (CD34⁺/CD38⁻) pouvait initier dans des souris immunodéficientes une leucémie et redonner par différenciation l’ensemble des populations de

celle d'origine tout en respectant une hiérarchie phénotypique^{37,38}. Ce modèle admet donc l'existence d'un sous-groupe cellulaire au sein de la tumeur qui possède des propriétés de cellules souches et qui serait à l'origine de l'initiation tumorale, la progression et la réémergence tumorale. Ces cellules souches cancéreuses primitives auraient comme propriétés d'avoir la capacité de s'autorenouveler indéfiniment ainsi que de se différencier, passant par une identité progénitrice jusqu'à une identité terminale fonctionnelle rigide, en suivant des trajectoires définies reconstituant ainsi l'ensemble des populations tumorales. À la façon du tissu sain, la cellule souche cancéreuse, indifférenciée, se situerait au sommet d'une hiérarchie cellulaire qui lors de processus de différenciation peut restituer la masse tumorale constituée alors de différents types de cellules à différents stades de différenciation. Par leur nature souche, ces cellules ont une capacité à réarranger leur phénotype, permettant ainsi leur adaptation lorsqu'une pression de sélection survient dans leur environnement. On parle alors de plasticité phénotypique cellulaire. Cette adaptation se transmet alors aux cellules filles différenciées entraînant l'émergence d'un ensemble de cellules résistantes à cette pression, qui permet alors le développement tumoral. De plus par cette adaptabilité phénotypique, les cellules souches cancéreuses seraient à l'origine de métastases, mais aussi de la réémergence tumorale due à des traitements usuels non spécifiques de ces cellules ou par la mise en place de résistances thérapeutiques³⁸.

De la même manière que le système hématopoïétique, le tissu mammaire suivrait une hiérarchie cellulaire. L'existence de cellule souche cancéreuse au sein de tumeur mammaire a été établie dans un premier temps par l'expression d'un marqueur de surface, CD44, qui est l'une des principales protéines d'adhésions de surface et très tôt reliées au processus de métastase par son rôle dans les processus d'adhésion, de migration, de signalisation et de prolifération³⁹. C'est avec les travaux d'Al-Hajj et de ses collègues qu'il a été montré que des cellules cancéreuses mammaires, qui ont pour phénotype l'expression de CD44 et l'absence du marqueur de cellule mammaire différenciée CD24, pouvaient après injection dans des souris immunodéficientes redonner des tumeurs. Tout comme les cellules souches cancéreuses des leucémies myéloïdes aiguës, ces cellules CD44⁺/CD24⁻ sont capables en plus de l'initiation tumorale de régénérer l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur initiale, donnant pour conclusion que ces cellules ont des propriétés de cellules souches cancéreuses⁴⁰. D'autres marqueurs de cellules souches ont été décrits dans les tumeurs mammaires. Sans faire une liste exhaustive, on peut parler de l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) qui est le second marqueur mis en évidence. En effet sa surexpression est corrélée avec la capacité tumorigénique des cellules lorsqu'elles sont injectées dans des souris immuno-déficiente⁴¹. Enfin c'est avec les travaux de X. LI et ses collègues, mais aussi H.E Lee et ses collègues, qu'il a été montré que ces cellules CD44⁺/CD24⁻ exprimant fortement l'ALDH1 avait une capacité de résistance thérapeutique, confirmant l'une des propriétés reliées aux cellules souches cancéreuses^{42,43}

Les marqueurs que nous venons de voir et qui décrivent notamment des cellules aux propriétés souches ont été utilisés pour des analyses immunohistochimiques des sous-groupes du cancer mammaire. Le premier constat, qui semble instinctif, est une corrélation entre le niveau de cellules CD44⁺/CD24⁻ et les tumeurs Basal-like, à l'inverse le niveau d'expression de CD44 est beaucoup plus faible dans les tumeurs luminales avec en parallèle une augmentation de l'expression de CD24⁴⁴. Dans une seconde étude, des travaux similaires ont été effectués avec

une combinaison de multiples marqueurs des différents sous-groupes, mais cette fois-ci en prenant en considération le grade histologique des tumeurs, carcinome ductal *in situ* (CDIS) ou carcinome ductal invasif (CDI) qui représente un grade plus avancé de la tumeur avec notamment un front de migration de cellules ayant passé la membrane basale. De la même façon que précédemment, les tumeurs Basal-like ont des populations aux caractères souches CD44⁺/CD24⁻ plus importantes que les tumeurs luminales A et B, ainsi qu'une population ALDH1⁺ plus importante. De plus au sein des tumeurs Basal-like cette population est aussi corrélée au grade de la tumeur avec une proportion plus importante dans les CDI. Enfin, point intéressant, ces populations souches sont corrélées à l'expression de la vimentine marqueur reliée à un processus jouant un rôle sur la plasticité phénotypique des cellules épithéliales en modulant leur identité cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse. Je reviendrai plus en détail sur ce processus dans une prochaine partie. À l'inverse on constate que les populations CD44⁺/CD24⁺ sont quant à elles corrélées avec l'expression d'un facteur de transcription essentielle pour la mise en place de la différenciation luminale des cellules mammaires, GATA3⁴⁵. On remarque alors qu'il existe un lien entre l'hétérogénéité intertumorale et intratumorale avec un niveau de population aux caractères souches plus importante au sein des tumeurs Basal-likes que les tumeurs luminales. La mise en place de processus jouant sur l'identité cellulaire semble avoir un rôle pour la modulation du phénotype de la cellule mammaire, lui conférant alors des propriétés souches (Figure 5). Une autre observation, effectuée par la même équipe, met en lumière la modulation dynamique de l'identité cellulaire lors du processus de tumorigenèse. En effet, alors que dans des tumeurs *in situ* la composition cellulaire est majoritairement CD44⁺/CD24⁻, on retrouve au sein des métastases des mêmes patients une augmentation significative de cellules exprimant le marqueur de surface CD24. Malgré un échantillonnage assez faible de huit patients, il est intéressant d'observer que les cellules métastatiques semblent avoir un caractère plus différencié, avec une réexpression de CD24, que les cellules de la tumeur d'origine⁴⁶.

Historiquement, le modèle de cellule souche cancéreuse décrivait une hiérarchie unidirectionnelle et irréversible de la cellule dite souche au sommet, aux cellules différenciées aux bases des branches de différenciation. Cependant, il est à noter que cette hiérarchie serait plutôt bidirectionnelle, avec une réversibilité du processus de différenciation. Ainsi des cellules différenciées peuvent dans certains contextes déclencher un processus de dédifférenciation et acquérir des propriétés de cellule souche cancéreuse. Ce processus dynamique est alors relié au concept de plasticité phénotypique, dans lequel des modifications génétiques et épigénétiques peuvent moduler l'identité cellulaire de la cellule lui donnant des propriétés nécessaires pour survivre à une pression de sélection. Ce qui est intéressant avec ce concept, c'est qu'il permet partiellement de relier le modèle de l'évolution clonale et celui des cellules souches cancéreuses. En effet, des mutations ponctuelles au sein de cellules différenciées peuvent induire l'acquisition de capacités souches. En revenant sur l'exemple donné de la possible origine des tumeurs Basal-like, c'est une mutation ponctuelle de *BRAC1* ou de *PI3KC* au sein des cellules mammaires qui entraîne une altération du processus de différenciation, autrement dit de l'identité cellulaire, conférant des propriétés plus souches ou du moins l'acquisition de caractères de progéniteurs multipotents^{29,30}. Dans ce contexte, les cellules souches cancéreuses ne seraient alors qu'une représentation visible d'un phénomène dynamique de la modulation de

l'identité cellulaire. Or le terme cellule souche tumorale décrit un état plastique au phénotype rigide au sommet d'une hiérarchie, il semble alors cohérent d'utiliser le terme de cellules cancéreuses dynamiquement dédifférenciées (CCDD) qui serait plus en adéquation avec ces cellules à forte plasticité.

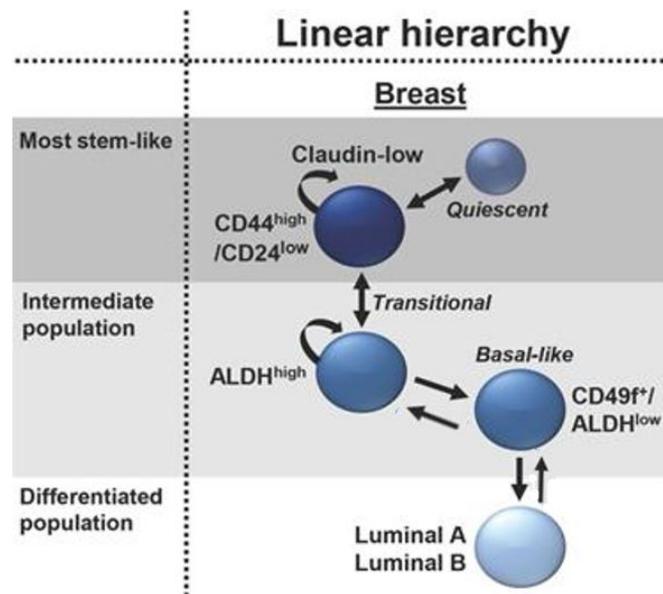


Figure 5 : La dynamique phénotypique permettant l'acquisition d'un phénotype CCDD. Représentation schématique de la dynamique de la plasticité cellulaire par des mécanismes de différenciation/dédifférenciation. Les marqueurs phénotypiques classiquement utilisés pour discriminer les différentes populations sont représentés CD44, CD24, ALDH (d'après A.J Cole *et al.*)⁴⁷

3. Perte d'identité cellulaire et plasticité, support du développement tumoral

Dans cette partie, je vais contextualiser l'initiation et l'évolution tumorale en abordant l'importance de l'identité cellulaire et du processus de plasticité. Pour mettre en relief mes propos et comme ouverture, je vais tout d'abord parler des travaux de Ruba Halaoui *et al.*⁴⁸. En effet ils ont mis en évidence à partir de coupes histologiques de patients à différents niveaux de la tumorigenèse que la déstructuration morphologique du tissu était accompagnée d'une perte de polarité cellulaire. Cette polarité étant l'un des marqueurs d'identités cellulaires épithéliales le plus important⁴⁹. De plus ces modifications tissulaires et cellulaires étaient corrélées avec l'avancée du carcinome (Carcinome ductal *in situ* et Carcinome ductal invasif), et de façon plus intéressante que cette perte était aussi corrélée en amont du carcinome, dès les premières lésions préneoplasiques (Hyperplasie ductale atypique). Autre point important, ils ont pu montrer chez la souris que l'induction de l'expression de l'oncogène PyMT entraînait le même phénotype que celui observé chez les patients avec un continuum de déstructuration de l'architecture tissulaire et de perte de polarité cellulaire jusqu'à l'obtention d'un carcinome où les pertes de structure et de polarité sont totales. C'est avec un modèle où l'expression de l'oncogène est contrôlée qu'ils ont mis en évidence, que l'arrêt de son expression entraînait une réversion phénotypique avec une reformation de structures (lumens) et une repolarisation des cellules mammaires. Cette réversion s'effectue par l'induction de l'apoptose des cellules formant la

tumeur, avec pour seules cellules résistantes celles les plus à l'extrémité, en contact avec le stroma, ce qui sous-entend l'existence d'une régulation au niveau de la membrane basale. On peut observer avec cet exemple deux points qui permettraient de postuler mon hypothèse. Le premier, mineur du point de vue de mes travaux, qui montre l'importance de contextualiser la tumorigenèse dans un cadre tissulaire et son probable rôle oncosuppresseur. Le second, plus important dans cette thèse, l'évolution tumorale allant de l'étape préneoplasique à un carcinome invasif s'accompagne d'une perte progressive de la polarité des cellules mammaires, autrement dit le processus de tumorigenèse s'accompagne d'une perte d'identité cellulaire.

Partant de ces deux points, nous pouvons poser un cadre afin de définir la plasticité cellulaire et la perte d'identité cellulaire lors du processus de tumorigenèse. Lorsque l'individu est adulte, les cellules constituant le tissu se retrouvent dans un état différencié. Un ensemble de mécanismes, notamment au niveau du tissu, permettent le maintien de leur identité essentiel pour la physiologie de l'organe via des contraintes qui empêchent de possibles modifications profondes de l'expression du génome. À l'inverse lors de l'atteinte du tissu dû à des agressions diverses (blessures physiques ou inflammatoires), la levée de ces contraintes permet la mise en place de processus régénératifs et/ou cicatriciels par remodelage épigénétique⁵⁰. La cellule acquiert alors une plasticité cellulaire qui lui permet après une phase de perte d'identité la possibilité de reconstituer le tissu. Cette contrainte tissulaire sur l'identité cellulaire est très bien caractérisée dans les travaux de Van Keymeulen *et al.*⁵¹. En temps normal chez une adulte lorsque le tissu est au repos, la hiérarchie structurale des populations cellulaires est linéaire et programmée pour un axe de différenciation. On retrouve alors deux types de progéniteurs unipotents permettant le développement respectif des cellules luminales et myoépithéliales. Pourtant, lorsque les progéniteurs myoépithéliaux sont transplantés seuls dans des souris syngéniques, ils acquièrent la capacité de se différencier en cellules myoépithéliales ainsi qu'en cellules luminales. Cette observation peut s'expliquer du fait que chez l'adulte, les cellules myoépithéliales gardent au niveau de leur configuration chromatinienne une accessibilité aux gènes de la lignée luminale, et que lorsque l'environnement tissulaire des cellules se retrouve modifié, ici par la manipulation en elle-même, les contraintes exercées sur l'identité de ces cellules se voient levées⁵².

Cependant, ce processus de plasticité phénotypique, qui est essentiel pour des organismes à durée de vie longue comme l'Homme, peut s'avérer délétère lorsqu'il est anormal. Ce remaniement épigénétique anormal joue alors un double rôle, premièrement il peut être directement associé à des mécanismes de plasticités essentiels pour l'activation et l'inactivation des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur⁵³. Et comme second rôle, celui qui nous intéresse dans le cadre de ces travaux, le contexte épigénétique global et donc l'identité cellulaire, serait des éléments clés pour l'adaptation au processus de transformation néoplasique en augmentant la résilience de la cellule à supporter le stress oncogénique. Les remaniements épigénétiques, liés au processus de plasticité cellulaire, permettraient, dans cette hypothèse, d'augmenter le champ des possibles par un élargissement du répertoire transcriptomique afin de moduler rapidement son répertoire enzymatique et de rétablir l'homéostasie de la cellule. En effet, la nature stochastique de l'expression du génome semble aujourd'hui bien établie⁵⁴ et jouerait un rôle sur l'acquisition d'une identité cellulaire par la réduction déterministe de ce champ des possibles^{55,56}. Ainsi dans un contexte de processus de transformation néoplasique,

la probabilité d'acquérir un profil transcriptomique en adéquation avec ce processus serait plus forte au sein de cellules dotées d'une plus grande plasticité. Il est intéressant de voir en lien avec ce concept que chez l'adulte les cellules de types progéniteurs luminaux ont une configuration chromatinienne la plus accessible et proche des cellules mammaires fœtales. De plus comme nous l'avons vu ultérieurement, ce type cellulaire serait à l'origine des cancers les plus précoces et les plus agressifs de type Basal-likes, ce qui est renforcé par des signatures transcriptionnelles proches^{55,57}. Nous pouvons alors concevoir que le processus de plasticité lié à la perte d'identité cellulaire permet par l'augmentation du répertoire transcriptomique une modulation des conséquences homéostatiques de l'oncogène lors de la formation tumorale afin de supporter les stress métaboliques associés. Mais aussi dans un second temps permettre une adaptation phénotypique à des modifications environnementales (résistance thérapeutique, résistance à l'anoïkis ou encore l'adaptation à un nouvel environnement tissulaire), qui se traduit par l'observation expérimentale de cellules cancéreuses aux caractères souches¹⁹.

4. La transition épithélio-mésenchymateuse perturbateur majeur de l'identité épithéliale

Le programme de plasticité cellulaire, notamment des cellules épithéliales, le mieux caractérisé permettant la modulation de l'identité cellulaire est la transition épithélio-mésenchymateuse, ou en anglais *epithelial-mesenchymal transition*. Par commodité et pour simplifier la lecture, j'utiliserai dorénavant le diminutif anglais: EMT. La fonction majeure de ce programme est d'inhiber l'expression des protéines essentielles à la formation des jonctions entre les cellules épithéliales, entraînant alors la perte de leur polarité et en gagnant en parallèle des caractéristiques mésenchymateuses. L'activation de ce processus se fait notamment par des *stimuli* extracellulaires, qui entraînent alors des remodelages épigénétiques réversibles⁵⁸. Si l'EMT était au départ caractérisée par un changement de phénotype épithélial/mésenchymateux, il s'avère maintenant bien caractérisé comme étant un continuum de phénotypes. Ce processus permet alors à la cellule d'acquérir un ensemble d'états allant d'un état complet épithélial à celui de cellule mésenchymateuse en passant par différents états intermédiaires plus ou moins stables épigénétiques nommés métastables, ou encore hybrides⁵⁹. Seulement trois familles protéiques, qui sont tous des facteurs de transcriptions (EMT-TF), sont impliquées dans l'EMT (SNAIL, ZEB et TWIST)⁵⁹. Ce qui définit ces facteurs de transcriptions est leur capacité à induire directement un programme transcriptomique réprimant les gènes liés à l'identité épithéliale, notamment ceux impliqués dans la polarité, les jonctions serrées ainsi que les jonctions d'adhésion⁶⁰. Ainsi, l'expression du gène *CDH1* codant pour l'E-cadhérine, protéine essentielle pour la formation des jonctions cellulaires, se retrouve directement réprimée lors de la fixation des EMT-TF sur les séquences régulatrices de ces gènes contenant de multiples domaines E-boxes^{61,62} (Figure 6).

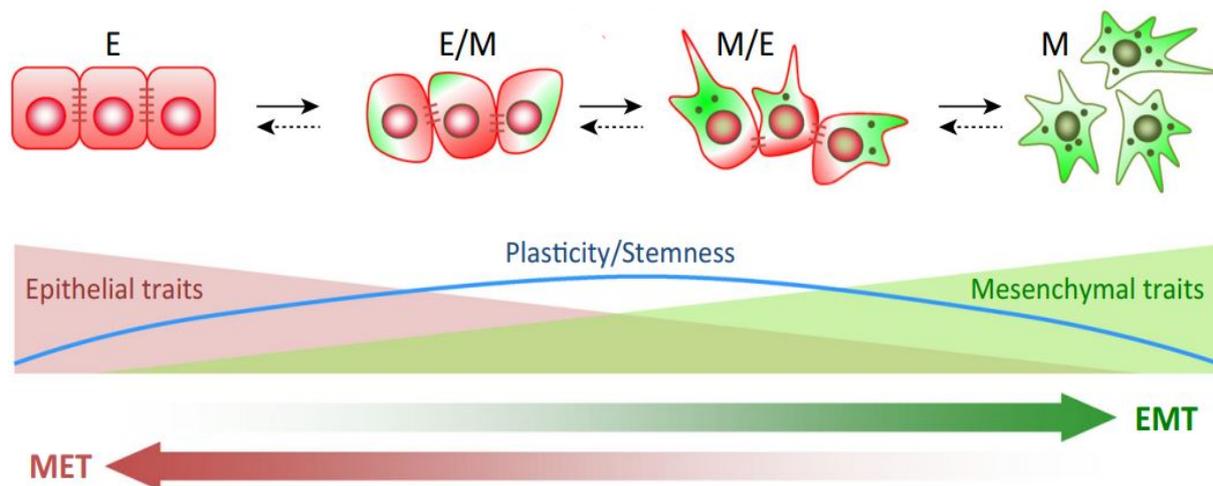


Figure 6: Le continuum de l'EMT corrélé à la plasticité cellulaire. La figure représente les états extrêmes avec une acquisition d'une identité épithéliale ou mésenchymateuse, avec entre ces deux extrêmes différents intermédiaires métastables (d'après W. Li et Y. Kang)⁶³

En faisant le lien avec le modèle des cellules souches tumorales défini précédemment, l'équipe de R.A. Weinberg ainsi que celle d'A. Puisieux, ont pu mettre en évidence que le programme de l'EMT permet aux cellules d'acquérir un phénotype souche, avec un changement phénotypique passant de celui de cellules mammaires différenciées $CD24^+/CD44^-$ à celui de cellule souche $CD24^-/CD44^+$. De plus ce changement phénotypique s'accompagne, lorsqu'un oncogène est exprimé dans ces cellule, de l'obtention des caractéristiques associées aux cellules souches notamment un pouvoir tumorigénique plus important en comparaisons des cellules n'ayant subies aucune modification de leur identité cellulaire⁶⁴⁻⁶⁶. Dans un second temps il a été démontré que les EMT-TF pouvaient également agir comme activateur transcriptionnel en formant des complexes avec d'autres facteurs de liaison à l'ADN. Ainsi il a pu être démontré dans le modèle du cancer du sein que l'EMT-TF ZEB1 pouvait avec le facteur de transcription YAP former un complexe ZEB1/YAP, permettant ainsi la modulation d'expression d'un set de gènes augmentant les propriétés souche et de résistance aux traitements⁶⁷. Le processus d'EMT a été décrit dans un premier temps lors du développement embryonnaire, où l'importance de la plasticité et du remodelage de l'identité cellulaire est essentielle pour un développement normal⁶⁸. Tandis que, chez l'adulte sain l'EMT est activée lors du processus de cicatrisation et de régénération tissulaire, fortement liée à l'inflammation induite lors de l'atteinte de l'intégrité d'un tissu⁶⁹⁻⁷¹. Dans ce contexte, une réponse inflammatoire non résolue peut alors créer un microenvironnement propice à une fibrose tissulaire. Cette pathologie est alors supportée par l'induction de l'EMT dû à la libération de cytokines pro-inflammatoires des cellules de l'immunité innée, mais aussi l'activation des fibroblastes du stroma excréteur de facteurs de croissance, qui nous le verrons peuvent jouer un rôle lors du processus néoplasique^{72,73}.

Dans le cadre du contrôle de l'identité épithéliale dans le contexte du développement tumoral, nous pouvons établir deux angles d'approches de l'EMT. Le premier, les signaux inducteurs de l'EMT et la cinétique de leur intervention lors des différentes étapes de la tumorigénèse. Le second, les conséquences de l'EMT sur ces différentes étapes. L'induction de ce processus et donc les mécanismes qui en sont à l'origine lors du développement tumoral ont pour origines

l'activation de récepteurs sensibles à des médiateurs solubles ainsi que des médiateurs membranaires, qui voient leur concentration corrélée au niveau de l'atteinte de l'organe. En lien avec le processus de cicatrisation nous retrouvons ainsi les facteurs de croissance tels que la superfamille TGF β (*Transforming Growth Factor beta*)⁷⁴. On retrouve aussi l'implication de voies de signalisations impliquées dans le processus de morphogenèse telles que NOTCH, WNT or Hegehog, qui ont toutes été décrites pour leur rôle essentiel au développement embryonnaire^{75,76}. Au niveau des inducteur de l'EMT nous pouvons aussi trouver celui lié au processus de l'inflammation avec notamment le recrutement des cellules immunitaires, qui jouant un rôle en deux temps, lors de l'induction du processus néoplasique et lors de la dissémination métastatique⁷⁷⁻⁷⁹. L'ensemble de ces processus sont tous des mécanismes de mise en place extrinsèque, où la communication entre les cellules tumorales et les cellules du stroma est essentielle pour la mise en place de l'EMT, son maintien et son renforcement. Tout en ayant en parallèle des mécanismes intrinsèques à la tumeur, notamment des altérations génétiques et épigénétiques jouant aussi un rôle essentiel pour la mise en place de ce programme de plasticité. Enfin, le dernier niveau d'induction que nous verrons est celui de l'impact des conditions biochimiques de l'environnement tumoral, on peut ainsi retenir l'hypoxie comme l'un des facteurs importants sur son induction (Figure 7).

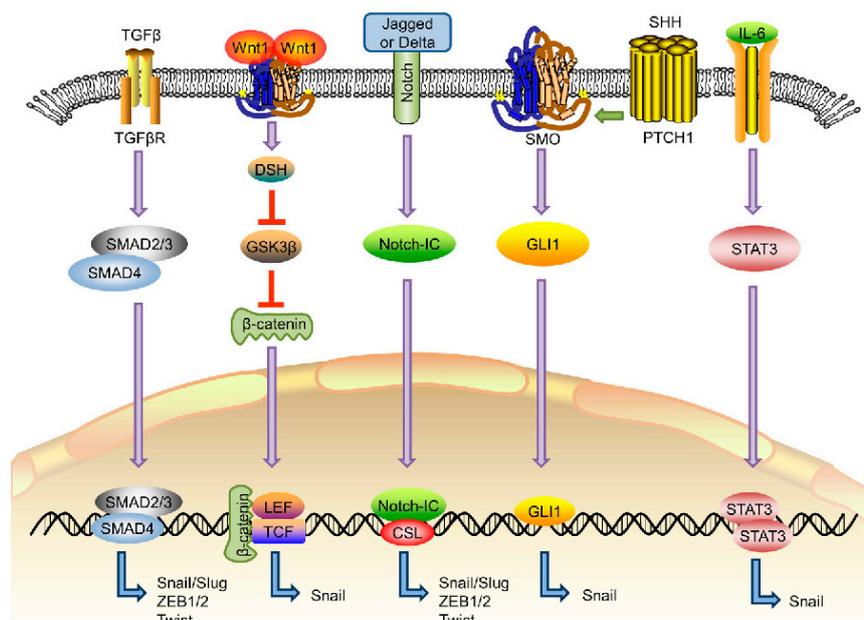


Figure 7: Facteurs solubles et leur voie de signalisation participant à l'induction du programme de l'EMT par l'activation des gènes des EMT-TF lors du développement tumoral (d'après B. Du et J.S Shim)⁸⁰

Sur l'ensemble des facteurs essentiels au processus de cicatrisation, le TGF β est probablement celui où son rôle a été le mieux caractérisé lors de l'induction de l'EMT. D'un point de vue moléculaire, la voie de signalisation de ce facteur de croissance est composée d'un récepteur qui par sa fixation avec son ligand permet la phosphorylation de SMAD2 et SMAD3. Cette phosphorylation entraîne alors la formation d'un complexe avec SMAD4. Ce complexe peut alors migrer au sein du noyau pour réaliser son rôle de facteur de transcription afin de réguler un grand panel de gènes impliqués dans l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux. Dans ce set de gènes on retrouve ceux des EMT-TF par une régulation positive de façon directe pour *Snail et Snai2*, on parle alors de mécanisme Smad dépendant^{79,81} et de façon indirecte pour

Zeb1 (la protéine Zeb1 ayant pour ancien nom deltaEF1)⁸² et *Twist1*⁸³. Il est intéressant de noter qu'après la mise en place de l'EMT par l'expression des EMT-TF qu'un mécanisme de rétrocontrôle positif se met en place, notamment par une augmentation de production de TGFβ par les cellules qui par effet autocrine permet le maintien du programme d'EMT⁸⁴. D'autres réponses, au nombre de trois, dites Smad indépendante peuvent s'effectuer lors de la fixation de TGFβ sur son récepteur, pouvant alors activer une réponse MAPK, Rho GTPases ou PI3K/AKT⁸⁵. Nous verrons par la suite que ces voies Smad-indépendantes jouent aussi un lien pour l'induction du processus EMT. Enfin dernier point sur les mécanismes moléculaires de l'induction des voies par TGFβ, qui est la régulation de l'expression de microARN et les longs ARN non codants. La famille de miR-200 est un exemple de régulateur négatif de ZEB1, qui est lui-même négativement contrôlé par ZEB1, avec une existence d'une balance miR-200/ZEB1. Comme nous l'avons vu, l'induction des EMT-TF entraîne une boucle positive autocrine de TGFβ, cette boucle joue alors un rôle sur le maintien de l'EMT. En effet, l'induction du signal de TGFβ permet la répression de miR-200, qui sur le long terme permet l'hyperméthylation réversible de loci de miR-200 et donc un maintien de sa répression, déséquilibrant la balance miR-200/ZEB1 sur le maintien du programme d'EMT⁸⁶. En se replaçant maintenant dans des conditions physiologiques, il est intéressant de souligner que des niveaux élevés de TGFβ sont associés lors de fibroses pathologiques, et sont alors un environnement propice pour le développement tumoral. Dans ces conditions pathologiques, TGFβ se retrouve libéré de façon importante par les fibroblastes du stroma, ce qui participe au maintien de la fibrose⁸⁷. Autre que son rôle possible en amont de la transformation néoplasique, la concentration de TGFβ augmente aussi lors du développement tumoral, cette augmentation de concentration étant étroitement liée par les mécanismes d'activation du stroma par le stress associé au développement de la tumeur (diminution du pH, hypoxie, stress oxydant, déplétion nutritive)⁸⁸. L'activation des fibroblastes en myofibroblastes potentialise alors le processus d'EMT, la progression tumorale ainsi que la migration métastatique, l'exemple chez la prostate montrant très bien la progression des lésions hyperplasiques de la prostate en carcinome invasif ainsi que métastatique⁸⁹. Dans ce contexte, le TGFβ a une double fonction, la première, le maintien du phénotype activé des fibroblastes et le second comme nous l'avons vu, l'activation du processus de l'EMT ou du moins pousser sur sa mise en place⁹⁰.

En lien, nous allons le voir, avec TGFβ, la voie WNT joue aussi un rôle sur la mise en place du programme de l'EMT. Cette voie moléculaire se définit par une réponse de la fixation de l'un des 19 ligands de la famille Wnt avec l'un des récepteurs membranaires de la famille de Frizzled. Cette voie comporte en réalité trois voies de signalisation, la voie canonique, celles non canoniques calcium dépendant et la dernière, la voie de polarité cellulaire planaire non canonique⁹¹. La voie canonique, la mieux étudiée, joue un rôle important sur le programme d'EMT. Cette voie est définie par l'activation de la β-caténine cytosolique par sa translocation dans le noyau. La liaison d'un ligand WNT sur un récepteur Frizzled, permet l'inhibition de GSK3β, et ainsi lever son activité kinase sur la β-caténine, n'étant plus phosphorylée, la protéine n'est alors plus ubiquitinylée et dégradée, permettant alors sa translocation dans le noyau et ainsi servir de cofacteur pour la régulation d'un ensemble de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, l'orientation phénotypique de différenciation, ainsi que la prolifération⁹². Au niveau de l'induction de l'EMT, des expériences *in vitro* ont montré que le

ligand WNT3A par son induction de la voie canonique, permet l'expression de TWIST, SLUG ainsi que la N-Cadhérine tout en réprimant l'E-Cadhérine dans des cellules cancéreuses mammaires HER⁺ ⁹³. Dans une autre expérience, il a été montré que la mise en place de l'EMT par ZEB1 dans la région invasive du carcinome colorectal s'effectue préférentiellement au sein des cellules qui ont eu en amont une translocation de la β -caténine, mettant en lumière son rôle sur la mise en place du processus d'EMT⁹⁴. Enfin la β -caténine en plus de son rôle régulateur de SNAIL⁹⁵, il peut par son interaction avec l'EMT-TF potentialiser son activité sur les gènes régulés par la voie WNT⁹⁶. De plus, il est intéressant de voir que la voie du TGF β et celle de WNT canonique sont étroitement liées lors du processus d'EMT. Ce lien étant très bien mis en évidence sur des travaux de Kelly J. Gauger *et al.*. Dans cette étude, ils mettent en évidence que la sous-expression de la protéine SFRP1, un régulateur négatif de la voie WNT par interaction avec les protéines Wnt et par formation de complexe inactif avec les récepteurs Frizzled⁹⁷, permet dans des cellules mammaires tumorales *in vitro* une augmentation de la sensibilité à l'induction de l'EMT par la voie du TGF β , mettant ainsi en lumière une coopération entre ces deux voies⁹⁸. À l'inverse, la voie du TGF β semble aussi potentialiser celle de WNT par la restructuration du cytosquelette de la cellule et de la perte de polarité induite lors de son induction. Comme nous l'avons vu lors de l'induction de la voie TGF β , l'une des voies de signalisation possible était celle de Rho GTPases. Son activation a pour conséquence un remodelage du cytosquelette, la formation de lamellipode et de filopode, notamment par l'induction rapide de l'expression de RHOA⁹⁹. Cependant, il est intéressant de voir qu'au niveau des cellules épithéliales, polarisées, le récepteur II de TGF β a tendance à se situer au niveau apical de la cellule tout particulièrement au niveau des jonctions serrées. Il peut alors lors de sa fixation avec son ligand phosphoryler PAR6 permettre le recrutement d'une ligase d'ubiquitine E3, SMURF1, qui va lui-même et de façon locale ubiquitinyler RHOA et ainsi entraîner via la dégradation de RHOA, la déstabilisation des jonctions serrées¹⁰⁰. Cet ensemble de remodelage de la polarité cellulaire et donc de l'identité épithéliale semble faire écho aux travaux de Ruba Halaoui *et al.* expliqués précédemment avec la mise en évidence d'une diminution de polarité lors d'une hyperplasie mammaire. De plus, cette perte de polarité s'accompagne aussi de la perte des jonctions adhérentes. Or, le complexe protéique de ces jonctions nécessite l'interaction entre l'E-Cadhérine ainsi que de la β -caténine. Il est alors assez intuitif que lors d'une induction du processus de l'EMT par TGF β la déstructuration par la diminution de l'expression de l'E-Cadhérine permette en parallèle d'augmenter la quantité de β -caténines libre dans le cytosol, essentiel à l'induction de la voie WNT.

En plus de la voie WNT, la voie NOTCH qui a la capacité d'induire le processus d'EMT, coopère aussi avec celle du TGF β . Cette voie est impliquée dans le contrôle de la décision de l'orientation phénotypique de différenciation des cellules, la différenciation ainsi que la prolifération. D'un point de vue moléculaire, les récepteurs membranaires NOTCH, au nombre de quatre, déclenchent lors de leur fixation avec leurs ligands (les familles Delta-like et Jagged) un mécanisme de *shedding*. Ce mécanisme protéolytique permet de cliver la partie intracellulaire de NOTCH, cette partie cytosolique libre étant active va ensuite être transloquée dans le noyau qui par son association avec différents partenaires permet l'expression d'un set de gènes¹⁰¹. Tout comme les deux autres voies, celle de NOTCH joue un rôle lors de développement embryonnaire notamment en permettant la mise en place du processus de

l'EMT¹⁰². Son implication dans un contexte tumoral a été aussi mise en évidence¹⁰³. Cette voie peut activer l'EMT par sa régulation directe d'EMT-TF, tout particulièrement SNAIL¹⁰⁴ et SLUG¹⁰⁵. Comme je l'ai dit en introduisant la voie NOTCH, cette voie a aussi une coopération avec la voie du TGFβ lors de la mise en place du programme d'EMT. Cette coopération s'effectue principalement par des associations directes entre la forme cytosolique de NOTCH avec les facteurs SMAD, permettant le contrôle de l'expression de gènes¹⁰⁶. Dans un contexte de fibrose, l'induction de la voie du TGFβ entraîne une augmentation de l'expression de Jagged1, l'un des ligands majeurs de cette voie, soutenant alors de façon autocrine l'état pathologique du tissu¹⁰⁷. Il est à noter que la collaboration entre les voies NOTCH et du TGFβ semble plus complexe qu'une co-activation similaire entre chaque isoformes du récepteur NOTCH. En effet, il a été montré que dans le tissu épithélial œsophagien que dans le tissu sain l'activation de NOTCH1, suivie de celui de NOTCH3 permet la différenciation terminale de l'épithélium stratifié. NOTCH3 à l'inverse de NOTCH1 a tendance à réprimer le processus de l'EMT, permettant ainsi d'acquérir le phénotype différencier de l'épithélium. Or, dans un contexte tumoral, notamment au niveau du front d'invasion de la tumeur où se situe la concentration élevée de TGFβ sécrété par les cellules du stroma, l'activation de la voie du TGFβ permet la mise en place du processus de l'EMT, via l'augmentation de l'expression de *Zeb1* qui va lui-même réprimer l'expression de *Notch3*. Ces cellules ayant l'incapacité de finir leur processus de différenciation et donc d'acquérir une identité cellulaire voient leur statut indifférencié bloqué, leur conférant alors un statut de cellule cancéreuse dynamiquement dédifférenciée¹⁰³.

Enfin la dernière voie que je développerai, qui est aussi essentielle pour le développement embryonnaire et qui a aussi la capacité d'induire le processus de l'EMT, est la voie Hedgehog. Cette voie se caractérise par une famille de protéines solubles extracellulaires nommée Hedgehog. Cette famille est composée de trois protéines qui exercent des fonctions différentes, nous avons Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) et Desert Hedgehog (DHH). SHH est celui qui est le plus connu des trois, notamment pour son rôle dans le développement embryonnaire. Après une diffusion dans l'organisme qui peut être s'effectuer sur de longue distance, SHH peut se fixer à son récepteur membranaire PTC au niveau de la membrane plasmique de la cellule. Ce récepteur PTC a comme fonction lorsqu'il n'est pas lié à SHH, de se fixer à une autre protéine membranaire SMO inhibant ainsi son activation. Lorsque SHH se fixe à PTC, le changement structural de la protéine permet son détachement à SMO et peut exercer sa fonction induisant une voie de phosphorylation jusqu'à l'activation du facteur de transcription GLI. Ce facteur de transcription a notamment la capacité de réguler positivement l'expression de *Snail1* qui permet alors la mise en place du processus de l'EMT¹⁰⁸. Enfin il est à noter qu'il existe une activation de GLI1 et 2 indépendante de la voie de Hedgehog, et qui s'effectuerait via l'activation de la voie du TGFβ dépendante aux protéines SMAD¹⁰⁹.

En plus des voies que nous venons de voir et leur rôle dans le développement embryonnaire, cicatriciel, l'état pathologique comme la fibrose, ainsi que le développement tumoral, les mécanismes de cicatrisation et de l'activation du stroma sont aussi très souvent accompagnés du processus d'inflammation constituant des signaux nécessaires au développement de l'EMT néoplasique. Un ensemble de cytokines, en plus du TGFβ, sont nécessaire pour la mise en place du processus inflammatoire, notamment l'Interleukine-6 (IL-6) ou encore l'Oncostatine M

(OSM), qui par leur fixation à leur récepteur permettent l'activation des facteurs STAT3 permettant la mise en place de l'EMT^{110,111}. Un point intéressant est la présence d'une coopération entre l'induction de la voie par l'OSM et celle du TGFβ dépendante à Smad. Notamment par la mise en place d'une interaction physique entre les facteurs STAT3 et SMAD3, impliquée dans l'activation du gène d'un EMT-TF, *Snail*. Cette coopération met en lumière d'une coordination des voies répondant aux signaux issus des altérations physiques, de l'activation des fibroblastes du stroma, ainsi que des cellules de l'immunité pour la mise en place du programme de l'EMT¹¹¹. Bien qu'important l'activation de STAT3 nécessite une coopération avec d'autres médiateurs de l'inflammation comme TNFα ou encore la chimiokine CCL18^{112,113}. L'ensemble de ces facteurs comme ceux que nous avons déjà vu précédemment peuvent accompagner le développement tumoral sur des temps précoces, tout particulièrement lorsqu'une pathologie préexiste au niveau du tissu, comme la fibrose pulmonaire ou encore la cirrhose hépatique. En dehors d'un terrain tissulaire promouvant le développement tumoral, les perturbations induites par la tumeur en elle-même peuvent être le moteur du processus d'EMT.

L'une des conséquences du développement tumoral est la mise en place d'un environnement pauvre en oxygène, l'hypoxie, ainsi qu'une augmentation du stress oxydant. Face à ces changements environnementaux, les cellules mettent en place des réponses cellulaires grâce aux facteurs de type HIF (*Hypoxia Inducible Factor*). L'une des conséquences de l'activité de ces facteurs est l'induction directe ou indirecte du programme de l'EMT¹¹⁴. La première observation démontrant l'activation directe d'un EMT-TF a été faite par MH Yang *et al.*, montrant que HIF1-α régule l'expression du gène *Twist1*. Ainsi lorsque l'EMT-TF était inhibé, la présence du facteur HIF1-α constitutivement actif par une mutation sur son domaine de dégradation de l'oxygène, ne pouvait plus induire le processus de l'EMT mettant en lumière le lien entre TWIST et HIF1-α. De plus, cette inhibition de TWIST permettait aussi la perte de la mise en place du processus métastatique d'une lignée de carcinome pharyngé (FaDu), malgré l'expression de HIF1-α mutante, insensible au taux d'oxygène¹¹⁵. De la même manière, il a été montré dans le cancer colorectal que HIF1-α a aussi la capacité d'induire de façon directe l'expression d'un autre EMT-TF, ZEB1¹¹⁶. En parallèle, il a été démontré que HIF1-α avait aussi la capacité d'induire les EMT-TF par des mécanismes indirects. L'un de ces mécanismes est la modification par HIF1-α de l'expression de régulateurs épigénétiques comme l'histone déacétylase HDAC3 et la méthyltransférase WDR5. Ces facteurs n'ont pas de fonctions d'induction d'expression d'EMT-TF, mais jouent un rôle sur le contrôle de l'activité transcriptionnelle des EMT-TF. Ils permettent ainsi par leur activité de régulation des histones d'aider SNAIL1 à la répression des gènes associés au phénotype épithéliale¹¹⁷. De plus, la mise en place du programme de l'EMT peut aussi passer par les voies que j'ai décrites précédemment. Dans ce contexte l'hypoxie n'a pas un rôle d'inducteur des EMT-TF, mais un rôle de potentialisateur de la mise en place du programme de l'EMT. On retrouve ainsi plusieurs des voies permettant l'expression des EMT-TF, notamment la voie NOTCH¹¹⁸, du TGFβ¹¹⁹, ainsi que Hedgehog¹²⁰.

Nous venons de voir que la régulation de l'identité épithéliale par le programme de l'EMT s'effectue par un ensemble de voies cellulaires décrites à l'origine pour leur rôle au développement embryonnaire. La mise en place de ces mécanismes est basée en grande partie sur des modifications homéostatiques du tissu, et leurs coordinations permettent dans un

contexte sain d'effectuer un processus régénératif, voir développer des pathologies telles que la fibrose si le tissu ne peut rééquilibrer son homéostasie. Ainsi l'induction de ces mécanismes, qui peut se mettre en place précocement au cours de la transformation néoplasique et dans un second temps lors du développement de la tumeur, semble directement jouer un rôle sur l'induction de l'EMT au cours du processus tumorigénique.

Nous pouvons maintenant nous intéresser aux effets des EMT-TF sur les différentes phases du développement tumoral. Les premières études de l'EMT dans un contexte tumoral ont débuté par son observation lors du développement métastatique, notamment lors des réponses des cellules aux différents signaux évoqués précédemment. Naturellement, l'EMT a été très vite associé à sa capacité à remodeler le phénotype de la cellule cancéreuse afin d'augmenter ses capacités de dissémination. Son remodelage épigénétique et le gain de plasticité cellulaire associé faisaient de ce programme l'une des hypothèses les plus robustes pour expliquer le développement de métastase¹²¹. En modulant génétiquement l'expression d'un EMT-TF, notamment par l'induction *in vivo* de SLUG, il a été montré que l'induction de l'EMT était essentielle pour induire le développement de métastases à partir de cellules cancéreuses qui étaient à l'origine non invasives¹²². De la même manière, il a été aussi mis en évidence le rôle des EMT-TF dans d'autres tissus tels que le pancréas, où l'expression de ZEB1 était nécessaire pour le développement métastatique *in vivo*. Point intéressant, c'est qu'en plus d'impacter le processus métastatique, le développement tumoral est aussi impacté par la délétion de ZEB1 avec notamment des tumeurs contenant des populations cellulaires plus homogènes, moins invasives et constituées de cellules à phénotype plus différencié¹²³. Point intéressant dans le même tissu, lors d'une lésion préneoplasique, la détection de cellules exprimant ZEB1 devient possible au niveau du site primaire de la lésion, mais aussi au niveau de la circulation sanguine. Alors qu'au niveau du site primaire les cellules aux phénotypes ZEB1 positif sont minoritaires, au niveau du système sanguin l'ensemble de la population exprime cet EMT-TF, mettant en lumière le rôle de l'EMT dans les processus d'invasion et de dissémination tumorale. Enfin, en écho avec les voies décrites précédemment et leurs mises en place durant le processus inflammatoire, l'induction d'une inflammation du tissu permet une très forte augmentation de cellules ZEB1 positives circulantes dans le système sanguin. Ceci montre bien une nouvelle fois l'importance du microenvironnement pour la mise en place optimale du programme de l'EMT *in vivo*¹²⁴. Une autre étude, cette fois-ci sur des analyses histologiques de différentes tumeurs, de différents organes (sein, poumon, colon et pancréas) ont mis en évidence l'existence de bourgeons qui se définissent par un ensemble de cellules s'infiltrant dans le stroma tout en étant connectées à la tumeur d'origine. Au sein de ces bourgeons, les cellules semblent avoir subi un processus d'EMT dû à leur morphologie, mais aussi à une expression de ZEB1 plus élevée tout en ayant en parallèle une diminution de l'E-Cadhérine. Une nouvelle fois, la mise en place du programme d'EMT semble jouer un rôle essentiel dans la phase de dissémination de la tumeur, avec une importance élevée de l'implication du stroma dans cette activation¹²⁵. Un autre point intéressant de cette étude et qui permet de nuancer sur ce processus d'EMT, c'est la cohésion cellulaire au sein de ces bourgeons, qui pourrait s'expliquer par une EMT partielle des cellules. Les cellules subiraient alors un remodelage épigénétique via l'EMT sans pour autant aller jusqu'à un phénotype terminal mésenchymateux. Ces études sur la migration des cellules tumorales dans le système sanguin font sortir aujourd'hui un consensus

notamment que la migration qui était pensée comme une migration cellulaire individuelle semble au contraire plutôt s'effectuer de façon collective. Les cellules au sein de ces clusters exprimant pour la plupart des signatures génétiques associées à l'EMT¹²⁶. Une étude du suivi des cellules tumorales circulantes (CTC) de patientes atteintes d'un carcinome mammaire a pu mettre en évidence que ces cellules, présentes dans le sang et à l'origine de la formation de métastases, étaient définies par un continuum phénotypique entre celui complètement épithélial à celui intégralement mésenchymateux. On retrouve une nouvelle fois la notion intéressante de l'existence d'un continuum phénotypique démontrant que le programme de l'EMT *in vivo* serait un programme incomplet où par son induction d'un remodelage phénotypique, en soi une perte d'identité épithéliale de la cellule, permet la dissémination plus que le caractère mésenchymateux en lui-même. De plus, dans la même étude, le suivi des patientes suites à des traitements a pu montrer que le phénotype des CTC était extrêmement dynamique avec une évolution sur ce continuum phénotypique. En gardant cependant des réserves, notamment sur la représentativité du résultat dû à la difficulté de purifier les cellules circulantes dans le sang, ici le niveau définit par les expérimentateurs par rapport aux témoins étant seulement de 5 cellules pour 3 mL de sang¹²⁷. C'est avec des travaux plus tardifs que ce continuum phénotypique lors du processus de l'EMT a été démontré à l'aide notamment de constructions génétiques chez la souris¹²⁸ ou encore *in vitro* à partir d'une lignée mammaire transformée¹²⁹). Ces études ont montré, premièrement, qu'un ensemble de phénotypes hybrides existaient entre une cellule complètement épithéliale et celle complètement mésenchymateuse. Deuxièmement, les cellules phénotypiques hybrides avaient un plus grand pouvoir tumorigénique ainsi que métastatique. Ceci est un point intéressant, car il permet de mettre en évidence qu'une cellule ayant subi un processus de l'EMT complet perd en pouvoir tumorigénique. Par conséquent, ceci semble confirmer que le processus de l'EMT est un puissant modulateur de l'identité cellulaire épithéliale, qui lorsqu'il s'effectue dans son intégralité permet à la cellule d'acquérir une nouvelle identité cette fois-ci mésenchymateuse s'accompagnant d'une diminution du pouvoir tumorigénique et métastatique.

Un dernier aspect important de l'EMT concerne enfin la capacité de ce programme à favoriser les processus initiaux de transformation néoplasique. Cet effet rejoint très directement les premières notions introduites dans ce manuscrit indiquant un rôle vraisemblablement important de la plasticité cellulaire pour l'adaptation de la cellule aux stress homéostatiques induits par les oncogènes. Il a ainsi pu être montré que l'EMT pouvait jouer un rôle essentiel pour le développement précoce des carcinomes. Dans ces conditions, la réacquisition de propriétés normalement retrouvées dans les cellules les plus progénitrices a pu être observée. On trouve notamment parmi ces propriétés la présence de nouvelles configurations épigénétiques enrichies en domaine bivalent favorisant une grande plasticité transcriptomique des gènes présents dans ces domaines¹³⁰. Au niveau mammaire, la première mise en évidence du lien entre EMT, plasticité cellulaire et pouvoir tumorigénique ont été montrés par la transformation néoplasique de cellules mammaires épithéliales immortalisées après induction de l'EMT par traitement au TGF β ou l'expression forcée d'EMT-TF. Ces articles obtenaient la même conclusion, les cellules ayant subi une EMT avaient après la transformation néoplasique des capacités d'initiation tumorale bien plus importante que les cellules épithéliales d'origines^{65,66}. Par la suite, d'autres études ont pu mettre en évidence le rôle des EMT-TF lors de l'initiation

tumorale. Notamment une basée sur un système murin où l'expression d'un oncogène *K-Ras^{mutant}* et *Twist1* sont contrôlées au niveau du tissu mammaire. La résultante est la formation spontanée de tumeurs uniquement si l'oncogène et l'EMT-TF sont simultanément exprimés, montrant ainsi une coopération essentielle dans ce modèle entre l'oncogène et TWIST pour l'initiation tumorale¹³¹. Une autre étude a pu aussi montrer l'implication de SNAIL1 dans l'initiation tumorale. Dans un modèle murin MMTV-PyMT précédemment cité, la délétion de *Snail* permet de diminuer drastiquement la mise en place de l'initiation tumorale. De plus, les lésions préneoplasiques ainsi que la formation de région d'hyperplasie mammaire sont aussi diminuées fortement en l'absence de SNAIL1¹³². Cette étude fait écho aux travaux de Ruba Halaoui *et al.* ayant montré dans un modèle murin similaire que l'évolution tumorale s'accompagnait d'une perte de l'identité épithéliale entraînant une perte de la polarité des cellules⁴⁸. Des protéines de type Rho GTPases étaient associées à cette perte d'identité, elles-mêmes étant régulées par la voie du TGFβ. On retrouve donc dans ce contexte un rôle pour la plupart des voies dont nous avons parlé (Rho GTPases et du TGFβ) dans le contexte de la progression tumorale. Enfin ZEB1 autre EMT-TF joue aussi un rôle dans les processus précoces du développement tumoral. Comme pour SNAIL1, une étude *in vivo* de souris MMTV-PyMT a permis de démontrer le rôle de ZEB1 dans l'initiation tumorale ainsi que pour l'ensemble de la tumorigenèse. Ainsi en absence d'expression de *Zeb1* l'initiation tumorale et le développement métastatique sont très fortement diminués. Et tout comme pour l'inactivation de *Snail1*, la perte de ZEB1 s'accompagne d'une diminution de l'hétérogénéité cellulaire avec des tumeurs plus différenciées¹³³. *In vitro* il a pu être démontré que les cellules aux caractères souches exprimant de façon endogène ZEB1 avaient une résistance accrue face aux stress associés à un oncogène tel que *H-Ras^{mutant}*. Cette résistance permettait notamment aux cellules d'avoir moins de dommage à l'ADN lors de la transformation néoplasique¹⁹.

En conclusion, les modifications de l'identité cellulaire des cellules mammaires sont associées à un remodelage épigénétique permettant l'acquisition d'une plasticité phénotypique, d'où leur comparaison à celui des cellules souches. Le programme de l'EMT est dans ce modèle l'un des mécanismes majeurs de ce remodelage épigénétique et phénotypique, les EMT-TF pouvant avoir alors un rôle essentiel tout au long de la tumorigenèse, de la lésion néoplasique à la dissémination métastatique. En effet, lors du développement tumoral, plusieurs temps forts d'adaptabilités homéostatiques sont nécessaires aux cellules cancéreuses pour résister à la mort cellulaire, notamment lors du stress métabolique associé à l'oncogène, ou encore lors des périodes d'hypoxie, d'inflammation et d'anoïkis. L'une des possibilités à la plus grande souplesse homéostatique de la cellule serait la capacité des reprogrammations génétiques et épigénétiques à permettre une sortie des cellules précédemment différenciées de sortir de leur cadre métabolique rigide afin de s'adapter aux changements intrin- et extrinsèques imposés par les processus de transformation néoplasique et de progression tumorale. Dans ce contexte, l'augmentation des possibilités transcriptomiques associée à ce remodelage génétique, grâce à une ouverture chromatiniennne, permettrait alors une plus grande flexibilité métabolique. Cette flexibilité se traduirait notamment par la capacité à la cellule à modifier son pool enzymatique afin de réguler ses flux métaboliques. L'adoption d'un cadre métabolique plus permissif permettrait alors une meilleure adaptation homéostatique évitant ainsi l'induction de la mort cellulaire.

5. Métabolisme associé à l'acquisition d'un phénotype au caractère souche

Nous venons de voir que les mécanismes de plasticité cellulaire et de perte d'identité cellulaire étaient associés à un phénotype que j'ai nommé cellule cancéreuse dynamiquement dédifférenciée. Par l'acquisition de ce phénotype, les cellules auraient alors la possibilité d'effectuer une modulation métabolique leur permettant de résister aux stress cellulaires rencontrés durant le processus tumoral. Je vais donc dans un premier temps refaire un court rappel sur le métabolisme bioénergétique pour aborder la vision historique de ce métabolisme dans un contexte tumoral. Le métabolisme bioénergétique étant fortement associé à la production d'espèces réactives de l'oxygène, nous verrons ensuite que l'étude de ces deux composantes a permis de largement nuancer la vision du métabolisme dans le contexte tumoral. Enfin, je finirai par le rôle du métabolisme dans la modulation des processus épigénétique. L'ensemble de ces observations permettent de mettre en lumière la forte implication du métabolisme dans l'acquisition d'un phénotype cellulaire plastique et à l'hétérogénéité tumorale.

Pour rappel, deux types de voies métaboliques permettent la production d'énergie à partir du glucose. La première, la glycolyse, s'effectue en absence d'oxygène et permet la conversion du glucose en lactate. Elle est très peu rentable avec la formation de seulement 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. La réduction du pyruvate en lactate servant alors pour la régénération du NAD^+ en oxydant le NADH . En présence d'oxygène, les cellules peuvent effectuer une phosphorylation oxydative (OXPHOS). Cette voie s'effectue au niveau des mitochondries, qui après oxydation du NADH ou du FADH_2 provenant des voies cataboliques (glycolyse, cycle de Krebs, β -oxydation), permet par gradient électrochimique de proton de faire tourner l'enzyme ATP synthase et ainsi produite de l'ATP. L'OXPHOS est en comparaison de la glycolyse bien plus rentable avec la formation de 36 molécules d'ATP par molécule de glucose. C'est avec la découverte d'Otto Warburg, qu'il a été démontré que les cellules cancéreuses en présence de forte concentration de glucose et en présence d'oxygène généraient de l'ATP non pas par la respiration, mais par la glycolyse, c'est ce qu'on appelle l'effet Warburg¹³⁴. À l'origine expliqué par une déficience des mitochondries, il s'avère que cet effet est dû à plusieurs mécanismes. Premièrement, la vitesse de la glycolyse est nettement supérieure à celle de la respiration, ce qui dans un environnement riche en glucose peut être un avantage en étant plus compétitif face aux cellules saines¹³⁵. Deuxièmement, les cellules par cet effet ont un avantage lorsque l'environnement est pauvre en oxygène. La réponse génétique par la voie de HIF1 permet alors la mise en place d'un métabolisme glycolytique¹³⁵. Il est à noter cependant que des formes de leucémie qui ont un environnement riche en oxygène peuvent aussi avoir un métabolisme glycolytique mettant l'hypoxie dans un second plan. Troisièmement, la mise en place d'un flux élevé de la glycolyse permet d'augmenter le flux sur les voies anaboliques permettant alors la synthèse des biomolécules (acides nucléiques, lipides, protéines), mais aussi celle de la voie des pentoses phosphates pour la formation du NADPH , l'ensemble permettant de maintenir une forte prolifération et une balance redox. En contrepartie de ce métabolisme, la cellule devient

alors dépendante d'un réapprovisionnement constant du cycle de Krebs en molécules permettant son maintien. Ce réapprovisionnement s'effectue par réactions anaplerotiques comme celle du pyruvate en oxaloacétate ou encore celle en deux réactions de la glutamine en glutamate puis dans un second temps du glutamate en α -cétoglutarate¹³⁶.

Il est cependant à noter qu'au cours du XX^e siècle, notamment après la découverte de Warburg, le domaine du métabolisme a dû faire face à des problèmes conceptuels, des limitations techniques et un manque d'intérêt, ce qui engendra progressivement l'installation d'un « dogme » dans laquelle les cellules cancéreuses auraient un schéma métabolique fixe. Or aujourd'hui, plusieurs travaux tendent à monter l'hétérogénéité métabolique et la flexibilité des flux, notamment que les cellules cancéreuses peuvent avoir une respiration oxydative et/ou une glycolyse^{137,138}. Cette démonstration est très bien étudiée avec les travaux d'An S. Tan *et al.*¹³⁸. En effet, ils ont créé à partir d'une lignée mammaire, une nouvelle lignée dans laquelle les cellules n'ont plus d'ADN mitochondrial en réponse à un traitement à faible concentration de bromure d'éthidium¹³⁹, forçant ainsi la mise en place d'un métabolisme glycolytique. Ils ont pu dans un premier temps montrer que ces cellules nommées 4T1p0 avaient lorsqu'on les injectait dans des souris une latence d'une vingtaine de jours pour une prise tumorale par rapport à la lignée de contrôle, qui avait encore un métabolisme OXPHOS viable. Dans un second temps, après l'injection des 4T1p0 et le développement de tumeurs, ils ont récupéré des cellules provenant de la tumeur primaire, celles en circulation dans le système sanguin et celles de métastases pulmonaires, donnant respectivement 4T1p0SC, 4T1p0CTC et 4T1p0SCL. Ils ont alors remarqué deux points. Premièrement, les cellules récupéraient un système respiratoire et ceci de façon croissante tout au long de la tumorigénèse. Ainsi les cellules de la tumeur primaire avaient un métabolisme OXPHOS plus important que celles d'origine 4T1p0. Les cellules circulantes avaient une respiration encore plus importante que les cellules de la tumeur primaire et de même pour les cellules métastatiques qui étaient encore plus OXPHOS que les cellules circulantes. Le point important étant que les cellules provenant des métastases avaient un métabolisme OXPHOS qui dépassait celui des cellules contrôle 4T1. Cette récupération des complexes respiratoires permettant un métabolisme OXPHOS se ferait à partir d'un regain d'ADN mitochondrial au sein des cellules, probablement dû à des mécanismes de transfert de mitochondrie avec les cellules de l'hôte¹⁴⁰. Deuxièmement, un lien direct existe entre le niveau du métabolisme OXPHOS et celui de l'initiation tumorale ainsi que la vitesse de sa progression. Plus les cellules ont un métabolisme OXPHOS, plus elles ont un pouvoir tumorigénique élevé. Il faut cependant garder quelques réserves sur leur conclusion. Il est plus probable que ce ne soit pas le métabolisme OXPHOS en tant que tel qui permet d'acquérir un pouvoir tumorigénique, mais certainement la capacité des cellules les plus plastiques à moduler leur métabolisme afin de s'adapter à son environnement. Ainsi les cellules 4T1p0, sans ADN mitochondrial, ne peuvent pas moduler leur métabolisme étant uniquement glycolytique et sont donc fermées dans une identité cellulaire. Cette identité fixée ne leur permet alors pas d'acquérir une plasticité cellulaire qui permettrait la formation de métastases. À l'inverse, lorsque les cellules peuvent réacquérir la capacité d'effectuer une phosphorylation oxydative, les cellules ne sont plus fixées dans cette identité glycolytique et peuvent donc s'adapter à différents environnements. C'est pourquoi les cellules métastatiques qui proviennent du tissu pulmonaire ont acquis un métabolisme OXPHOS en cohérence avec un environnement riche en oxygène.

Plusieurs travaux ont alors tenté de déterminer le métabolisme bioénergétique des cellules aux caractères souches, les cellules cancéreuses dynamiquement dédifférenciées (CCDD) afin de s'en servir comme cible thérapeutique. Historiquement, la détermination de la bioénergie de ces cellules s'effectuait par analogie avec les cellules souches pluripotentes (*induced pluripotent stem cell* : iPS). Ce raisonnement se basait sur le fait que les iPS et les cellules souches cancéreuses avaient pour origines un remodelage épigénétique de cellules différenciées en celles aux caractères souches. La dédifférenciation des cellules somatiques en iPS s'accompagnant toujours d'une modification du métabolisme des cellules passant d'un système de phosphorylation oxydative à celui glycolytique¹³⁵. En accord avec ces observations, plusieurs études sur différents tissus ont mis en évidence un métabolisme préférentiellement glycolytique chez les CCDD¹⁴¹⁻¹⁴³. Cette modification métabolique se traduisant toujours par une augmentation de la consommation de glucose, l'expression des gènes associés aux enzymes glycolytiques, ainsi que la production de lactate en comparaison des cellules différenciées. Tout comme les iPS, les CCDD auraient un changement métabolique se traduisant par une perte d'activité OXPHOS pour devenir plus glycolytique en comparaison des cellules différenciées. Des travaux proches de ceux d'An S. Tan *et al.* ont permis de démontrer que des cellules mammaires normales (MCF10A) ou cancéreuses (MCF7) dans lesquelles l'ADN mitochondrial a été délété forçant un métabolisme glycolytique subissaient un processus d'EMT leur permettant d'acquérir un phénotype associé à celui des fibroblastes augmentant alors leur potentiel migratoire. Ces résultats mettent alors en lumière que le processus de l'EMT permet aux cellules luminales normales (MCF10A) et cancéreuses (MCF7) de sortir de leur cadre métabolique rigide dépendant de la phosphorylation oxydative pour l'acquisition d'un métabolisme glycolytique. Une divergence forte apparaît donc entre ces résultats obtenus *in vitro* et les données obtenues chez la souris montrant que le potentiel tumorigénique et les processus d'invasions reposent sur des propriétés oxydatives. Les conditions nutritives et les différences microenvironnementales présentes dans ces différents systèmes expérimentaux ont sans doute un rôle important dans cette divergence de résultats. D'autre part, ils suggèrent que le métabolisme des CCDD, plus que glycolytique ou oxydatif, peut se conceptualiser surtout comme un métabolisme flexible et adaptable. En effet, lorsque les cellules sont étudiées *in vitro*, les mécanismes de réacquisition d'ADN mitochondriale ne sont pas possibles et un environnement biochimique stable fortement glucidique est couramment utilisé nécessitant alors une adaptation glycolytique. In situ en revanche, dans un contexte *in vivo* cette même réacquisition d'ADN mitochondriale est possible et un mix nutritif large est le plus souvent présent dans lequel le glucose ne constitue pas forcément un apport majoritaire. Pour continuer dans ce sens, il a pu être montré que cette adaptabilité métabolique se retrouve dans d'autres situations associées à l'EMT. *In vitro* par exemple, SNAIL favorise la répression du gène codant l'enzyme Fructose-1.6-biphosphatase (FBP1) qui est essentielle lors de la néoglucogenèse. SNAIL bloque ainsi le flux rétrograde de la glycolyse forçant alors la cellule à acquérir un métabolisme glycolytique. Alternativement, les co-activateurs de la transcription PGC1 α joueraient un rôle important lors de l'invasion et la migration des cellules cancéreuses *in vivo*. En effet, ce co-activateur a pour fonction principale d'augmenter la biogenèse mitochondriale et ainsi augmenter le métabolisme respiratoire. Le rôle de PGC1 α a notamment été mis en évidence chez les cellules tumorales circulantes lors du processus métastatique dans le modèle 4T1¹⁴⁴. Ce co-activateur se retrouve aussi surexprimé au sein de lignées de mélanomes

invasives particulièrement résistantes au stress oxydant et donc adaptées au métabolisme oxydatif¹⁴⁵. Ces résultats non exhaustifs tendent donc à confirmer la capacité des processus d'EMT impliqués dans les mécanismes d'invasion et la survie des cellules cancéreuses circulantes à favoriser selon les conditions un métabolisme plus ou moins glycolytique ou oxydatif. Ce concept de flexibilité métabolique qui peut même se définir comme de la plasticité métabolique est bien sûr à raccrocher à la plasticité génétique globale associée aux CCDD et possède des conséquences fortes sur les propriétés métastatiques de ces CCDD. Le métabolisme bioénergétique au niveau des métastases est par exemple corrélé de façon différentielle à l'organe cible soutenant une nouvelle fois l'hypothèse d'une grande capacité métabolique de ces CCDD. Dans le cas de tumeurs mammaires par exemple, une métastase au niveau pulmonaire aura un métabolisme OXPHOS dû à une forte concentration d'oxygènes tandis qu'au niveau des métastases du foie les cellules auront un métabolisme plus glycolytique probablement en lien avec la fonction de l'organe notamment celle du stockage du glucose¹⁴⁶.

Dans un cadre tumoral, les cellules peuvent moduler leurs voies bioénergétiques, mais aussi augmenter leur voie de biosynthèse supportant une vitesse proliférative aberrante. Or l'une des conséquences intrinsèques au métabolisme cellulaire lié aux multiples réactions d'oxydoréductions est la formation de ROS, principalement lors de la respiration¹⁴⁷ et de la synthèse protéique au sein du réticulum endoplasmique¹⁴⁸. La famille des ROS est composée d'un ensemble de molécules radicales ou non. La molécule majeure des ROS est l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui suite à différentes étapes de détoxification va générer d'autres ROS comme le radical hydroxyle ($\cdot OH$), les radicaux peroxy ($ROO\cdot$) ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En effet, l' H_2O_2 , produit par la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ via les enzymes superoxide dismutase (SOD), possède une durée de vie très longue en comparaison des autres ROS. En présence d'ions Fe^{2+} l' H_2O_2 peut subir une réaction de Fenton, générant une molécule extrêmement réactive l' $\cdot OH$, qui peut alors endommager les biomolécules (lipides, protéines, ADN) par oxydation et donc altérer leurs fonctions. Une trop grande production de ROS peut se finaliser par la mort cellulaire. C'est pourquoi les cellules possèdent plusieurs systèmes de détoxification. La mise en place du programme de détoxification s'effectue à partir d'une voie majeure, notamment celle du *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2)¹⁴⁹. Lorsque la balance redox est à l'équilibre, NRF2 peut interagir avec la protéine *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1), qui va l'ubiquitinyler et ainsi entraîner sa dégradation. En revanche à partir d'un certain point de concentration en ROS, KEAP1 est inactivée probablement dû à l'attaque oxydative au niveau des régions riches en cystéines, ne pouvant alors plus ubiquitinyler NRF2, celui-ci pourra alors être transloqué dans le noyau afin de réguler un set de gènes¹⁵⁰. L'ensemble des gènes associés à la réponse de détoxification se regroupe en plusieurs familles, celle liée au métabolisme du Glutathion, la molécule clé de la réduction des molécules oxydées de la cellule. En lien avec le Glutathion, les enzymes permettant sa régénération ainsi que la voie de synthèse du NADPH sont aussi régulées par NRF2. Enfin, il régule les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'hème et du fer telles que HMOX, FTH1 et FTL1, ou encore ceux du métabolisme des quinones comme NQO1.

Le métabolisme des ROS joue un rôle important lors du processus de la tumorigenèse. En effet, l'activité des ROS tend à promouvoir le processus de tumorigenèse par déstabilisation du génome. Cependant, un excès de ROS au sein des cellules même cancéreuses peut devenir

délétère et induire la mort cellulaire. Les cellules cancéreuses ont en réponse à cette surexposition aux ROS une augmentation de la voie NRF2. Paradoxalement, cette augmentation d'activité de NRF2 lors de l'initiation tumorale, qui semble contrer les effets protumorigéniques des ROS permet à l'inverse une meilleure mise en place du processus tumorigénique¹⁴². L'équipe de M.S. Wicha a pu mettre en évidence dans leurs travaux l'existence de deux sous-types de CCDD au sein d'une même tumeur. En lien avec ce que nous avons vu sur le programme de l'EMT, la première définit par un marquage CD44⁺/CD24⁻, présente des caractères mésenchymateux avec une capacité d'invasion accrue et un état quiescent (M-CCDD). À l'inverse la seconde définie par le marquage ALDH⁺ présente des caractères épithéliaux, à fort niveau de prolifération (E-CCDD). Même si dans leur modèle, ils n'ont pas observé d'hybride E/M défini, ils ont tout de même observé une capacité de ces cellules à effectuer une interconversion entre ces deux sous-types de CCDD en réponse au changement du microenvironnement¹⁵¹. La même équipe a ensuite mis en évidence que dans un modèle de tumeurs mammaires triples négatives que cette transition s'effectuait en réponse à des variations du métabolisme et notamment celui des ROS¹⁵². Premièrement, ils ont démontré que les E-CCDD avaient un métabolisme glycolytique couplé à une phosphorylation oxydative. Ce type de métabolisme rentre en adéquation avec le caractère prolifératif de ces cellules. En effet, la respiration permet d'avoir des avantages prolifératifs via plusieurs conséquences lors de sa mise en place. Elle permet dans un premier temps de produire de l'ATP essentielle à la prolifération. Deuxièmement, elle permet en conséquence de pousser les flux sur les branches anaboliques reliées à la glycolyse qui produisent les briques pour la division cellulaire. Enfin comme il est montré dans leurs travaux, la mise en place de la respiration couplée à une division cellulaire soutenue permet une production de ROS qui vont stabiliser HIF1- α permettant alors l'augmentation des enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose et la glycolyse. Les cellules peuvent alors acquérir un cercle vertueux d'un point de vue prolifératif. À l'inverse, les cellules M-CCDD quiescentes sont majoritairement glycolytiques et ont une faible production de ROS probablement dû à une prolifération moins soutenue. De plus, le niveau d'expression de NRF2 est plus élevé chez les E-CCDD ainsi que les gènes associés à son activité. Enfin ils mettent en évidence que le niveau du stress induit par les ROS permet aux CCDD de passer d'un phénotype mésenchymateux à épithélial et de façon réversible. Un traitement à l'H₂O₂ ou une hypoxie permet une transition M- en E- CCDD, jusqu'à entraîner une différenciation des E-CCDD lorsque la réponse de détoxification devient insuffisante face au stress oxydant. À l'inverse, un traitement par un agent réducteur comme le N-acétyl cystéine permet d'effectuer une transition E- en M- CCDD. Ce mécanisme dynamique passerait en outre la stabilisation de HIF1- α notamment par une augmentation de la concentration des ROS¹⁵³ couplé à un environnement appauvri en oxygène¹⁵⁴.

Je vais tenter maintenant de contextualiser ces observations en me replaçant dans un cadre tissulaire et en faisant des liens avec les mécanismes que j'ai détaillés plus tôt. Comme ils l'ont montré dans leurs précédents travaux¹⁵¹, les E-CCDD se situent au niveau du cœur de la tumeur tandis que les M-CCDD se retrouvent au niveau du front de la tumeur. Il est donc justifiable de poser un modèle où la raréfaction en oxygène couplé à un métabolisme prolifératif producteur de ROS pousse sur la mise en place d'une réponse de HIF1- α . Cette réponse serait alors couplée à une augmentation de NRF2, et donc à l'augmentation de l'expression de ALDH1A 1 et 3.

Ainsi de façon stochastique, des cellules où le stress n'est plus assez bien régulé rentrent dans un processus de différenciation formant en grande partie la masse tumorale. En parallèle, au niveau des cellules au front de la tumeur et donc au contact des cellules du stroma, l'activation de HIF1- α permet comme je l'avais souligné dans la partie sur l'EMT, de potentialiser l'induction de ce processus de plasticité notamment par la voie du TGF β pour ne citer qu'elle¹¹⁹. La mise en place de l'EMT permet alors aux cellules d'acquérir un métabolisme réducteur de ROS. En effet, l'EMT-TF SNAIL par sa régulation de la phosphofrutokinase permet une augmentation du flux dans la voie des pentoses phosphates, essentiel pour la synthèse de NADPH qui a pour fonction de régénérer les molécules antioxydantes¹⁵⁵. Ces cellules au front de la tumeur acquièrent finalement un phénotype mésenchymateux, moins prolifératif et moins indépendant à l'activation de NRF2. Il est à noter cependant deux points. Premièrement, dans les travaux de l'équipe de M.S. Wicha, ils n'ont pas étudié la réponse de détoxification du fer, qui comme nous le verrons plus tard est lié au métabolisme du fer jouant lui-même un rôle sur l'acquisition de la plasticité cellulaire. Deuxièmement, l'existence d'une faible population double positive CD44⁺/CD24⁻ et ALDH⁺¹⁵¹ sous-entend l'existence de CCDD hydrides avec une adaptabilité métabolique plus importante, qui peuvent être les cellules à l'origine du processus métastatique¹⁴⁶.

Je finirai cette partie par le rôle direct du métabolisme sur la régulation des mécanismes épigénétiques. En effet, moduler les voies métaboliques entraîne forcément des modifications de concentrations de métabolites. Or l'ensemble des modifications épigénétiques nécessite des cofacteurs et des métabolites comme substrat. L'activité des enzymes permettant d'effectuer les réactions des modulations épigénétiques est donc directement associée à la modulation de ces métabolites. Je prendrai pour exemple la méthylation ainsi que l'acétylation des histones qui permettent respectivement la fermeture et l'ouverture de la chromatine. En lien avec le modèle que j'ai exposé sur la plasticité cellulaire qui traduit une augmentation du champ des possibles et l'adaptabilité métabolique, ces deux modulateurs ont un rôle majeur sur le statut de la chromatine. Je commencerai par les mécanismes de déméthylation des histones qui s'effectuent par l'activité de déméthylase. Les *JmJC-containing Lysine demethylases* (KDM) sont des enzymes dépendantes à l'oxygène, aux ions ferreux et qui ont pour substrat l' α -cétoglutarate¹⁵⁶. En lien avec la régulation des processus épigénétique, une étude sur les cellules souches embryonnaires permet de mettre en évidence le rôle que peut avoir le métabolisme sur les mécanismes de plasticité cellulaire. En effet, ils ont notamment démontré que le maintien d'une concentration intracellulaire élevée d' α -cétoglutarate permettait le maintien d'une chromatine ouverte grâce à l'hypométhylation des histones et donc permettaient aux cellules de garder un phénotype souche¹⁵⁷. On peut donc aisément comprendre que la disponibilité de ce métabolite en fonction du contexte environnemental peut jouer un rôle sur les processus de plasticité cellulaire. De façon similaire, le niveau d'acétylation des histones est l'un des mécanismes épigénétiques qui pour rappel permettent notamment d'ouvrir la chromatine permettant alors la transcription des gènes. Les enzymes permettant cette réaction sont des histones acetyltransferase (HAT) et ont pour substrat l'acétyl-CoA. De la même manière que pour l' α -cétoglutarate, une étude sur des cellules souches pluripotentes a mis en évidence le rôle de la concentration en acétyl-CoA de la cellule sur le maintien du phénotype pluripotent. Ils ont notamment montré que le métabolisme glycolytique que l'on retrouve chez les cellules

pluripotentes permettait le maintien d'une concentration élevée d'acétyl-CoA. En maintenant cette concentration élevée, le flux de l'acétyl-CoA va majoritairement vers le maintien de l'acétylation des histones et donc de l'ouverture chromatinienne des cellules. Ce qui est intéressant de voir c'est que le remodelage des flux de l'acétyl-CoA permet de soutenir le processus de différenciation en diminuant l'acétylation des histones. Ainsi l'engagement de l'acétyl-CoA dans le cycle de krebs lors de la phosphorylation oxydative ou la synthèse du cholestérol diminuera le pool d'acétyl-CoA nécessaire pour le maintien du phénotype pluripotent¹⁵⁸.

Nous venons de voir que l'acquisition d'un phénotype de cellule cancéreuse dynamiquement dédifférencié (CCDD) passe par des modulations génétiques et épigénétiques, ces derniers étant excessivement difficiles à mesurer. En effet, l'acquisition potentielle d'une structuration globale de la chromatine spécifique à une plus grande plasticité cellulaire au sein des cellules CCDD¹⁵⁹, pourrait permettre l'utilisation d'outils mesurant ces modifications, tels que l'ATAC-seq, l'HiC ou encore la CHIP-seq. Or ces techniques restent complexes et coûteuses pour leur utilisation dans un contexte de diagnostic médical. Cependant comme nous l'avons vu, ces modulations génétiques et épigénétiques sont associées à un remodelage métabolique. Ces observations sous-entendent notamment que l'acquisition d'un phénotype CCDD doit aussi être accompagnée par un remodelage du métabolisme lipidique. Il semble alors légitime de se poser, par rapport à ces dérégulations impliquées dans le processus de perte d'identité cellulaire, la question de l'existence de propriétés physiologiques des membranes particulières dans ce contexte.

B. Membrane cellulaire, métabolisme lipidique et plasticité cellulaire

1. Généralité

Chez les eucaryotes, les membranes cellulaires permettent de compartimenter des réactions biochimiques. La membrane plasmique définit la cellule elle-même en excluant les espaces intra- et extra- cellulaires. Enfin, d'autres membranes au sein de la cellule permettent de définir d'autres espaces, nommés organites : noyau, réticulum endoplasmique (RE), mitochondrie, appareil de Golgi, peroxyosome, lysosome et autres vésicules. Ces membranes sont composées de deux feuillets lipidiques avec la partie hydrophobe des lipides qui se font face et leur tête hydrophile au contact de l'eau des différents compartiments. Le maintien de son intégrité s'effectue principalement par des interactions hydrophobes et de Van der Waals. Grâce à cette structuration, les membranes permettent un contrôle de la spatialisation des molécules notamment hydrophiles, maintenant les caractéristiques biochimiques des différents espaces cellulaires. D'autres biomolécules peuvent être intégrées au sein des membranes, comme les protéines qui peuvent alors effectuer différentes fonctions. Ainsi chaque organite, membrane plasmique incluse, possède des protéines spécifiques en lien à leur fonction, je prendrai pour exemple les complexes protéiques de la chaîne respiratoire pour la mitochondrie

ou encore la translocation d'ARN par des complexes protéiques formant les pores nucléaire au niveau du noyau.

La majorité des classes lipidiques sont des molécules amphiphiles, à l'exception des triglycérides et des esters de cholestérols, c'est-à-dire composées d'une région hydrophile comportant une polarité et d'une autre région hydrophobe qui n'en comporte pas (Figure 8). Les lipides peuvent avoir différentes fonctions au sein de la cellule. Comme nous venons de le voir, ils permettent la formation des membranes cellulaires, mais elles ont aussi d'autres rôles notamment au niveau de la bioénergie de la cellule qui par la voie de la β -oxydation permet la production d'ATP, ou encore servir comme molécules de signal, et même de substrat pour des modifications post-traductionnelles. La classification des lipides s'effectue par leur structure chimique qui traduit notamment des propriétés spécifiques et permet de regrouper ces derniers en fonction de leur squelette carboné. Alors qu'il est assez facile de concevoir les diversités structurales et fonctionnelles des lipides dans un contexte d'interaction ligand-récepteur lors de la transduction d'un signal, celle dans un cadre de structuration des membranes cellulaires reste encore mâle comprise. Or nous savons aujourd'hui que cette diversité lipidique, au sein des membranes, impacte le comportement des lipides eux-mêmes via leurs interactions, mais aussi l'activité des protéines grâce aux interactions lipide-protéine. De plus, cette diversité lipidique des membranes existe à plusieurs niveaux, entre les feuillettes de la bicouche des membranes, mais aussi entre les membranes constituant la cellule, on trouvera par exemple une composition différente entre le RE et la membrane plasmique. Je vais dans un premier temps faire un rappel sur les lipides et leur structure afin de comprendre leur impact sur les membranes cellulaires. Dans un second temps, je contextualiserai les variations lipidiques et leurs implications lors de la tumorigenèse en lien avec la notion de plasticité et perte d'identité cellulaire. Enfin troisièmement, je ferai un tour d'horizon sur les techniques permettant de suivre un paramètre biophysique des membranes, la fluidité membranaire, qui comme nous le verrons est fortement impactée par la composition lipidique de la membrane.

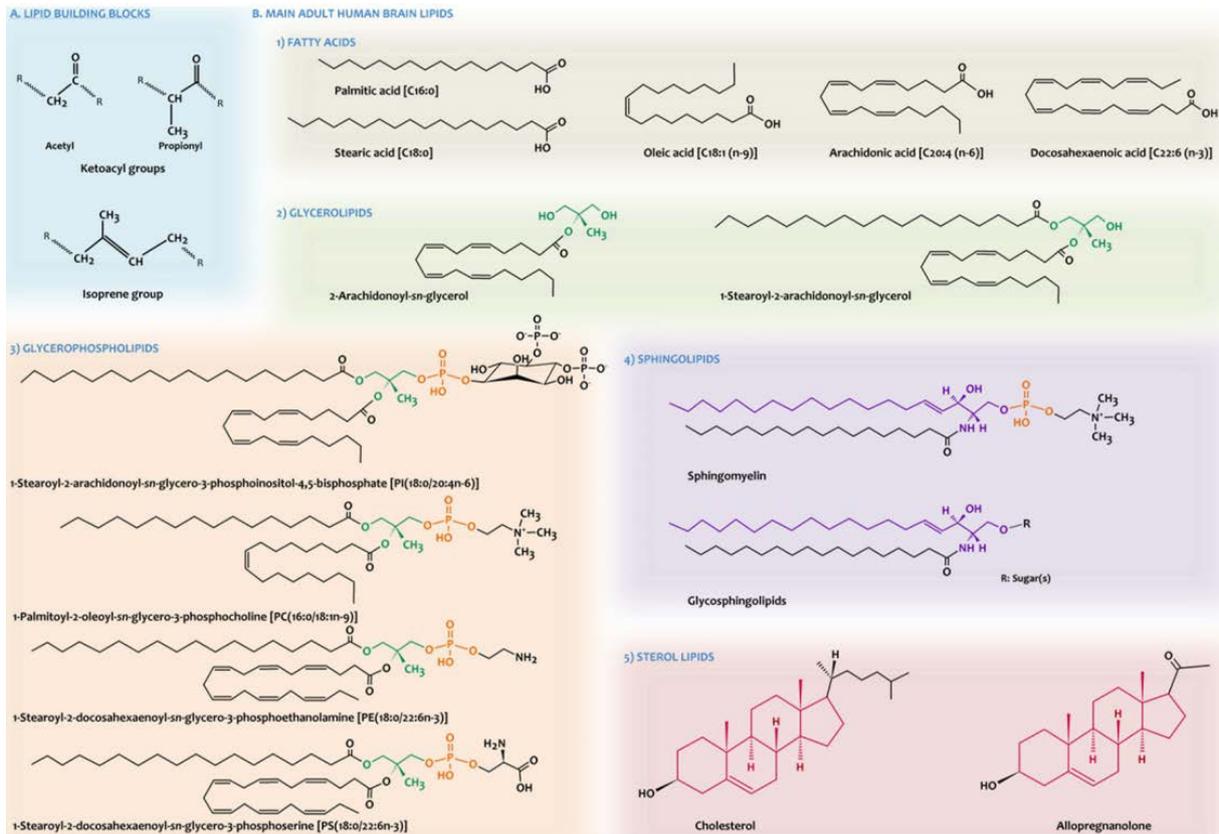


Figure 8 : Structure des différentes classes lipidiques (d'après A. Naudi *et al.*)¹⁶⁰

2. Structure des lipides et membrane

Les données sont en grande partie tirées de la base *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).

a) Les Acides Gras

Les acides gras (AG) sont composés d'une chaîne aliphatique d'une taille variable, entre 12 et 24 carbones et très majoritairement en nombre pair dû au métabolisme associé à leur synthèse chez l'Homme. À l'extrémité de cette chaîne, un groupement acide carboxylique représente la fonction chimique active de ces molécules. Ainsi comme nous le verrons une grande partie des réactions des AG se feront avec un groupement alcool d'autres molécules carbonées notamment par estérification ou avec une amine formant ainsi un amide. Des doubles liaisons carbone-carbone peuvent être aussi présentes au niveau de la chaîne aliphatique, on dit alors que l'AG est insaturé. À l'inverse, si aucune insaturation n'est présente sur l'AG, on parle alors d'AG saturé. Ces insaturations peuvent être simples ou multiples et comme nous le verrons, jouent un rôle important sur les propriétés biophysiques des membranes. En effet, les insaturations que l'on retrouve dans le métabolisme des cellules humaines sont des doubles liaisons *Cis* ce qui thermodynamiquement déstabilise les interactions hydrophobes. Les AG insaturés sont regroupés en deux groupes, les monoinsaturés (*monounsaturated fatty acids*

MUFA) avec une seule insaturation et les polyinsaturés (*polyunsaturated fatty acids* PUFA) ceux comportant plus d'une insaturation. Au sein des PUFA on retrouve deux autres sous-groupes les oméga 3 (ω 3) et les oméga (ω 6), dépendant de la position de la première insaturation à partir de l'extrémité opposée de la fonction carboxylique. Les acides gras représentant majoritairement chaque classe sont l'acide palmitique et stéarique pour les AG saturés, l'acide oléique pour les MUFA, l'acide arachidonique (AA) pour les PUFA ω 6 et l'acide docosahexénoïque pour les PUFA ω 3 (DHA).

La synthèse *de novo* des AG s'effectue au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique du côté du cytosol. La première étape de la voie de synthèse est la condensation de deux acétyl-CoA pour former un malonyl-CoA. Dans un second temps, une voie métabolique en boucle permet de construire des AG en partant d'un acétyl-CoA et en ajoutant 2C par cycle réactionnel. Concernant la formation de double liaison carbone-carbone, elle s'effectue par deux familles de désaturases, les Stearoyl-CoA desaturases (SCD) et les Fatty acids desaturases (FADS), toutes deux dépendantes de l'oxygène et du Fe^{2+} . Les cellules humaines ne possédant pas les désaturases permettant la synthèse des PUFA ω 6 et ω 3, un import exogène est nécessaire, on parle alors de lipides essentiels, l'acide linoléique et l'acide α -linoléinique. Ils permettent respectivement la synthèse de l'acide arachidonique et l'acide docosahexénoïque avec cependant un rendement faible pour le DHA¹⁶¹ (Figure 9).

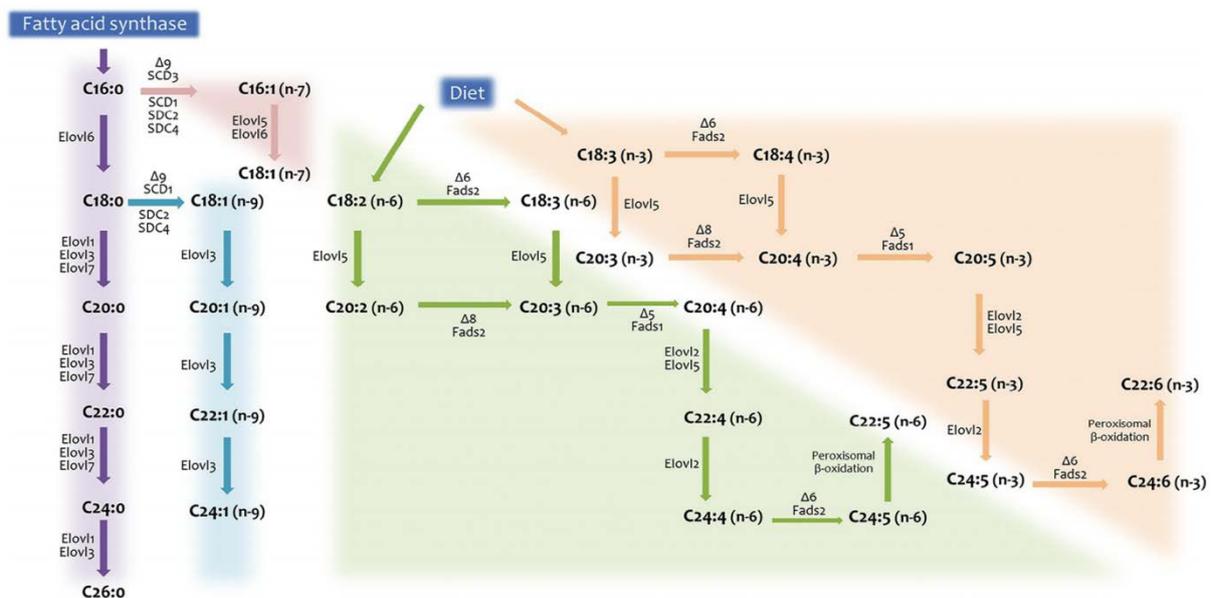


Figure 9 : Voies de synthèse des acides gras *de novo* mais aussi à partir des lipides essentiels retrouvés dans l'alimentation (d'après A. Naudi *et al.*)¹⁶⁰

Le catabolisme des AG peut jouer un rôle dans la bioénergie de la cellule. La voie métabolique mise en jeu est la β -oxydation. De la même manière que lors de la synthèse *de novo* cette voie métabolique se présente sous une boucle réactionnelle de 4 étapes, qui permet à chaque cycle d'extraire un acétyl-CoA de la chaîne carbonée. Dans un second temps, l'acétyl-CoA par son entrée dans le cycle de Krebs permet à la cellule d'effectuer de la phosphorylation oxydative au sein de la mitochondrie. Deux organites peuvent effectuer cette voie catabolique, la mitochondrie et le peroxyosome, chacun possédant des spécificités par rapport à l'autre. La première est l'affinité des AG pour leur internalisation, la mitochondrie par le biais des

acylcarnitines permet d'importer les AG jusqu'à 20 carbones. À l'inverse, les peroxysomes par leurs transporteurs de la famille ABCG ont une meilleure affinité avec les AG de plus de 20C notamment les PUFA. Une autre différence se situe au niveau de la première réaction, qui dans la mitochondrie est grâce à une déshydrogénase ayant pour cofacteur le couple FAD/FADH₂ alors que dans le peroxysome la réaction s'effectue grâce à une oxydase et est donc couplée à l'oxygène. Ainsi au sein de la mitochondrie, le FADH₂ est réoxydé au niveau de la chaîne respiratoire tandis qu'au sein du peroxysome l'oxygène est transformé en H₂O₂¹⁶².

b) *Les Glycérides et Glycérophospholipides*

Les glycérides et les glycérophospholipides sont deux lipides qui dérivent du même squelette carboné, le glycérol. Ce dernier est composé de 3 carbones chacun portant une fonction alcool. Comme dit précédemment, c'est par estérification de ces alcools que des acides gras peuvent être rajoutés sur le glycérol. 1 à 3 ajouts d'AG sont donc possibles, on parle alors de monoacylglycérol (MAG), de diacylglycérol (DAG) ou de triacylglycérol (TAG). Au niveau du métabolisme, les TAG et les DAG ont un rôle important. Les TAG, sont essentiels pour le stockage des lipides, avec le meilleur rendement de 3 AG pour un glycérol. Cette structure a pour conséquence de n'avoir aucune région polaire et donc d'être totalement apolaire. Les TAG n'ont aucun rôle sur la structuration des membranes et forment par leur accumulation des gouttelettes lipidique servant de stockage énergétique pour la cellule. Les DAG sont des précurseurs métaboliques de la synthèse des TAG ainsi que des glycérophospholipides. Leur synthèse *de novo* est possible grâce à un embranchement de la glycolyse au niveau de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP)¹⁶³. De plus, les DAG peuvent servir de messenger secondaire, par exemple le cas le plus connu lors de l'activation de PKC co-stimulée avec du Ca²⁺ en réponse à des facteurs de croissances¹⁶⁴.

Les glycérophospholipides (GPL) dérivent des DAG, sur lesquels un phosphate est estérifié en *sn*-3. Différentes molécules polaires comportant une fonction alcool peuvent alors s'estérifier sur l'autre extrémité du phosphate, caractérisant la tête polaire du GPL. Les molécules majoritaires au sein des cellules humaines sont la choline, l'éthanolamine, la sérine, l'inositol, donnant respectivement la phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidylinositol (PI) (Figure 10). Au sein des mitochondries, on retrouve une voie de synthèse des cardiolipines qui sont spécifiques de cet organe, et sont chimiquement constitués de deux acides phosphatidiques liés par un glycérol à l'extrémité de leurs phosphates. Ces lipides auraient notamment un rôle sur la stabilisation des complexes protéiques de la chaîne respiratoire¹⁶⁵. D'autres lipides moins communs sont proches structurellement des GPL, comme les éthers lipides, qui comportent en position *sn*-1 un AG lié par une liaison éther. Nous verrons que cette espèce lipidique peut jouer un rôle sur le métabolisme des cellules souches cancéreuses. L'ensemble de la synthèse de ces espèces lipidiques s'effectue essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique, même si certaines voies de synthèses se retrouvent dans la mitochondrie, voir y est spécifique comme celle des cardiolipines. En lien avec le métabolisme des GPL, les lysophospholipides permettent généralement le remodelage des GPL. En effet, leur synthèse s'effectue par déacylation d'un GPL par des phospholipases A en position *sn*-1 ou *sn*-2, ce qui permet par la suite de réacyler par un autre acide gras ou effectuer une transacylation avec un second GPL. Ainsi par ce mécanisme nommé cycle de Lands la cellule peut réarranger les AG estérifiés sur ses GPL¹⁶⁶.

On peut retrouver au niveau des AG estérifiés une certaine hétérogénéité même si certains AG se retrouvent plus souvent estérifiés sur certaines positions. Ainsi au niveau du carbone *sn*-1 on retrouvera plus généralement des AG saturés ou monoinsaturés, tandis qu'en position *sn*-2 l'AG estérifié est généralement mono- ou poly- insaturés. Il est intéressant de voir qu'au niveau de certain type de GPL ou dérivés de GPL, la disparité des AG peut être plus faible, par exemple le cas des PI qui présente généralement un stéaroyl et un arachidonoyl, ou encore l'exemple des éthers lipides qui ont en grande majorité une estérification d'un PUFA en *sn*-2¹⁶⁷.

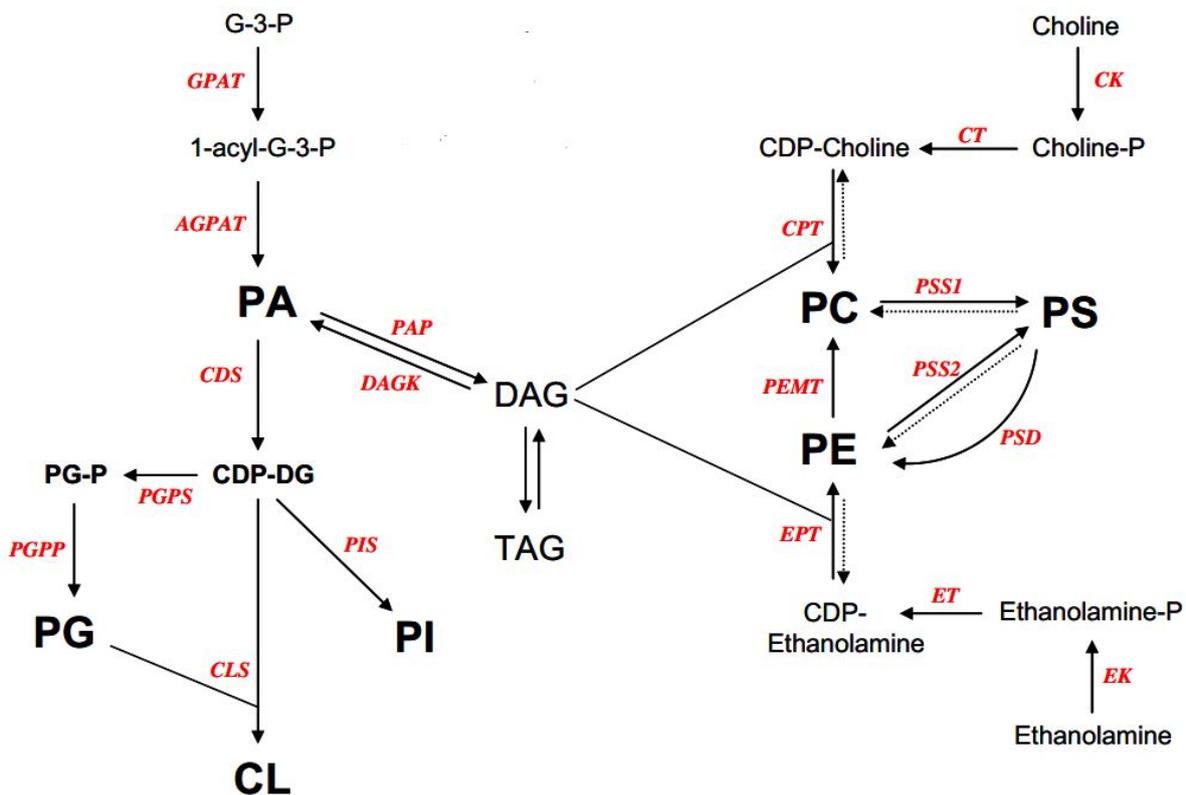


Figure 10 : Voies de synthèses des différentes classes de phospholipides ainsi que les lipides neutres (d'après M. Hermansson *et al.*)¹⁶⁸

c) Les Sphingolipides

Le squelette carboné des sphingolipides est composé d'une chaîne de 18 carbones avec à son extrémité deux fonctions alcool ainsi qu'une fonction amine, qu'on appelle sphingosine. Un AG peut être ajouté à la sphingosine par une fonction amide, donnant ainsi un céramide. L'AG présent au niveau des céramides est le plus souvent saturé. Comme les GPL, un céramide peut estérifier une tête polaire au niveau de son premier groupement hydroxyle, notamment un groupement phosphate couplé à une choline, aussi nommé sphingomyéline, ou encore un phosphate couplé à une éthanolamine. De plus en guise de tête polaire, un ose ou plusieurs oses ou un enchaînement de dérivés osidiques peuvent être ajoutés sur cette fonction hydroxyle donnant par exemple des glucosylcéramides ou galactosylcéramides et des gangliosides. La synthèse *de novo* s'effectue au niveau du RE, la première étape limitante étant la condensation d'une L-sérine et d'un palmitoyl-CoA par le palmitoyl transférase (SPT). La réaction suivante permet la formation de la sphinganine par une reductase, suivie d'une acylation par la famille

enzymatique des ceramides synthèses, et enfin la création de la double liaison de la sphingosine par une desaturase. Les changements de la chaîne acyle du céramide peut s'effectuer par un retour du squelette carboné sphingosine pour ensuite ajouter un nouvel AG¹⁶⁹ (Figure 11).

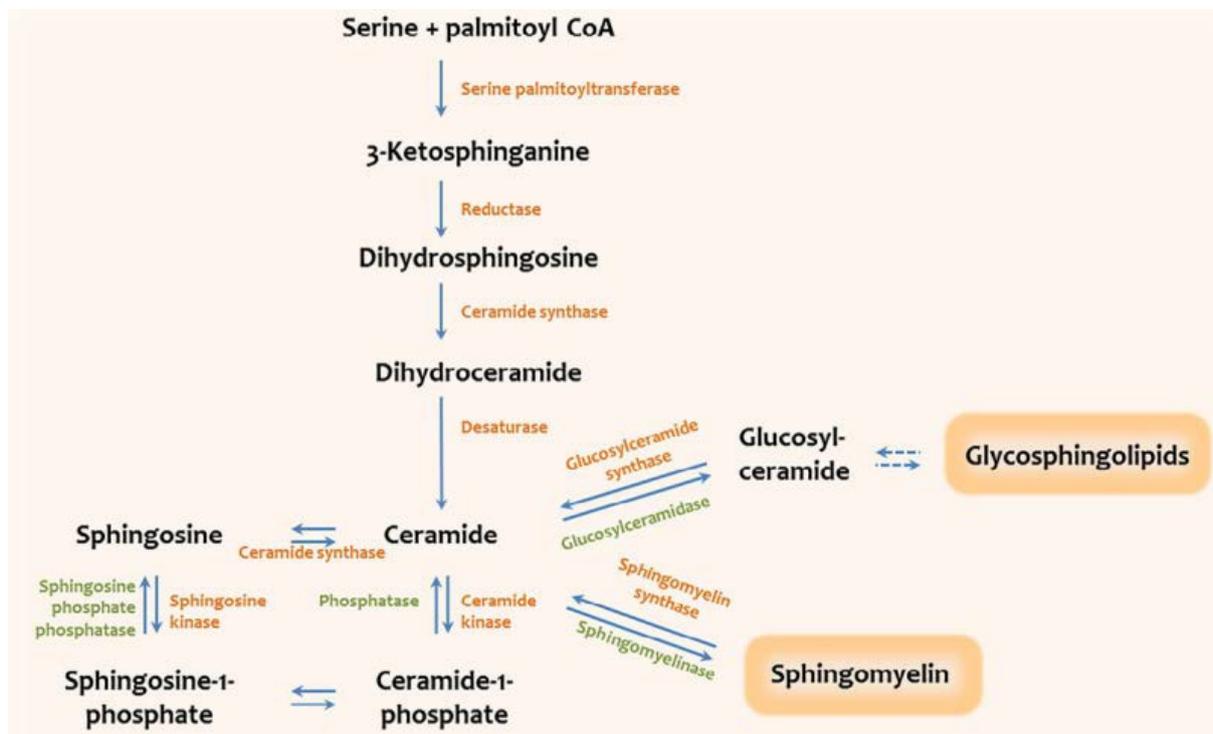


Figure 11 ; Voies de synthèse des sphingolipides (d'après A. Naudi *et al.*)¹⁶⁰

d) Le Cholestérol

Le cholestérol fait partie de la famille des stérols et est synthétisé de façon ubiquitaire dans les cellules humaines. Il est constitué de 4 noyaux aromatiques avec un groupement hydroxyle à une extrémité et une chaîne carbonée de 8 carbones de l'autre. Il peut être estérifié sur son groupement hydroxyle par un AG, formant alors un ester de cholestérol. Ainsi, par cette estérification, le cholestérol n'étant plus amphiphile, va de la même manière que les TAG pouvoir participer à la formation de gouttelettes lipidiques et servir de stockage lipidique. La synthèse du cholestérol s'effectue au niveau du RE pour ensuite être redistribué par le trafic vésiculaire, principalement au niveau de la membrane plasmique. Sa synthèse est composée de 5 étapes. La première est la formation de mévalonate par la voie qui porte le même nom. Deux acétyl-CoA se condensent pour former un acétoacétyl-CoA. Un troisième acétyl-CoA s'ajoute formant ainsi du HMG-CoA, qui grâce à sa réduction par l'une des enzymes limitantes de la synthèse du cholestérol l'HMG CoA reductase (HMGCR), permet de former du mévalonate. La seconde étape, composée de 3 étapes, permet la formation, d'isopentényl-PP (PP étant un diphosphate). La condensation d'un géranyl-PP et d'un isopentényl-PP permet la formation du farnésyl-PP. Cette molécule est importante, car elle se situe au carrefour entre la synthèse du cholestérol et les modifications post-traductionnelles de prénylation. La troisième étape est la formation du squalène par condensation de deux farnésyl-PP, catalysé par l'enzyme FDFT1. La réaction suivante de l'oxydation du squalène est la seconde réaction limitante de la synthèse des stéroïdes, catalysé par la squalene epoxidase (SQLE). La quatrième étape, c'est la

condensation du squalène époxyde en lanostérol. Enfin la dernière étape constituée de 7 réactions permettant la synthèse du cholestérol¹⁷⁰.

e) *Les membranes*

En 1972, Singer et Nicolson ont proposé le modèle de la mosaïque fluide pour définir la structure des membranes. Elle se définit notamment que la réduction thermodynamique du système force les lipides amphiphiles à s'autoassembler. Cet assemblage forme alors une structure en doubles feuillets lipidiques comportant un cœur hydrophobe et deux interfaces hydrophiles correspondant respectivement aux queues et aux têtes des lipides. Les membranes sont donc composées d'un ensemble de lipides divers (la « mosaïque ») avec une dynamique moléculaire possible permettant à la membrane de se déformer et aux molécules la constituant de se mouvoir en son sein (le « fluide »)¹⁷¹. Dans un second temps, le modèle a pu être complété sur plusieurs points notamment sur l'existence de région enrichie en certains types de lipide ou de protéine¹⁷², mais aussi d'une asymétrie des lipides entre les deux feuillets d'une membrane¹⁷³ (Figure 12). Pour exemple, au niveau de la membrane plasmique alors que les PC et SM ont un enrichissement au niveau du feuillet externe, les PS et PE eux sont enrichis au niveau du feuillet inter. L'une des conséquences connues de la perte de l'asymétrie d'un lipide dans une cellule saine, est celle de la translocation du PS du feuillet inter au feuillet externe jouant un rôle dans l'induction du processus d'apoptose, l'un des programmes de mort cellulaire programmé¹⁷⁴. Du fait de l'hétérogénéité lipidique, plusieurs milliers d'espèces lipidiques répertoriées¹⁷⁵, ainsi qu'une hétérogénéité protéique, possédant des caractéristiques physico-chimiques particulières, peuvent permettre la création de microdomaines aux caractéristiques définies. La mise en évidence de ces microdomaines a été découverte lors de la découverte de régions membranaires résistantes à l'extraction au détergeant¹⁷⁶. L'analyse des lipides associés a permis de déterminer un enrichissement en cholestérol et en sphingolipides. Comme nous l'avons vu, les lipides composant les membranes possèdent une hétérogénéité structurale, qui lors de modifications de leur métabolisme peuvent par des variations de la composition membranaire varier les propriétés physiques des membranes, notamment la fluidité membranaire.

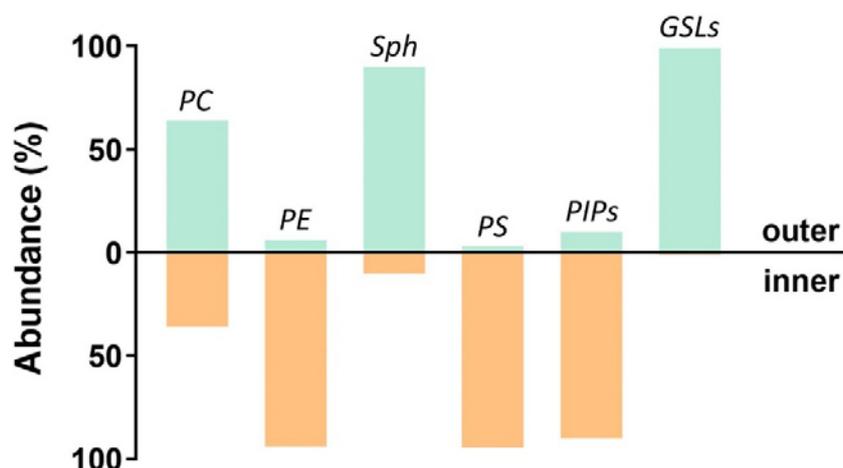


Figure 12 : Répartition asymétrique des lipides entre le feuillet interne de la membrane plasmique et le feuillet externe (d'après M.J. Sarmiento *et al.*)¹⁷⁷

La fluidité membranaire est un paramètre dépendant des interactions lipide-lipide et lipide-protéine, qui ne sont pas caractérisées par des liaisons covalentes, mais par des interactions

dynamiques permettant un réarrangement spatial entre eux. Les membranes peuvent adopter différentes phases, qui correspondent à différents arrangements spatiaux des lipides permettant un degré de liberté de mouvement des chaînes acyles¹⁷². Ainsi à partir d'un modèle simple d'une membrane composée d'un unique lipide, on peut déterminer son comportement lors de la variation de la température. En effet, à une température donnée, la membrane possède toujours deux états physiques, la phase liquide (ou liquide désordonnée : L_d) et la phase gel (ou ordonnée : S_o). Cependant, les proportions des deux états dépendent de l'énergie apportée au système corrélée à la température. Lorsque celle-ci augmente, la mobilité des chaînes acyles est plus grande, augmentant alors la probabilité de rotation de celles-ci. Ainsi chaque lipide est caractérisé par sa température de transition de phase (notée T_m pour *melting temperature*) correspondant à la température à laquelle où 50% des lipides sont en phase gel et 50% sont en phase liquide. En dessous du T_m , les lipides deviennent très vite majoritairement en phase gel, tandis qu'au-dessus les lipides deviennent vite majoritairement en phase liquide (Figure 13).

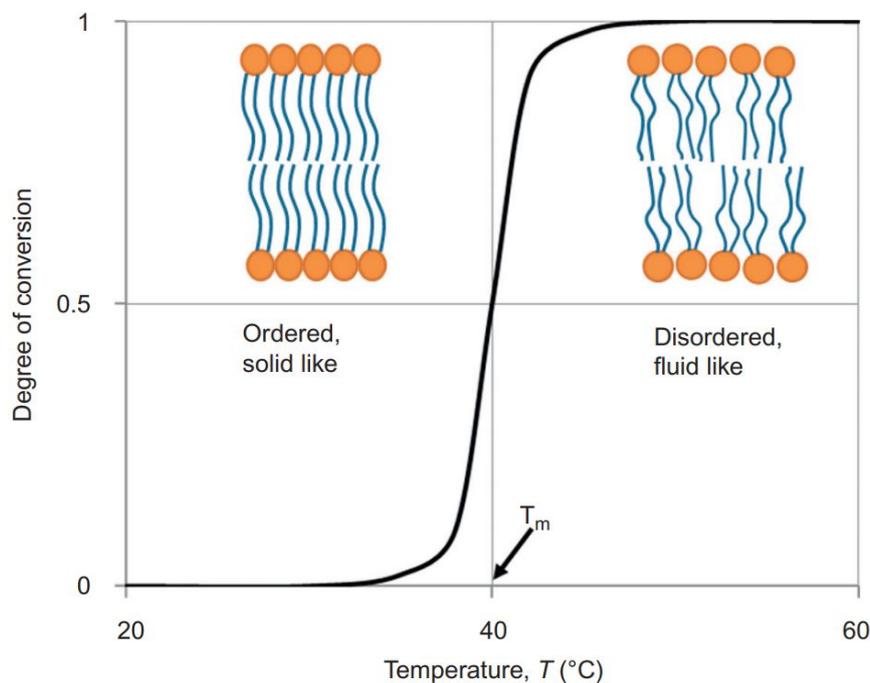


Figure 13 : Répartition des phases lipidiques ordonnées ou désordonnées en fonction de la température. Au niveau de la température de transition (T_m) la membrane arbore 50% de phase ordonnée et 50% de phase désordonnée (d'après W.D. Stein et T. Litman)¹⁷⁸

La T_m dépend du nombre de carbones et du nombre d'insaturations des chaînes acyles du lipide. Plus le nombre de carbones est important, plus les interactions entre les chaînes sont importantes augmentant la stabilité du système. Par conséquent, il faudra un apport d'énergie plus important pour mettre en mouvement les chaînes acyles, ce qui se traduit par un T_m plus important. À l'inverse, plus le nombre d'insaturations *cis* est important, plus les interactions des chaînes sont faibles. Il faudra alors moins d'énergie pour mettre en mouvement les chaînes, ce qui se traduit cette fois-ci par une diminution du T_m . Le cholestérol a quant à lui un effet que ce soit sur les phases S_o ou L_d , permettant alors l'acquisition d'un autre état, la phase liquide ordonnée (L_o). Son incorporation dans une phase S_o permet de déstabiliser le réseau des chaînes acyles réduisant ainsi l'ordre des chaînes lipidiques. À l'inverse, son incorporation dans une

phase L_d permet la stabilisation des chaînes acyles augmentant alors l'ordre des chaînes. La membrane en phase L_o présente alors une augmentation de l'ordre des chaînes acyles, tout en augmentant la diffusion des lipides (Figure 14). Dans un contexte physiologique, les membranes cellulaires se composent uniquement des phases L_o et L_d . De plus, la concentration du cholestérol dans les organites est variable, pauvre au niveau du RE et riche à la membrane plasmique. On peut alors admettre qu'au niveau du RE seule la phase L_d est présente tandis qu'au niveau de la membrane plasmique la membrane posséderait un mélange de phases L_d et L_o . La phase ordonnée correspondant à des régions enrichies en cholestérol et sphingolipides telles que les radeaux lipidiques¹⁷⁹.

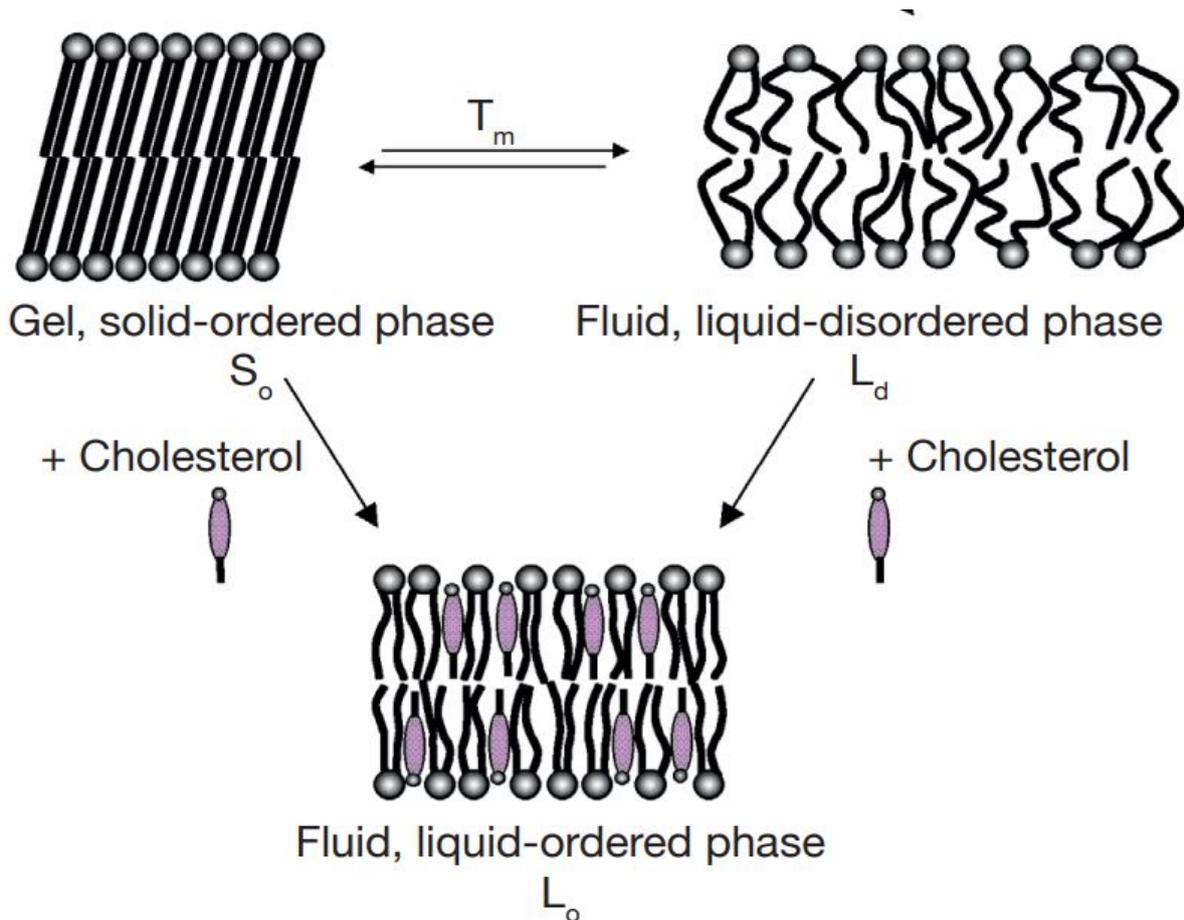


Figure 14 : Effet du cholestérol sur la membrane (d'après M. Eeman et M. Deleu)¹⁸⁰

En plus de sa queue hydrophobe, la taille de la tête polaire du lipide influence le comportement de la membrane au niveau de la fluidité, mais aussi de la courbure. Les différentes têtes polaires des GPL entraînent toutes des contraintes physiques sur la membrane à cause de leur volume moléculaire jouant notamment un rôle sur les mécanismes qui permettent la formation de vésicules à partir d'une membrane ou encore de la fusion de deux membranes. Ainsi les PE et PA exerceront une courbure négative sur la membrane, on parle de lipide conique. À l'inverse, les PI et les lysophospholipides auront un effet de courbure positive, on parlera alors de lipide conique inverse. Enfin, les PC et PS n'ont aucun effet sur la courbure de la membrane, ce sont des lipides cylindriques (Figure 15).

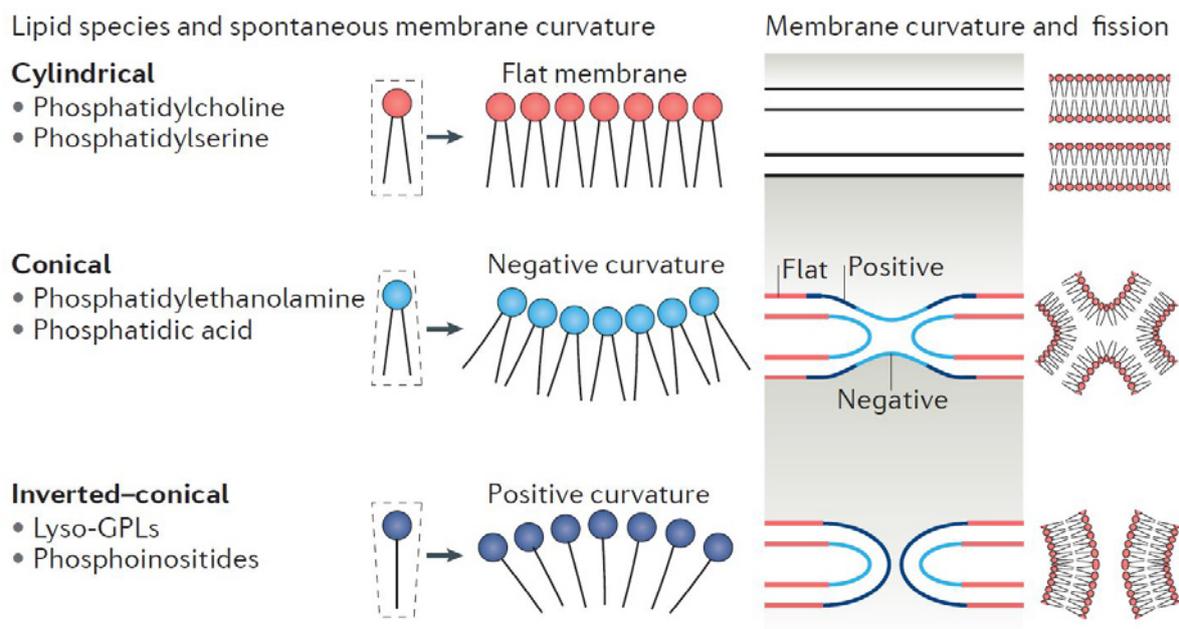


Figure 15 : Effet de la tête polaire et des lysophospholipides sur la courbure membranaire (d'après T. Harayama et H. Riezman)¹⁸¹

3. Modulation du métabolisme lipidique dans un contexte tumoral

a) *Adaptation du métabolisme lipidique lors de la croissance tumorale*

De façon générale, l'expression des gènes associés à l'anabolisme des lipides est augmentée chez les cellules cancéreuses afin de supporter la demande en lipide pour le développement et la progression tumorale. Ainsi de façon assez ubiquitaire entre les différents cancers, les enzymes lipogéniques telles que l'acetyl-CoA carboxylase (ACAC), la fatty acid synthase (FASN), l'ATP citrate lyase (ACLY), mais aussi les enzymes de la voie de synthèse du cholestérol ont leur expression augmentée¹⁸²⁻¹⁸⁴. En plus des voies permettant la synthèse des lipides, les enzymes limitantes de la β -oxydation, tout particulièrement les carnitine palmitoyltransferase 1 A et C, sont aussi surexprimées dans de nombreuses tumeurs. Cette augmentation de l'oxydation des lipides comme source d'énergie permet le maintien de la prolifération des cellules dans des conditions pauvres en glucose^{185,186}. De ce fait, plusieurs travaux ont utilisé cette enzyme comme cible thérapeutique mettant en évidence une augmentation de la sensibilité des cellules à la radiothérapie¹⁸⁷. L'une des conséquences de cette prolifération élevée poussant sur la synthèse des lipides est une induction du stress du réticulum endoplasmique¹⁸⁸ et une réponse métabolique en conséquence¹⁸⁹. En effet, l'augmentation de production des lipides entraîne notamment une accumulation des AG saturés (palmitate et stéarate) et de cholestérol, au niveau du RE. Or à trop forte concentration, ces AG deviennent cytotoxiques pour la cellule due à une mise en place d'une réponse aux protéines dénaturées (*Unfolded protein response* : UPR)¹⁹⁰. L'induction de l'UPR dans ce contexte est associée à la diminution de MUFA au sein de la membrane du RE entraînant alors l'activation IRE1 α et PERK, deux protéines membranaires *biosensors* des protéines dénaturées¹⁹¹. Classiquement,

c'est la fixation de leur répresseur GRP78 (aussi appelé BiP), protéine chaperonne, aux protéines dénaturées qui permet leur dimérisation et leur activation. Ils peuvent alors activer les facteurs de transcriptions XBP1 et ATF4 qui permettront alors à leur tour la mise en place d'un programme génétique afin de rétablir une homéostasie du réticulum pouvant aller jusqu'à l'activation de l'apoptose en cas d'échec¹⁹². Or en plus de leur sensibilité à la présence de protéines dénaturées, ces deux *biosensors* ont aussi la capacité de sonder l'environnement lipidique de la membrane du RE. Ils peuvent ainsi activer une UPR indépendamment de la présence de protéines dénaturées lorsque la membrane se rigidifie¹⁹³. Même si la modification biophysique de la membrane suffit en elle-même pour l'induction de ces voies lors de l'UPR membranaire, l'augmentation de ROS observée semble aussi traduire une augmentation de protéines dénaturées^{190,194}. D'autres travaux ont aussi vu la mise en place d'une activation du facteur de transcription LXR (*Liver X receptor*), augmentant l'expression des enzymes SCD (*Stearoyl-CoA Desaturase*) et LPCAT3 (*Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3*), qui respectivement induisent la formation d'une double liaison sur le palmitate ou le stéarate et le transfert d'un PUFA en position *sn2* d'un lysophospholipide. LXR augmente aussi l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, qui permettent l'efflux du cholestérol. De cette façon, la cellule peut augmenter la fluidité membranaire et réacquérir une homéostasie membranaire diminuant alors le stress associé. L'ensemble de ces mécanismes se retrouvant alors associés à une agressivité tumorale accrue¹⁹⁵. Il est cependant à noter que dans un contexte enzymatique où SCD est inactive, une autre voie de synthèse passant par FADS2 permet par son activité de desaturase sur le palmitate de garder un degré de désaturation lipidique au sein de la cellule¹⁹⁶. L'utilisation de FADS2 par les cellules peut s'expliquer si l'on prend en considération les flux métaboliques associés à l'absence ou l'inactivation de SCD. En effet, l'altération de l'activité de SCD a pour conséquence l'augmentation de la concentration du palmitate, qui par effet de masse sera utilisé comme substrat par FADS2 malgré son affinité faible¹⁹⁷. Ce mécanisme permet de montrer un exemple de plasticité en lien avec le remodelage des flux métaboliques des cellules cancéreuses.

Ces dérégulations métaboliques des lipides ne sont pas spécifiques à l'ensemble des cellules. Comme nous l'avons vu dans la première partie, la caractéristique majeure des tumeurs est leur hétérogénéité ainsi de la même manière, une hétérogénéité lipidique a pu être observée au sein d'une tumeur¹⁹⁸. La question qui se pose dans notre modèle est : y a-t-il un métabolisme lipidique spécifique des cellules cancéreuses dynamiquement différenciées corrélé à un gain de plasticité et une perte d'identité cellulaire ? Très peu d'études se sont intéressées à cette question, même si nous allons voir que depuis quelques années des réponses peuvent être apportées.

b) *Métabolisme lipidique associé à la plasticité cellulaire*

Je commencerai cette partie par les travaux qui ont le mieux caractérisé le lien entre l'état phénotypique CCDD, la modulation lipidique et l'état biophysique de la membrane. En effet, R.C. Gimple *et al.* ont étudié la modulation lipidique sur les glioblastomes, qui pour rappel est le cancer le plus agressif et létal chez l'homme. Ce type de cancer est très fortement enrichi en CCDD qui contribue à de faibles pronostiques vitaux. Ils ont notamment montré que ces cellules étaient dépendantes de l'expression de l'enzyme ELOVL2, l'enzyme clé permettant la synthèse des PUFA¹⁹⁹. Comme énoncé dans la partie A de l'introduction, ces CCDD ont une

ouverture chromatinienne beaucoup plus importante que les cellules saines et que les cellules tumorales différenciées. Ils ont notamment noté que l'une des régions les plus ouvertes au sein des CCDD se situe au niveau du gène *ELOVL2*. Dans un second temps, ils ont mis en évidence que le maintien du phénotype était dépendant de l'activité d'*ELOVL2* et tout particulièrement de l'augmentation des PUFA au sein des membranes. De plus, ils ont pu déterminer que *FADS2*, l'enzyme permettant d'introduire des insaturations lors de la synthèse des PUFA, était aussi fortement exprimée en comparaison des cellules tumorales différenciées renforçant l'idée de la nécessité des PUFA pour les CCDD du glioblastome. L'une des conséquences de cette augmentation de PUFA au sein des membranes est l'augmentation de la fluidité membranaire, ici testée par la technique de Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence recovery after photobleaching*: FRAP). Après analyse des voies de signalisations impactées par cette variation de fluidité, ils ont déterminé que l'activité de l'EGFR était fortement réduite lors de la perte d'*ELOVL2*. Ainsi, une fluidité membranaire plus importante permettrait aux EGFR d'acquiescer une meilleure conformation pour leur activation^{200,201}. Pour aller dans le sens de ces observations, des expériences au début des années 2000 ont aussi mis en évidence la modification de la fluidité membranaire de la membrane plasmique comme modulateur de l'EGFR. En effet, la réduction du cholestérol au sein de la cellule par traitement au méthyl- β -cyclodextrine permet une diminution des radeaux lipidiques entraînant une autoactivation de l'EGFR ainsi qu'une élévation de sa concentration au niveau de la membrane plasmique²⁰². L'ensemble de ces observations semble impliquer que des modifications de la composition lipidique puissent être associées à une augmentation de la fluidité membranaire des cellules de glioblastome modulant les niveaux d'activité de leurs récepteurs aux facteurs de croissance, le tout potentiellement corrélé à leur plus grande plasticité épigénétique à travers la régulation de gènes tel que *ELOVL2*.

Au niveau mammaire, il a pu être montré de façon assez similaire que la voie du mévalonate jouait un rôle sur le maintien des propriétés des CCDD. En effet, l'inhibition de cette voie au sein de cellules Basale-like par du simvastatin a pour conséquence la diminution de la population CCDD ALDH⁺ et donc une diminution de formation de sphère *in vitro*. À l'inverse, l'ajout de mévalonate permet de réobtenir des CCDD ALDH⁺ renforçant la formation de sphère. La voie du mévalonate est importante pour le métabolisme lipidique. Elle se subdivise en trois voies métaboliques, permettant la production du cholestérol ainsi que de deux molécules essentielles à la prénylation des lipides, le farnésyl-PP et le géranylgeranyl-PP. Par la combinaison d'inhibition des différents embranchements, il a pu être montré que le maintien de l'état CCDD était dépendant des processus de géranylgeranylation. Dans ce contexte, la régulation d'une sous-branche du métabolisme lipidique ne modifie pas directement la structure des membranes, mais module plutôt la capacité des protéines membranaires à s'y associer. Ce mécanisme est très vraisemblablement important puisqu'un traitement par un inhibiteur de prénylation permet *in vivo* de diminuer la croissance tumorale, ainsi que de diminuer drastiquement le nombre de CCDD ALDH⁺ au sein de la tumeur²⁰³. Une autre étude est arrivée à une même conclusion mettant en lumière l'importance de la voie du mévalonate pour la synthèse du géranylgeranyl-PP qui permet alors le maintien de l'activation des facteurs oncogéniques YAP ou TAZ²⁰⁴. Ces corégulateurs transcriptionnels sont sous le contrôle de la voie Hippo, un important module de signalisation oncosuppresseur. Cette voie de signalisation

intervient dans le développement des tissus sains en contrôlant notamment la prolifération, l'apoptose ou encore l'autorenouvellement des cellules souches en fonction de la bonne mise en place des interactions physiques de la cellule avec son microenvironnement. En temps normal, les contacts de la cellule avec la matrice par exemple ou d'autres cellules permettent l'activation de cette voie Hippo conduisant à inhiber les corégulateurs transcriptionnels, YAP et TAZ, par phosphorylation puis dégradation au sein du cytosol. Lors de perte de signaux de contacts, YAP et TAZ n'étant plus phosphorylées sont alors transloquées dans le noyau augmentant alors la prolifération et inhibant l'apoptose²⁰⁵. Dans un contexte tumoral, la perte de l'identité épithéliale et le maintien du caractère souche sont d'autre part souvent dépendants de l'activation de YAP/TAZ²⁰⁶. Ainsi, la voie du mévalonate par la synthèse du géranylgeranyl-PP participe clairement au maintien du caractère souche des cellules exprimant des formes actives de YAP ou de TAZ.

Toujours en lien avec la modulation de l'identité cellulaire, comme nous l'avons vu plus tôt, l'un des processus majeurs permettant aux cellules épithéliales de perdre leur identité et d'acquérir en partie un caractère souche est le programme de l'EMT. Les travaux de Z. Zhao *et al.* ont permis de mettre en évidence une régulation de la voie de synthèse du cholestérol par le complexe entre le corépresseur CtBP et les EMT-TF (ZEB1 ; SNLUG ou TWIST)²⁰⁷. Ils ont dans un premier temps effectué une surexpression de CtBP au sein de lignées mammaires permettant d'effectuer plusieurs observations. Premièrement, l'augmentation de l'expression de ce corépresseur permet la diminution du cholestérol au sein des cellules. De plus, cette variation de cholestérol intracellulaire est accompagnée d'un changement phénotypique avec perte des marqueurs épithéliaux et gains de propriétés mésenchymateuses. Enfin, ils ont déterminé par FRAP que la membrane plasmique était plus fluide. Afin de comprendre le lien entre les effets de CtBP, l'EMT et contrôle du métabolisme du cholestérol, les auteurs se sont tout d'abord intéressés à la régulation de la voie du TGF β du fait de sa régulation à la membrane plasmique²⁰⁸ et de sa capacité à induire le programme de l'EMT⁸². L'activité du récepteur au TGF β est notamment atténuée par sa séquestration au niveau des radeaux lipidiques riches en cholestérol, facilitant son internalisation par endocytose et sa dégradation²⁰⁸. En limitant la synthèse de cholestérol et la formation des radeaux lipidiques, CtBP favorise l'induction de la voie du TGF β , observé notamment par la plus grande expression de gènes comme la SERPINE1 dont la transcription est sous le contrôle de la voie de signalisation induite par ce type de facteur de croissance. Renforçant ces conclusions, l'ajout de cholestérol s'oppose aux effets de CtBP et empêche l'induction de l'EMT par le TGF β . Finalement, des liens moléculaires directs ont pu être établis entre l'activité de CtBP et les facteurs de transcription activateurs de l'EMT comme ZEB1. Ces deux régulateurs transcriptionnels coopèrent à un mécanisme de répression transcriptionnel du gène SREBP2. Ce gène permet l'expression d'un facteur de transcription augmentant directement l'expression des enzymes nécessaires à la synthèse du cholestérol²⁰⁹, son absence expliquant la diminution de synthèse de cholestérol lors de l'activation de CtBP. La participation de ZEB1 à ces régulations suggérerait d'autre part l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive entre la diminution du taux de synthèse du cholestérol, l'activation du TGF β et l'induction de ZEB1 lors de la mise en place de l'EMT. Enfin, pour aller plus loin, il était également frappant de noter que non seulement la synthèse du cholestérol diminuait lors de l'induction de l'EMT, mais que son efflux était également augmenté, diminuant d'autant sa

concentration intracellulaire. Un autre gène, ABCA1, était ainsi plus exprimé lors de la mise en place de l'EMT, ce gène codant justement une pompe à efflux pour le cholestérol. Confirmant ensuite la pertinence de ces travaux, il est tout à fait intéressant de noter que des expérimentations *in vivo* ont confirmé ces résultats. Une induction ectopique de l'expression de CtBP lors d'une injection intraveineuse d'une lignée cancéreuse mammaire chez des animaux immunodéprimés a permis par exemple d'augmenter le nombre de prises tumorales. De façon similaire, un traitement au méthyl- β -cyclodextrine (M β CD), un agent chimique qui permet d'appauvrir le cholestérol membranaire²¹⁰, augmente significativement la prise tumorale, le nombre de métastases et la grosseur des tumeurs dans ce même modèle, que CtBP soit ou non surexprimé. À l'inverse, l'inhibition d'ABCA1 par le thioradizine permettait de diminuer l'ensemble des paramètres que je viens de citer. En conclusion, il semble donc exister lors du processus de l'EMT, un rétrocontrôle positif où l'expression des EMT-TF permet la diminution du cholestérol dans la cellule, notamment au niveau de la membrane plasmique, permettant de stabiliser le récepteur au TGF β et donc le maintien du phénotype. En parallèle, ce phénotype étant associé à la migration cellulaire, cette diminution du cholestérol au niveau de la membrane aurait également l'avantage de permettre une meilleure résilience aux contraintes mécaniques lors de la déformation de la cellule notamment durant les processus d'invasion qui constituent l'une des caractéristiques des cellules les plus mésenchymateuses²¹¹. Le rôle complémentaire joué par l'augmentation de l'efflux du cholestérol est sans doute aussi essentiel en favorisant par effet de masse une activité minimale de la voie du mévalonate, voie qui comme nous l'avons vu est importante pour la régulation des flux vers les branches biosynthétiques du géranylgeranyl-PP et l'activation des facteurs YAP/TAZ constituant alors un autre node de régulation accrochée à cette connexion entre voie du mévalonate et contrôle de l'identité cellulaire.

Aussi, l'importance de ces connexions entre mécanisme d'efflux du cholestérol par ABCA1 et contrôle de l'EMT a pu être observée dans de nombreux autres modèles renforçant la pertinence de ces observations. L'une de ces études a pu montrer notamment que le 27-hydroxycholestérol et le contrôle qu'il exerce sur le récepteur nucléaire LXR favorise également l'efflux du cholestérol dans un contexte d'induction de l'EMT. Ces régulations étaient là aussi associées à une augmentation du processus métastatique et une diminution de la survie de souris traitées par un activateur de LXR²¹². LXR étant un régulateur de l'expression des pompes à efflux du cholestérol ABCA1 et ABCG1, ces résultats soulignent une nouvelle fois l'importance de ce mécanisme dans le processus d'EMT. Enfin, d'autres travaux ont permis de démontrer un lien entre l'augmentation de l'expression d'ABCA1, la fluidité membranaire de la membrane plasmique et le pouvoir d'initiation tumorale et métastatique de lignées cellulaires dans des modèles *in vivo* de souris²¹³. En conclusion, il est ainsi tout à fait intéressant de résumer ces travaux dans un concept où le métabolisme du cholestérol servirait de charnière à la mise en place et le maintien de processus de perte d'identité cellulaire tel que celui observé lors de l'induction de l'EMT. Il semblait donc justifiable de se demander s'il existe un métabolisme lipidique global associé à la perte d'identité cellulaire qui favoriserait ou accompagnerait l'émergence dynamique au sein des tumeurs de populations cellulaires plus plastiques que j'ai précédemment nommées cellules cancéreuses dynamiquement différenciées (CCDD), et qui seraient associées à l'agressivité globale de la tumeur.

La réponse à cette question étant peu abordée dans la littérature, il existe par conséquent très peu de travaux sur ce sujet. Cependant en associant et en contextualisant différentes observations je vais formuler différentes hypothèses sur les liens entre le métabolisme lipidique et la plasticité cellulaire résumant l'état des connaissances actuelles. Pour ce faire, je vais me baser sur trois axes : la régulation du CD44, un des marqueurs majeurs des CCDD dans le tissu mammaire, le métabolisme du fer, ainsi que le métabolisme des PUFA, principalement les $\omega 6$. Alors qu'à première vue les travaux décrivant ces axes n'ont pas forcément de liens évidents, une hypothèse mécanistique semble émerger associant le métabolisme lipidique au phénotype des CCDD. Comme nous l'avons vu dans la première partie, les CCDD mammaires présentent le plus souvent une augmentation de la protéine membranaire CD44. Cette protéine est associée en outre à deux mécanismes cellulaires, la migration et l'endocytose de l'acide hyaluronique. Il a notamment été démontré que l'activité de CD44 est contrôlée par l'état d'acylation de la protéine par du palmitate. Lorsqu'elle n'est pas acylée, CD44 est positionné en dehors des radeaux lipidiques au sein des régions fluides de la membrane, ce qui permet son interaction avec une protéine de type EZRIN elle-même servant de lien entre la membrane plasmique et les filaments d'actines. Cette interaction est donc essentielle pour le remodelage du cytosquelette lors de la migration cellulaire^{214,215}. À l'inverse lorsque CD44 est acylée, elle est séquestrée au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique permettant alors la mise en place de l'endocytose de l'acide hyaluronique²¹⁶. Ce mécanisme d'endocytose du CD44 a été récemment décrit comme étant essentiel pour l'augmentation de la plasticité cellulaire jouant un rôle dans l'internalisation des ions ferreux à pH physiologique²¹⁷. En effet, des mesures de RMN du proton à pH physiologique du hyaluronate ont permis de montrer qu'il était capable de fixer de façon réversible les ions ferreux. De plus, les auteurs ont pu démontrer par microscopie de fluorescence que par sa capacité à fixer le hyaluronate, CD44 jouait un rôle essentiel pour l'internalisation du fer dans les cellules. Dans un second temps, ils ont mis en évidence que l'EMT induite par l'EGF était associée à une réponse transcriptomique contrôlant le potentiel redox de la cellule et le métabolisme du fer. D'autre part, la concentration de certains métabolites était spécifiquement augmentée, particulier l' α -cétoglutarate. Point intéressant, l'induction du programme de l'EMT permettait l'augmentation de l'expression de l'enzyme histone lysine demethylase (PHF8) dont l'activité catalytique est elle-même dépendante du fer et de l' α -cétoglutarate. En effet, cette enzyme fait partie de la famille des *JmJC-containing Lysine demethylases* que j'ai déjà introduite, qui permettent l'ouverture de la chromatine par déméthylation des histones notamment au niveau des gènes du programme de l'EMT. Cet effet s'observait aussi bien *in vitro* avec les lignées mammaires qu'*in vivo* sur des tumeurs PDX (*Patient-derived xenograft*) soulignant l'importance de ces mécanismes pour un programme de plasticité cellulaire tel que l'EMT. En conclusion, la séquestration de CD44 au sein de radeaux lipidiques plutôt associés à des membranes rigides semble donc importante pour un contrôle spécifique du métabolisme du fer impliqué dans une plus grande plasticité cellulaire par facilitation de processus épigénétiques²¹⁷.

Ce résultat semble contradictoire avec une plus grande fluidité globale des membranes dans les cellules les plus plastiques qui empêcheraient l'activation de cette boucle de régulation entre CD44 et le métabolisme du fer. Cependant, nous allons voir maintenant que ce paradoxe peut être résolu en tenant compte du rôle vraisemblablement joué par les PUFA dans ce mécanisme. Nous venons de voir que l'apport en fer au sein des cellules est nécessaire pour l'augmentation de la plasticité cellulaire et donc la mise en place du phénotype des CCDD. Cette notion est à rapprocher de résultats issus de plusieurs laboratoires ayant montré l'existence au sein des CCDD d'une réponse antioxydante spécifique au fer et aux dommages associés pouvant induire un processus de mort cellulaire non-apoptotique, la ferroptose²¹⁸⁻²²². Alors qu'on pourrait expliquer cette réponse tout simplement par une augmentation de la concentration du fer au sein

des cellules les plus plastiques, l'ensemble de ces études démontrent que les CCDD possèdent en fait une plus grande sensibilité à la peroxydation lipidique. Cette sensibilité est notamment soutenue par un enrichissement en enzymes liées au métabolisme des PUFA tout particulièrement de l'acide arachidonique (AA), comme l'ACSL4 et la LPCAT3. Ces enzymes permettant respectivement l'activation d'un AG pour son intégration dans les membranes par ajout d'un CoA et l'acylation en sn2 des lysophospholipides. Or la ferroptose est un processus qui se met en place lorsque les ions ferreux labiles oxydent des molécules d'oxygènes par la réaction de Fenton produisant alors des ROS qui peuvent peroxyder les chaînes acyles polyinsaturées²²³. Ainsi l'ensemble de ces observations semblent montrer que l'un des points communs lors de l'acquisition d'un phénotype CCDD est l'augmentation de l'incorporation de l'AA au sein des membranes et donc la mise en place d'une réponse au stress associé au métabolisme du fer plus important. Deux conséquences importantes pourraient découler ensuite directement de cette plus grande incorporation de PUFA et notamment d'AA dans ces cellules.

Premièrement, ils induiraient une augmentation globale de la fluidité membranaire permettant ainsi une meilleure déformabilité de la membrane ce qui peut jouer un rôle important lors de la migration dans un contexte d'invasion tissulaire²²⁴⁻²²⁶ mais aussi plus largement dans l'établissement de nouveaux contacts avec le microenvironnement. Deuxièmement, l'insertion de PUFA au sein des glycérophospholipides de la membrane plasmique permet par un phénomène de séparation liquide-liquide de stabiliser les radeaux lipidiques²²⁷. En mettant en perspective ces effets biophysiques, on peut alors émettre l'hypothèse que l'insertion des PUFA au sein des membranes, notamment la membrane plasmique, pourrait par leurs modulations des propriétés biophysiques de la membrane optimiser les mécanismes associés à la séquestration du CD44 dans les radeaux lipidiques, y compris au sein d'une membrane globalement plus fluide. En résumé, le remodelage du cytosquelette par le CD44 déacylé, situé hors des radeaux lipidiques et permettant la motilité, se verrait facilité par l'augmentation de l'élasticité de la membrane tandis que la stabilisation des radeaux lipidique par séparation liquide-liquide des PUFA favoriserait le maintien d'un pool de CD44 assez stable au sein des radeaux lipidiques dans l'optique d'internaliser du fer pour les processus épigénétiques. Un appauvrissement global en cholestérol au sein des CCDD suivrait exactement la même logique en maintenant des pools restreints de ces molécules, stables dans les radeaux lipidiques, et facilitant l'endocytose du fer complexé à CD44.

Pour conclure, on voit que les rôles attribués aux PUFA dans ce contexte sont excessivement importants et ce point peut-être magnifiquement souligné par l'analyse de cellules intrinsèquement très plastiques comme les cellules souches embryonnaires. Des approches de type lipidomique ont montré qu'elles contenaient une quantité de PUFA plus importante que les cellules différenciées, comme des neurones ou encore des cardiomyocytes. De plus, leur différenciation s'accompagne par un stress redox qui n'est pas sans rappeler les travaux de Wicha où l'augmentation des ROS au sein des cellules cancéreuses aurait un rôle inducteur sur la différenciation des CCDD. Les PUFA étant fortement sensibles à l'oxydation, un concept proposant que de façon générale une augmentation des PUFA au sein des membranes puisse servir de senseur et d'inducteur du processus de différenciation semble séduisant^{152,228}. La contrepartie d'un tel mécanisme pour les cellules serait la nécessité d'une régulation élevée et spécifique contre la peroxydation lipidique afin de limiter le processus de ferroptose. De nombreux mécanismes redondants permettant de limiter la ferroptose par réduction des lipides

peroxydés, ont ainsi été décrits ces dernières années au sein des cellules cancéreuses les plus plastiques (Figure 16).

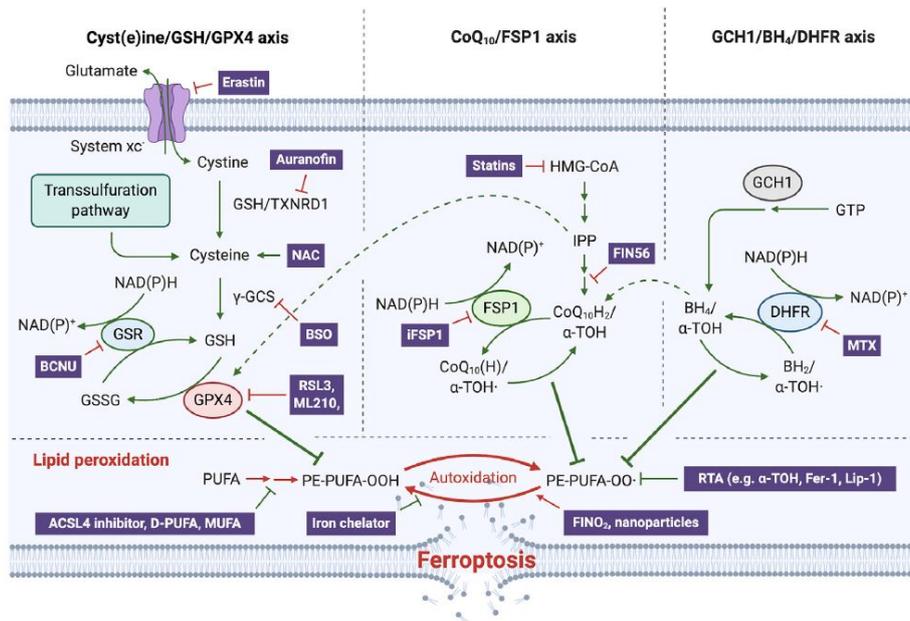


Figure 16 : Mécanismes anti- ou pro- ferroptoses et les molécules les inhibant. Le premier mécanisme fait appel à l'enzyme GPX4 qui permet grâce au couplage avec le glutathion de réduire les lipides peroxydés. Cette réaction de GPX4 est donc étroitement liée avec le transporteur xCT qui permet grâce à l'export d'une molécule de glutamate, l'entrée d'une molécule de cystéine et donc la formation du glutathion, mais aussi de la production cellulaire de NADPH²²⁹. Le second mécanisme est redondant avec celui de GPX4, mais fait appel à d'autres voies antioxydantes. En effet, il a pu être mis en évidence que lorsque la réduction des lipides peroxydés ne pouvait s'effectuer par GPX4, lors d'une inhibition ou de la déplétion du gène, la protéine FSP1 (Ferroptosis suppressor protein 1) pouvait grâce au CoQ₁₀, qui est synthétisé à partir de la voie du mévalonate, inhiber la ferroptose par réduction des lipides peroxydés^{230,231}. Ce mécanisme est aussi lié au NADPH, mais aussi à la voie métabolique des tétrahydrobioptéridines (BH₄) qui peut être couplée à la voie de FSP1, ou avoir une action directe sur la réduction des lipides peroxydés²³² (d'après J. Zheng, M. Conrad)²³³

L'ensemble de ces modifications du métabolisme lipidique, notamment lors de l'acquisition d'un phénotype CCDD, doivent forcément impliquer des modifications de composition lipidique des membranes. Or ces modifications notamment ceux variant le type d'acides gras acylés ou encore la quantité de cholestérols insérés dans les membranes peuvent modifier les caractéristiques biophysiques des membranes, notamment la fluidité membranaire. Je vais donc dans la prochaine partie faire le tour des techniques qui permettent de suivre ce paramètre.

4. Technique de mesure des propriétés biophysiques des membranes

Un ensemble de technique a été développé depuis un demi-siècle afin de mesurer les propriétés biophysiques de la membrane *in cellulo*. L'ensemble de ces techniques se sont fortement concentrées sur la discrimination des différents domaines, notamment les radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique afin de décrire les mécanismes protéiques associés à ces domaines. Je commencerai par les techniques non fluorescentes.

a) *Résonnance paramagnétique électronique*

La Résonnance paramagnétique électronique (*Electron paramagnetic resonance* : EPR) est une technique proche de la RMN. Le principe de la technique est le même, cependant l'excitation s'effectue au niveau d'un électron, principalement non parié, au lieu d'un proton. Ainsi l'utilisation de cette technique nécessite l'utilisation de molécules radicalaires et qui dans notre cas est couplée à une capacité à s'insérer dans les membranes, par exemple *16-Doxyl-stearic acid methyl ester*. Le signal obtenu lors d'une mesure dépend notamment de l'orientation du radical par rapport à l'axe du champ magnétique²³⁴. Ceci permet alors de sonder l'environnement, qui dans le cas de l'analyse de la membrane permet de déterminer un paramètre d'ordre S, plus il est élevé plus la membrane est rigide à l'inverse un faible niveau correspond à une plus grande fluidité membranaire²³⁵. L'inconvénient de cette technique est sa faible résolution, notamment la nécessité d'analyser un tissu et non pas une cellule unique. De plus, il est impossible de savoir la localisation de la sonde au niveau cellulaire.

b) *Microscopie à force atomique*

La Microscopie à force atomique (*Atomic force microscopy* : AFM) dans son utilisation classique est une technique permettant d'obtenir des résolutions de l'ordre du nanomètre ne nécessitant aucun ajout de sonde. Classiquement une pointe réfléchissant un laser s'approche de l'échantillon, qui est déposé sur une surface totalement plane, ce qui permet d'obtenir des informations sur les forces associées au niveau de l'interaction entre la pointe et l'échantillon. La pointe par répulsion électrique des protons permet lors d'un balayage latéral de suivre le niveau de la membrane et donc de l'épaisseur membranaire permettant ainsi de définir des microdomaines²³⁶. Cependant, l'analyse sur cellule nécessite une extraction des membranes au préalable, l'analyse ne s'effectuant jamais sur cellule entière. Une seconde utilisation peut être effectuée avec l'AFM afin d'effectuer des mesures sur la rigidité cellulaire. Cette fois-ci la pointe de l'appareil est forcée à rentrer en contact avec l'échantillon, la force est ensuite retirée pour observer la force exercée par l'échantillon lors du retour de la pointe²³⁷. L'intérêt de cette technique est de travailler sur des cellules entières et vivantes. Cependant, il est impossible de discriminer la réponse associée à l'ensemble des membranes de celle apportée par le cytosquelette.

c) *Redistribution de fluorescence après photoblanchiment*

Enfin, les trois autres techniques que je vais aborder sont toutes reliées à la fluorescence. Nous avons tout d'abord la Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence recovery after photobleaching* : FRAP). Cette technique nécessite un microscope et utilise l'une des propriétés des fluorochromes qui sont leur photoblanchiment lorsqu'ils sont soumis à de fortes intensités d'excitation. Ainsi le fluorochrome est photoblanchi dans une région de la membrane. Cette région est ensuite observée pour déterminer la vitesse à laquelle les molécules autour de la région encore fluorescentes reviennent par diffusion, donnant ainsi une courbe cinétique du retour de la fluorescence au sein de la région. Ainsi plus la membrane sera fluide, plus la diffusion des molécules sera grande et donc le temps de demi-recouvrement sera faible²³⁸. Le désavantage de cette technique est l'observation d'une seule région cellulaire ce qui ne permet pas l'analyse de l'ensemble des membranes. L'utilisation d'un laser à fort gain et l'apport élevé d'énergie peuvent physiquement modifier les propriétés de la membrane, la fluidité étant corrélée à la température

d) *Spectroscopie par corrélation de fluorescence*

La Spectroscopie par corrélation de fluorescence (*Fluorescence correlation spectroscopy* : FCS) est une technique qui permet d'observer des molécules fluorescentes à très faible concentration (nM jusqu'à pM). Cette technique est liée au mouvement Brownien des molécules et mesure les fluctuations d'intensité d'un fluorochrome dans un plan focal et au cours du temps. La FCS est généralement couplée à l'utilisation d'un microscope confocal. Elle permet notamment de mesurer un coefficient de diffusion de la molécule fluorescente²³⁹. Très utilisé pour la dynamique des protéines membranaires. La FCS a cependant des défauts, notamment la faible résolution que l'on peut obtenir, de plus il semble qu'aucune étude n'ait utilisé cette technique pour l'analyse de l'intégrité des membranes de la cellule.

e) *Suivie de particule unique*

Le Suivi de particule unique (*Single-Particle Tracking* : SPT) permet de suivre le mouvement de particules à une résolution du nanomètre. Par sa sensibilité élevée dans le temps et dans l'espace, cette technique est la plus résolutive pour étudier la dynamique des membranes, notamment la diffusion latérale. Tout comme les deux autres techniques, celle-ci nécessite aussi l'utilisation d'un microscope²⁴⁰. Cependant, la résolution élevée de cette technique a une contrepartie. En effet, il ne permet pas l'analyse des membranes dans leur intégralité et est fortement dépendant de l'affinité de la sonde fluorescente pour un environnement donné.

Des analyses utilisant certaines de ces techniques ont été utilisées au sein de l'équipe mettant en lumière que des cellules d'une lignée prostatique provenant d'une métastase osseuse (PC-3) étaient moins rigides et plus prônes à se déformer que des cellules saines de prostate (WPMY-1). Après extraction des lipides l'analyse par du FRAP sur monocouche de Langmuir appuyait ces observations avec une plus grande redistribution de la fluorescence chez les cellules PC-3 que chez les WPMY-1. Ainsi les lipides des PC-3 permettaient la constitution de membrane monocouche plus dynamique que ceux des WPMY-1²⁴¹. Ces résultats sous-entendaient avec ceux observés en EPR²³⁵ que les cellules cancéreuses possédaient des modifications de propriétés membranaires notamment par l'augmentation de leur fluidité. Cependant, l'ensemble des limites de ces techniques, l'EPR et sa résolution tissulaire, l'AFM avec la destruction du matériel d'origine et les techniques de fluorescence citée utilisable uniquement grâce à la microscopie avec une limite d'étude d'une membrane, font qu'au sein de mon projet de thèse, nous nous sommes tournés vers les sondes fluorescentes membranaires sensibles à la polarité.

5. Fluidité membranaire, Fluorescence et Solvatochromism

Le processus classique de la fluorescence se caractérise par trois étapes (Figure 17). La première étape est l'absorption d'un photon par la molécule. Seules certaines longueurs d'ondes peuvent être absorbées, celles correspondant à l'énergie entre deux niveaux orbitales. L'absorption du photon fait passer la molécule d'un état fondamental S_0 à un état excité S_1 . Ce processus correspond au passage d'un l'électron à une orbitale de plus haute énergie. Ce processus d'absorption est assez rapide avec un temps de l'ordre de 10^{-15} s. La seconde étape

est une conversion interne d'énergie par relaxation vibrationnelle. L'électron perd un peu d'énergie jusqu'à atteindre un état excité plus stable nommé S_1 . Ce mécanisme est aussi très rapide de l'ordre de 10^{-12} s. Enfin, la troisième étape correspond à l'émission d'énergie sous forme radiative, processus appelé fluorescence. Cette étape correspond à un retour de l'électron sur son orbite fondamentale S_0 par émission d'un photon. Ce mécanisme étant beaucoup plus lent que les deux autres étapes, de l'ordre de 10^{-9} s, il est assez facile de comprendre que l'ensemble des électrons d'un état S_1 ont eu le temps de subir une perte d'énergie pour atteindre le niveau S_1 . Comme l'état S_1 a un niveau énergétique plus bas que S_1' , l'ensemble des molécules excitées par l'absorption d'un photon émettent des photons de plus basse énergie que celui absorbé et donc de longueur d'onde plus grande. Ceci signifie que le photon émis par la molécule fluorescente sera décalé vers le rouge, ce décalage est appelé déplacement de Stokes.

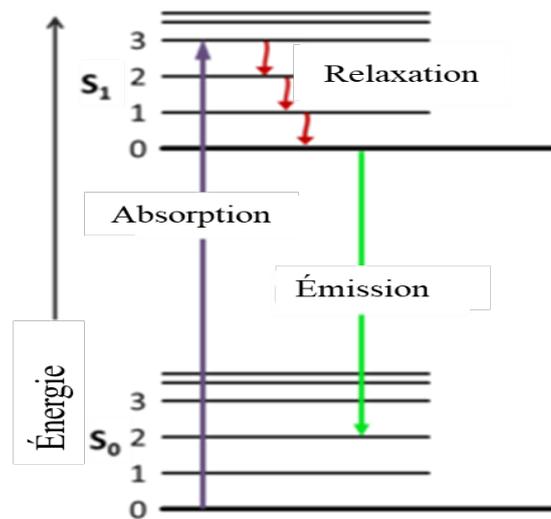


Figure 17 : Diagramme de Jablonski simplifié

Certaines molécules fluorescentes conjuguées à un lipide ont été synthétisées afin de sonder l'environnement lors de leur insertion au sein de la membrane. Ces sondes sont sensibles à des paramètres de la membrane tels que la viscosité, le pH ou encore le niveau d'hydratation. Lors de ma thèse, nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux sondes sensibles à l'hydratation de la membrane pour la mesure de la fluidité membranaire. En effet, le niveau d'hydratation d'une membrane est étroitement lié à son état physique. De plus, des changements de composition lipidique en son sein sont accompagnés d'une variation de son niveau d'hydratation²⁴². Parmi ces sondes, le Laurdan est probablement la plus connue²⁴³. Par sa structure le Laurdan peut s'insérer au sein des membranes via sa chaîne acyle, tout en étant amphiphile grâce à sa fonction amine et fluorescent grâce à son noyau naphthalène (Figure 18 A). Ce qui est intéressant avec cette sonde est sa capacité à émettre à deux longueurs d'ondes, avec un ratio d'intensité qui évolue en fonction qu'elle soit dans un environnement pauvre ou riche en molécules d'eau. Cette fluorescence à deux longueurs d'onde est due au phénomène de solvatochromisme. Lorsque la sonde se situe au niveau de régions membranaires ordonnées, la faible hydratation fait qu'il émet majoritairement à une longueur d'onde de 440 nm. À l'inverse lorsque la sonde se situe au niveau d'une région désordonnée, l'hydratation de la membrane se retrouve plus importante ce qui entraîne cette fois-ci une intensité majoritaire à 490nm²⁴⁴ (Figure 18 B et D). Le mécanisme derrière cette sensibilité membranaire s'explique

lors de la relaxation du système. En effet, lorsque la sonde est excitée par un photon, un moment dipolaire se crée au niveau de sa région polaire (Figure 18 A). Ainsi, si des molécules polaires telles que de l'eau se situent au niveau de la région polaire de la sonde, les molécules vont alors puiser de l'énergie au système pour s'aligner avec le moment dipolaire créé. On parle alors de relaxation dipolaire. Sachant que cette perte s'effectue en amont de l'émission d'un photon par fluorescence, lorsque la sonde subit une relaxation dipolaire, le photon émis sera de plus faible énergie et donc décalé vers le rouge, à comparer du photon émis lorsque la sonde est dans un environnement apolaire (Figure 18 C). C'est en 1990 que T. Parasassi et E. Gratton ont proposé une formule mathématique permettant de représenter le niveau de fluidité membranaire, le paramètre de polarisation généralisée (Generalized Polarisation : GP) qui est la différence d'intensité entre la longueur d'onde à 440 nm et celle de 490 nm sur la somme de deux. Plus le GP est élevé plus la membrane est rigide et inversement plus il est faible plus la membrane est fluide²⁴⁵ (Figure 18 D).

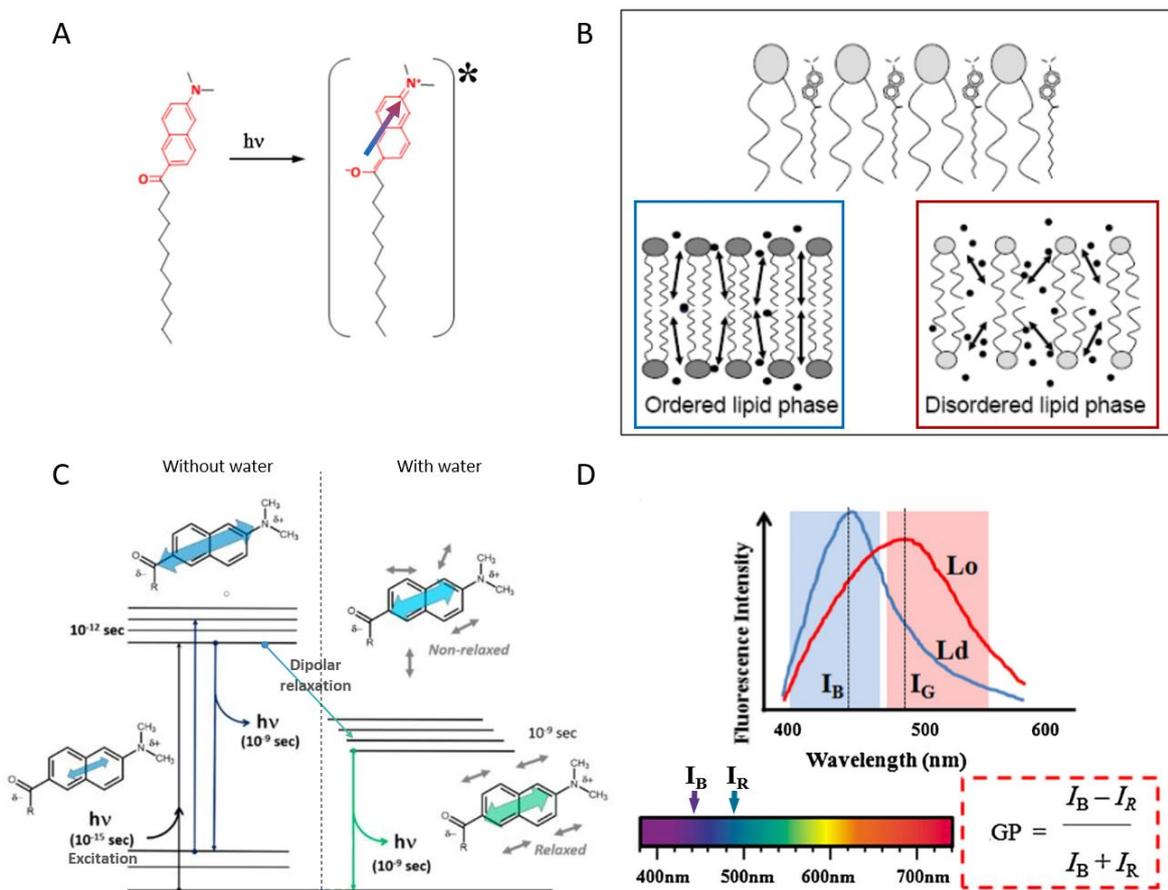


Figure 18 : Mécanisme de fluorescence ratiométrique du Laurdan. A) Représentation de la création d'un moment dipolaire après excitation de la sonde. B) Schématisation de l'environnement du Laurdan en fonction de l'état physique de la membrane et du niveau d'hydratation. C) Diagramme de fluorescence du Laurdan en fonction de son environnement. D) Schématisation des spectres d'émission en fonction de l'environnement du Laurdan ainsi que la formule du paramètre de polarisation généralisé (GP) (d'après G. Gunther *et al.*, A.G. Jay et J.A. Hamilton, et S.A. Sancher *et al.*)²⁴⁶⁻²⁴⁸

L'intérêt de ce type de sonde pour mesurer la fluidité membranaire est la facilité d'utilisation tout en ayant une précision élevée grâce à la technologie basée sur la détection de la

fluorescence. De plus par rapport aux autres techniques de fluorescences citées plus tôt, la mesure du paramètre GP peut être effectuée en microscopie, mais aussi via d'autres appareils comme un spectrofluorimètre ou encore un cytomètre en flux. Chacune de ces techniques permettant d'obtenir des informations différentes avec des niveaux de complexité expérimentaux différents. Les premiers travaux effectués avec ce type de sonde se portaient quasi exclusivement sur le comportement dynamique des membranes de vésicules unilamellaires géantes et utilisaient principalement le Laurdan. Ces travaux sur les vésicules synthétiques ont permis de valider l'efficacité de la sonde pour suivre la fluidité membranaire²⁴⁹, mais aussi de visualiser l'effet du cholestérol, de décrire la coexistence de différentes phases au sein de la membrane lorsque plusieurs espèces lipidiques forment les vésicules²⁵⁰. Par la suite, lorsque la technologie des microscopes a permis une meilleure résolution, les travaux ont alors pu aborder différents aspects liés à la fluidité membranaire, comme les propriétés structurales ou encore les propriétés fonctionnelles des membranes au sein des cellules. On peut citer les travaux de K. Gaus *et al.* qui ont été les premiers à utiliser le Laurdan sur cellules vivantes²⁵¹. Ils ont notamment pour la première fois pu observer le GP moyen de la membrane plasmique ainsi que des endomembranes montrant alors que leurs observations étaient bien corrélées avec la composition connue des membranes cellulaires. La membrane plasmique avait un GP plus élevé que celui des endomembranes, reflétant bien la composition riche en sphingomyélines et en cholestérol de la membrane plasmique à comparer des endomembranes. De plus, ils ont pu mettre en évidence que la déplétion du cholestérol par du M β CD sur des fibroblastes, impactait majoritairement la membrane plasmique en diminuant son GP, donc en augmentant sa fluidité membranaire. D'autres études ont permis de montrer à partir de la mesure du GP l'impact de l'apport nutritionnel sur le métabolisme des lipides modulant alors la fluidité des membranes. G. Maulucci *et al.* ont notamment étudié l'effet d'un import nutritif important sur des cellules bêta pancréatiques²⁵². Ils ont pu ainsi observer une augmentation élevée du GP des endomembranes lors d'un ajout d'acide palmitique (500 μ M durant 16 h). Ce qui est intéressant avec ce résultat, c'est de voir la modification biophysique de la membrane du réticulum endoplasmique qui renforce l'idée que la fluidité membranaire du RE serait à l'origine de la réponse UPR, que l'on retrouve dans le processus tumoral¹⁹⁰. Enfin, leur étude de la fluidité membranaire sur des globules rouges a permis aussi d'ouvrir sur de nouvelles questions biologiques. En effet, leurs analyses de globules rouges de souris déficientes du gène *Lcat* ou *ApoA1*, qui ont tous deux un rôle sur la formation des lipoprotéines de type HDL, ont pu mettre en évidence que malgré leur rôle commun sur le métabolisme physiologique du cholestérol, les globules rouges arborent une variation du GP de leur membrane plasmique opposée. En effet, alors que les globules rouges des souris *Lcat*^{-/-} ont un GP de leur membrane plasmique qui diminue par rapport aux WT, ceux des souris *ApoA1*^{-/-} ont un GP plus élevé que ceux des WT. Par l'observation de la fluidité membranaire des globules rouges, les auteurs mettent en lumière sur un paradigme et l'influence de la régulation des lipoprotéines sur la biophysique des membranes plasmiques des globules rouges¹⁹⁰. Il est intéressant de voir que sur l'ensemble de ces travaux le Laurdan semble marquer des compartiments très rigides au niveau du cytosol. Nous le verrons plus tard dans la partie « résultats », nous avons pu déterminer la nature de ces régions très rigides comme étant des gouttelettes lipidiques. Ce biais sur la mesure de la fluidité membranaire a pu être éliminé grâce au développement d'une nouvelle sonde analogue au Laurdan au sein de l'équipe. L'excitation

du Laurdan s'effectuant dans l'ultra-violet, pour éviter des modifications de la fluidité membranaire durant l'exposition au laser UV lors de l'excitation, la plupart des mesures en microscopie doivent s'effectuer en microscopie biphotonique. Ce type de microscopie se base sur l'émission en simultané de deux photons d'énergie deux fois plus faible que la longueur d'onde d'excitation, permettant ainsi une meilleure pénétration du rayon d'excitation ainsi que de diminuer l'énergie du rayon permettant alors de diminuer l'impact du laser sur l'échantillon biologique²⁵³. Or l'appareillage permettant d'effectuer ce type de microscopie étant très coûteux et complexe, d'autres molécules dont l'excitation et l'émission ont été décalées, comme le di-4-ANEPPDHQ, ont été développés permettant d'effectuer des mesures de GP et donc de la fluidité membranaire avec une excitation dans le bleu (488nm)²⁴³. De même, d'autres molécules fluorescentes plus polaires que le Laurdan comme le c-Laurdan ont été développées afin de permettre un marquage plus efficace des membranes cellulaires²⁵⁴. Le c-Laurdan a notamment été utilisé pour mesurer l'augmentation de fluidité des membranes dans un contexte de réponse d'une alimentation riche en PUFA oméga-3²⁵⁵. J'aimerais une nouvelle fois souligner, que même s'il n'est pas fait référence dans l'article, il est aussi possible tout comme pour le Laurdan d'observer des régions rigides au sein de cytosol, qui là encore refléteraient un marquage de gouttelettes lipidiques. Enfin, le di-4-ANEPPDHQ a quant à lui été utilisé pour observer l'effet du maintien de la protéine Rac1 sur la fluidité membranaire de l'enveloppe nucléaire lorsqu'il est fortement concentré au sein du noyau. Les auteurs ont pu démontrer que la translocation de Rac1 au sein du noyau permet une augmentation de l'activité de RhoA qui contribuerait alors à la mise en place d'un phénotype invasif. Cette modulation de l'activité de RhoA par la séquestration de Rac1 dans le noyau s'accompagne d'une modulation de la structure membranaire en compromettant la distribution du complexe nucléaire de Lamin/Emerin, se traduisant par une augmentation de la fluidité membranaire²⁵⁶. Un point intéressant avec ces observations est l'importance de la réduction du complexe Lamin/Ezrin pour la déformation nucléaire qui est nécessaire lors de la migration cellulaire au sein de la matrice extracellulaire des cellules cancéreuses²⁵⁷. De plus, il a pu être démontré qu'un phénotype souche, à forte plasticité génomique, était aussi associé à une plus forte plasticité mécanique du noyau, notamment dû à l'absence de lamine A au sein des cellules souches²⁵⁸. Ainsi lors de la différenciation des cellules souches, plusieurs phénomènes biophysiques se mettent en place grâce à l'augmentation de la LAMINE A. La première est la diminution de la dynamique du remodelage de la chromatine, permettant alors de fixer une identité cellulaire²⁵⁹. Cette diminution de la dynamique de la chromatine s'accompagne alors d'une diminution de la plasticité mécanique du noyau²⁵⁸. Ainsi, il est assez tentant d'imaginer que de tels mécanismes de remodelage chromatinien et de plasticité mécanique se mettent en place lors de l'acquisition d'un phénotype CCDD dans un contexte tumoral, permettant alors à la cellule d'acquérir une capacité migratoire et de perturber la fluidité membranaire.

Au sein de l'équipe, dans les années qui ont précédés mes travaux de thèse, un ensemble de sondes ratiométriques a été développé afin d'améliorer les propriétés physicochimiques du Laurdan et faciliter les mesures du paramètre GP *in cellulo*²⁶⁰. L'une des sondes développées, le Dioll, a montré des résultats très prometteurs lors de sa caractérisation sur des systèmes membranaires biomimétiques. Sa caractérisation au niveau biologique (cellulaire et vésicules extracellulaires) sera consacrée à l'une des parties des résultats de thèse.

C. Objectif de thèse

Comme nous venons de le voir, le processus tumoral dans le tissu mammaire est fortement corrélé avec la perte de l'identité cellulaire du tissu. Cette modulation de l'identité a notamment pu être associée avec l'acquisition de caractères proches de ceux des cellules souches que l'on retrouve dans un tissu sain. La capacité de ces cellules au phénotype souche à initier la prise tumorale *in vivo* et à installer une hétérogénéité phénotypique fait que ce processus a très vite été associé au modèle des cellules souches cancéreuses, les CSC. Cependant, dans un contexte tumoral, la hiérarchie étant bidirectionnelle, avec pour origine des CSC des cellules différenciées, le nom de cellules cancéreuses dynamiquement dédifférenciées (CCDD) semble plus en adéquation avec les mécanismes de perte d'identité et d'acquisition d'une plasticité phénotypique. Ces cellules grâce à une ouverture chromatinienne plus élevée que les cellules différenciées ont la capacité d'adopter des réponses en adéquation aux différents changements qu'elles peuvent croiser. Ces réponses permettent alors de maintenir la croissance tumorale par le maintien d'un « *bulk* » cellulaire plus différenciée ou encore acquérir des capacités invasives et d'adaptations à un nouveau tissu. L'hétérogénéité phénotypique que l'on retrouve au sein des tumeurs se traduit aussi par une hétérogénéité métabolique, mettant en lumière certaines caractéristiques des cellules CCDD, ainsi que le rôle que peuvent avoir les variations métaboliques sur les processus de plasticité cellulaire. Ne faisant pas exception, le métabolisme lipidique est aussi impacté lors du processus tumoral, modulant alors la nature des lipides synthétisés et leur régulation. L'une des conséquences de cette variation est le changement de la composition lipidique des membranes. Or changer la nature des lipides au sein des membranes a pour répercussion une modification des propriétés biophysiques des membranes telle que la fluidité membranaire. Ce paramètre biophysique étant corrélé au niveau de l'hydratation membranaire, il est donc possible de le mesurer à l'aide d'une sonde fluorescente ratiométrique, tel que le Laurdan. Or certains défauts de l'utilisation du Laurdan sur les cellules, fait qu'au sein de l'équipe de multiples sondes analogues du Laurdan ont été synthétisées. L'une d'elles très prometteuse, le Dioll, a pu être caractérisée sur membrane biomimétique et semblait prometteuse pour son utilisation sur cellule.

Lors de ma thèse, je me suis donc intéressé à la possibilité de suivre la plasticité cellulaire par leur fluidité membranaire lors du processus tumoral. Cela permettrait alors de développer des outils de diagnostic clinique simple à partir de ce paramètre biophysique. Dans un premier temps, j'ai fini le développement d'une sonde fluorescente ratiométrique créée au sein de notre équipe se basant sur les mêmes propriétés physico-chimiques que le Laurdan, le Dioll. Cette étape a permis de montrer une meilleure résolution de la mesure de la fluidité des membranes par rapport aux sondes préexistantes. Dans un second temps, j'ai pu utiliser cette sonde en vue de suivre la fluidité membranaire lors de différents processus de plasticité. Le but étant de créer un possible index de plasticité phénotypique par la mesure de la fluidité membranaire.

Résultat n°1



Caractérisation de la sonde Dioll

Comme nous venons de le voir, les sondes fluorescentes ratiométriques préexistantes telles que le Laurdan ou encore le c-Laurdan ont un ensemble de défauts qui rend difficile leur utilisation pour le marquage de cellules. L'équipe a donc créé un ensemble de sondes analogue du Laurdan. L'une d'elles avait dans des modèles membranaires biomimétiques (les liposomes) une meilleure résolution de la mesure de la fluidité membranaire par rapport au Laurdan et au c-Laurdan. Cette sonde nommée, Dioll, par sa tête polaire plus importante, permettrait une meilleure distribution dans un modèle cellulaire en comparaison du Laurdan et une meilleure précision que le c-Laurdan.

Ma première partie de thèse avait donc pour but de décrire et de comparer le Dioll aux deux autres sondes dans un modèle cellulaire. Ces travaux ont permis de décrire la cinétique d'incorporation de ces sondes. À l'origine pensé comme une incorporation passive suivie de sa diffusion au sein des membranes. Or nous avons pu observer que le marquage des membranes cellulaires s'effectue plus rapidement en présence de protéines « *carrier* » de lipides, ce qui traduirait un mécanisme de couplage entre une incorporation active au sein des endomembranes et une incorporation passive au sein de la membrane plasmique. Dans un second temps, des mesures par microscopie confocale ont permis de déterminer avec une qualité d'image encore jamais atteinte des différences de fluidité membranaire, notamment entre la membrane plasmique rigide et les endomembranes plus fluides. Ces observations étant en accord avec la description de la littérature. On remarquera cependant que le Dioll possède une meilleure distribution au sein des membranes cellulaires en comparaison des deux autres cellules, ce qui permet lors de la mesure membranaire de la cellule entière une meilleure représentation des endomembranes. De plus, sa meilleure résolution sur les variations de fluidité décrite sur les liposomes permet une meilleure discrimination entre les régions rigides et fluides. La conséquence est une amélioration des mesures entre les différents organites et la membranaire plasmique, mais aussi plus intéressant, au niveau d'une membrane donnée où l'on a mis en évidence une meilleure discrimination de microdomaines de fluidité différente au niveau de la membrane plasmique. Nous avons par la suite pu mettre en évidence l'intérêt du Dioll pour le suivi de fluctuation du métabolisme cellulaire. En effet, une complémentation du milieu avec un acide gras saturé ou insaturé s'accompagne respectivement de modifications de la fluidité membranaire, avec respectivement une rigidification et une fluidification des membranes. Montrant que le Dioll a la capacité de détecter des variations de fluidité membranaire impactées par des modifications métaboliques. Enfin, nous avons pour la première fois montrée que les sondes préexistantes à l'inverse du Dioll, marquaient les lipides non membranaires (gouttelettes lipidiques). Cette observation met ainsi en lumière les biais que peuvent entraîner les sondes préexistantes lorsque l'on veut mesurer les membranes. L'ensemble de ces résultats faisaient du Dioll un outil performant pour mesurer les variations de fluidité membranaire dans un contexte pathologique et tout particulièrement lors de remodelage du métabolisme que l'on retrouve dans la tumorigenèse.

Dioll, a fluorescent probe for in-depth characterization of cell membrane fluidity

Sébastien Ibanez^{1,2,3§}, Mouhedine Cheniour^{1§}, David Gueyrard^{1§}, Milène Nitenberg¹, Larissa Socrier¹, Jihen Zouaoui^{1,4}, Layth Ben Trad^{1,4}, Julien Bompard⁵, Thomas Guillot¹, Samia Selmi-Ruby^{2,3}, Ahmed Landoulsi⁴, Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu⁶, Agnès Girard-Egrot⁵, Christophe Vanbelle⁷, Léa Payen-Gay⁸, Pierre Martinez^{2,3}, Alain Puisieux^{2,3}, Peter Goekjian¹, Ofélia Maniti⁵, Olivier Marcillat³, Arnaud M. Vigneron^{2,3*}, Thierry Granjon^{1*}

§ These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed: Arnaud M. Vigneron-Thierry Granjon.

arnaud.vigneron@lyon.unicancer.fr; Centre Léon Bérard, Bat Cheney D, 28 rue Laënnec, 69373 Lyon cedex 08, France. Tel: 04 69 85 60 85

thierry.granjon@univ-lyon1.fr; Université de Lyon, ICBMS UMR CNRS-UCBL 5246, Bat. Lederer, 1 rue Victor Grignard, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex - France.

ABSTRACT: The control of membrane fluidity constitutes an essential mechanism of cell physiology, regulating macromolecular assembly, lipid and protein trafficking, and cell signaling. The kinetic and spatial understanding of these mechanisms is underappreciated and their elucidation is highly challenging. This is partly due to the lack of tools able to quantify this property in live cells with a sufficient resolution to detect heterogeneity of inter- and intramembrane fluidity and the kinetic fluctuation of this property in response to biological stimuli. Here, we present the synthesis of a new chemical dye able to precisely and dynamically measure variations in membrane fluidity. The high affinity of the dye for all cell membranes enabled us to comprehensively visualize and quantify different membrane fluidities in live mammalian cells without interference from non-membranous lipids. Using this tool, we report for the first time the direct measurement of (1) differences in the fluidity of most membranous structures present in a cell, (2) the existence of lipid microdomains in plasma membranes, (3) the effect of cell crowding on plasma and endomembranes, and (4) the consequences of nutritive modulation on these membranous systems.

INTRODUCTION

Biological membranes, originally regarded as inert structural constituents, are essential determinants and active regulators of biological functions. Plasma membranes control the physical separation of intracellular domains from the extracellular environment and ensure a tight control of molecular exchanges between both compartments. Similarly, endomembranes regulate molecule trafficking, isolate specific molecular functions and supply crucial platforms for the assembly of supramolecular complexes, such as the mitochondrial respiratory chain or endoplasmic reticulum (ER)-associated ribosomes. Consequently, the biophysical properties of membranes such as viscosity, bending rigidity, and fluidity are critical for many cell functions, requiring a constant biochemical control of lipid composition and partitioning between membrane leaflets.

As a consequence, dysregulations of membrane fluidity induce stress responses and pathologies, and the ability to measure fluctuations in this parameter may improve our understanding of the progression of several diseases. Metabolic syndromes induced by Western diets are for instance associated with excessive saturated fatty acid intake, disturbing the homeostasis of the ER, leading to the unfolded protein stress response and in turn to deleterious inflammation¹. Alterations in membrane fluidity are suspected to underlie this process even though this has never been clearly demonstrated^{2,3}. Similarly, neurodegenerative diseases have been attributed to perturbations in the physical properties of membranes, since greater fluidity was reported to favor protein aggregates, such as those observed in Alzheimer's disease⁴.

Owing to this key role, many efforts to measure membrane fluidity in live cells have been reported. Bulk fluidity has

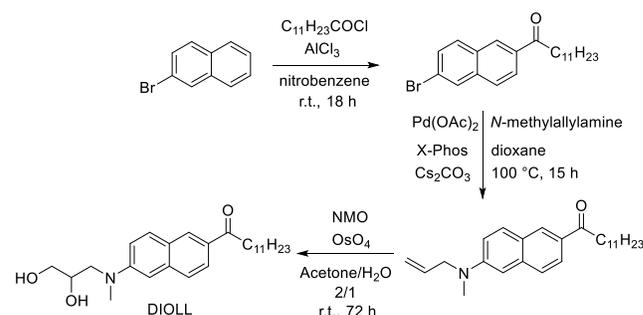
been assessed via diverse spectroscopic methods, including electron paramagnetic resonance (EPR) and fluorescence spectroscopy⁵⁻⁷. Solvatochromic fluorescent dyes have been developed such as Laurdan, Nile red, and Di-4-ANEPPDHQ. These dyes reflect the polarity of their environment, thus providing insight into the hydration state resulting from the packing of lipid molecules and hence the level of membrane fluidity⁸. The transition from a gel phase to a crystal-liquid phase causes a clear shift in their emission spectrum towards longer wavelengths (red shift)⁹⁻¹¹. In the case of Di-4-ANEPPDHQ, molecular mechanisms underlying spectral changes have been shown to be dependent on the presence of cholesterol in membranes via an electrochromic effect, i.e. a change in membrane potential causing a shift in emission¹², thus casting some doubts on the relevance of this dye for measuring membrane fluidity. Nile red probes have a strong affinity for hydrophobic environments such as lipid droplets and require specific functionalization for preferential targeting to a biological membrane¹³. They are therefore unable to stain the whole membranous system of a cell. Laurdan, the most commonly used probe for measuring membrane fluidity is also relatively hydrophobic and poorly soluble in biological aqueous buffers, causing its precipitation in extracellular medium and poor distribution in disordered lipid membranes^{14,15}. To address these constraints, several Laurdan-derived fluorophores have been reported¹⁴⁻¹⁶. C-Laurdan (6-dodecanoyl-2-[N-methyl-N-(carboxymethyl)-amino] naphthalene), for instance, has a supplementary carboxyl group at the amino-naphthalene moiety, which induces favorable hydrophilic interactions with water molecules near the lipid headgroups¹⁵; a property normally associated with a greater ability to stain membranes in an aqueous environment^{9,17,18}. However, due to its carboxylic group which dissociates with a pKa of 6.6, C-Laurdan fluorescence properties are affected by the presence of charged phospholipids and by pH variations in various cell compartments. Thus, while these probes perform well in model membrane systems, only few reports of successful measurements of membrane fluidity using fluorescence in live cells have been published.

In the present work, we synthesized a new chemical sensor of membrane fluidity, termed Dioll, that overcomes limitations previously associated with common solvatochromic dyes. Uptake of the dye, its brightness, and its ability to define accurately the fluidity of membrane in live cells were all enhanced through structural optimization. Cellular studies confirmed the significant advantages of Dioll for analyzing spatially and kinetically the fluidity of membranes under relevant stimuli such as mechano-transduction and nutritive modulation.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis. We previously proposed a versatile synthetic approach to Laurdan analogues in a two-step sequence using a Buchwald-Hartwig amination reaction¹⁶. The new Laurdan analog, Dioll, was prepared by a similar route (Scheme 1). In the first step, 2-bromo-6-lauroylnaphthalene (**1**) was obtained by Friedel-Crafts acylation of 6-bromonaphthalene¹⁹. N-methylallylamine was introduced through a palladium-catalyzed Buchwald-Hartwig reaction²⁰⁻²² (compound **2**). The new Laurdan derivative 1-((2,3-dihydroxypropyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)dodecan-1-one (**3**) was obtained through OsO₄-catalyzed dihydroxylation. This probe and its precursors were well characterized by ¹H and ¹³C NMR and HRMS (Figure S1). The new molecule bears two hydroxyl groups on the polar head and was accordingly named Dioll (Scheme 1 and S1). The design rationale was to increase the polarity of the fluorescent headgroup without adding any charge, and to increase solubility of the dye at the hydrophobic/water interface. Moreover, this higher solubility was expected to prevent dye aggregation and fluorescent quenching in less hydrophobic environments.

lene (**1**) was obtained by Friedel-Crafts acylation of 6-bromonaphthalene¹⁹. N-methylallylamine was introduced through a palladium-catalyzed Buchwald-Hartwig reaction²⁰⁻²² (compound **2**). The new Laurdan derivative 1-((2,3-dihydroxypropyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)dodecan-1-one (**3**) was obtained through OsO₄-catalyzed dihydroxylation. This probe and its precursors were well characterized by ¹H and ¹³C NMR and HRMS (Figure S1). The new molecule bears two hydroxyl groups on the polar head and was accordingly named Dioll (Scheme 1 and S1). The design rationale was to increase the polarity of the fluorescent headgroup without adding any charge, and to increase solubility of the dye at the hydrophobic/water interface. Moreover, this higher solubility was expected to prevent dye aggregation and fluorescent quenching in less hydrophobic environments.



Scheme 1. Synthesis of DIOLL from 2-bromonaphthalene

Photophysical Properties. The ability of Laurdan and C-Laurdan to report on the polarity of the environment is based on the shift in fluorescence emitted from lower wavelengths for non-polar solvents (423 and 416 nm for toluene, 440 and 432 nm for chloroform) to higher wavelengths for polar solvents (460 nm and 450 for DMSO, 485 nm for both in ethanol, for Laurdan and C-Laurdan, respectively) (Figures 1A and Table S1). This property, named bathochromic effect, characterizes solvatochromic dyes sensitive to the lipid-ordered state of membranes and their correlated fluidity

The spectroscopic properties of Dioll were compared to that of Laurdan and C-Laurdan in organic solutions. The bathochromic shift was confirmed with Dioll, as its maximum emission wavelength changed with increasing solvent polarity (425 nm in toluene, 441 nm in chloroform, 460 nm in DMSO and 486 nm in ethanol,) (Figures 1A and S2A). Importantly, the fluorescence intensity of Dioll was 1.5- to 2-fold greater than that of the two Laurdan analogues, irrespective of the solvent used (Figures 1A and Table S1). Unlike C-Laurdan which showed very low fluorescence intensities in polar solvents (i.e., a hypochromic effect; 3 times lower than that of Laurdan in ethanol), Dioll displayed almost no hypochromic effect and its intensity in ethanol was 2- and 5-fold greater than Laurdan and C-Laurdan, respectively. Hence, this enhanced fluorescence

makes Dioll an ideal candidate for microscopy and spectroscopic applications.

To validate this candidate, we measured the fluorescence response of Dioll in biomimetic membranes by comparing the fluorescence intensities of the new probe with those of Laurdan and C-Laurdan in liposomes constituted of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), which is one of the major phospholipid constituents of cell membranes. Interestingly, we observed an even higher response from Dioll compared to Laurdan and C-Laurdan with an increase in fluorescence intensity exceeding 7-fold (Figures 1B and Figure S2).

We then compared the ability of the new probe to report on the lipid-ordered state of a mimetic membrane with those of Laurdan and C-Laurdan by using liposomes made of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC). Its lipid-ordered transition, between a gel phase and a liquid phase occurs around 23°C, which makes it a convenient model at room temperature to evaluate the capacity of the dye to measure changes in membrane fluidity. Our results confirmed that the fluorescence spectrum of Laurdan and Dioll inserted into DMPC liposomes evolved when the temperature rose from 5°C to 65°C (Figure 1C). At temperatures below the phase transition, the fluorescence spectrum peaked at 440 nm as expected for a gel phase. Above 23°C, the fluorescence intensity at 440 nm decreased in favor of an increase in intensity around 490 nm. This shift in emission became more pronounced as the temperature rose, reflecting the number of lipid molecules in a disordered state. Emissions at 490 nm became predominant when temperatures exceeded 28°C. The fluorescence spectrum of C-Laurdan in DMPC also shifted towards higher wavelengths, but a significant decrease in fluorescence intensity was recorded as the temperature rose (Figure 1C). This reduction in fluorescence emission was also observed to a lesser extent with Laurdan, but was negligible with Dioll, with intensity ratios for gel over liquid-crystalline phase of 0.8 for Dioll vs 0.6 for Laurdan and 0.2 for C-Laurdan (Figure 1C).

The sensor response described above was then quantified by calculation of the Generalized Polarization (GP) parameter (see Methods). This parameter is commonly used to provide a quantitative index of membrane fluidity. For Dioll and Laurdan, GP values decreased with increasing temperature, with a sharp drop at 21°C, where the liquid-crystalline phase emerged (Figure 1C). Phase transition is a cooperative phenomenon and once lipid chains begin to adopt a disordered conformation, the process is amplified. The inflexion point was measured at 23°C with Laurdan and Dioll, consistent with previously reported values of DMPC melting temperature (T_m). Above the transition temperature, GP values for both dyes continued to decrease, though less sharply than around the phase transition temperature. The two fluorophores were sensitive to

the mobility of water molecules in the vicinity of the excited naphthalene moiety and, although lipids are in a liquid-crystalline phase, the solvent mobility at the polar/non-polar interface continues to increase with membrane fluidity and rising temperature. C-Laurdan also displayed a decrease in GP values with higher temperatures (Figure 1C), but the amplitude of this decrease was lower than for Laurdan and Dioll, and GP did not evolve above the phase transition temperature. Overall, Dioll and Laurdan showed large differences in GP values between the ordered/gel and disordered/liquid-crystalline states, which enabled us to detect variations in lipid bilayer fluidity in the disordered phase well beyond phase transition.

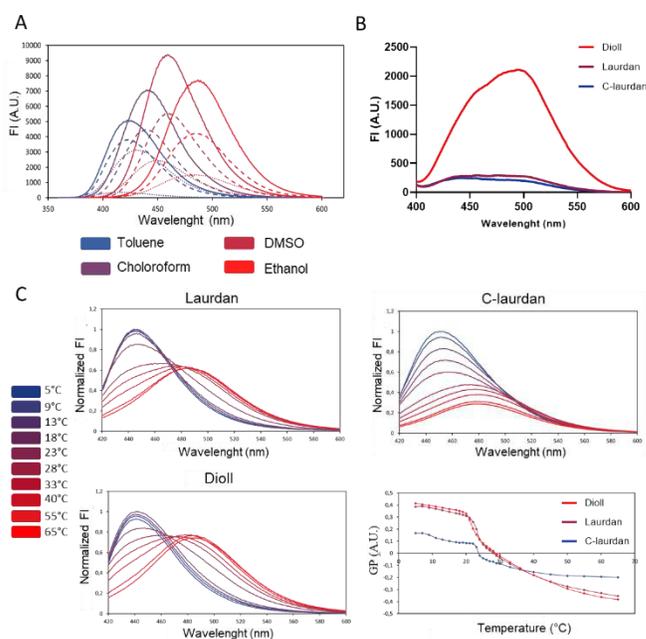


Figure 1. Photophysical properties of Laurdan and its derivatives. (A) Fluorescence emission spectra of Dioll compared to Laurdan and C-Laurdan in organic solvents of increasing polarity (dash lines, Laurdan, dotted lines, C-Laurdan, full lines, Dioll). Probe concentration was 0.2 μM . (B) Fluorescent signal emitted by polarity-sensitive probes (0.2 μM) in POPC liposomes. (C) Fluorescence emission spectra (excitation wavelength 390 nm) of Laurdan (upper left), C-Laurdan (upper right) and Dioll (lower left), and Generalized Polarization (GP) calculations obtained with the polarity sensitive probes (0.2 μM) in DMPC liposomes according to temperature (lower right).

Enhanced properties of Dioll for spectral imaging in live-cells. Spectral imaging of membrane fluidity in live cells requires a probe with key features in order to obtain an optimal analysis : an accurate measurement reflecting the lipid composition of membranes, the ability to efficiently enter in the cells, a high level of brightness in every type of membrane, and high sensitivity to fluidity variation over the largest dynamic range.

We thus verified each of these properties and first checked whether Dioll was also able to provide feedback on variations in the state of membranes that depend on combined lipid characteristics: acyl chain length and unsaturation. Dioll was thus inserted into preformed liposomes constituted of phosphatidylcholines with different chain lengths and unsaturation (ranging from 14 to 18 carbons for chain length and from 0 to 2 for chain unsaturation, respectively (Table S2)). Fluorescence spectra were recorded (Figure 2A) and the GP parameter was measured at 21°C (Figure 2B). GP values fluctuated according to the different T_m of the liposomes used, with the most rigid, DSPC (C18:0) resulting in a GP value of 0.58 and the most fluid DLPC (C18:2) a GP value of -0.26. Overall, we demonstrated that Dioll was able to accurately and precisely report change in membrane fluidity according to lipid composition.

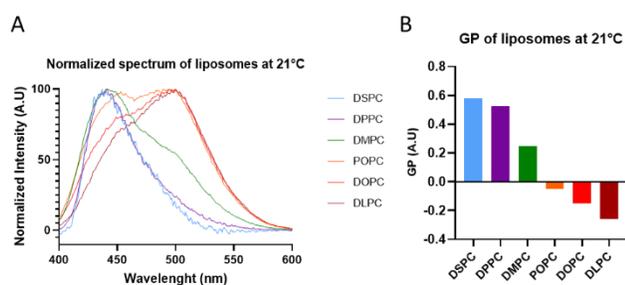


Figure 2. Property of Dioll to measure membrane fluidity in biomimetic and physiological vesicles. (A) Representative experiment showing the normalized spectrum of Dioll fluorescence emission wavelengths at 21°C of indicated liposomes. (B) GP values calculated from the previous spectrum.

We then investigated whether this dye was more suitable than Laurdan derivatives at entering and staining live cells. We used adherent and non-transformed Human Mammary Epithelial Cells (HMECs), and first compared the signal intensity obtained with the different dyes at several concentrations after a 24 h incubation period. These conditions were optimized for the three dyes. As expected from its photophysical properties, the fluorescence intensity of Dioll was consistently one log higher at all concentrations tested (Figure 3A). Next, we verified whether probe entry into the cell was also enhanced. We followed and compared the kinetics of Dioll and Laurdan derivative incorporation into HMECs with different media supplemented, or not, with serum proteins (Figure 3B and Figure S3). Serum proteins were expected to increase probe solubility through their ability to create a hydrophobic water interface chemically comparable to the biological membrane²³. Moreover, Dioll containing hydroxyl groups in its structure was, comparatively with other dyes, structurally closer to endogenous lipids such as phosphorylated forms of acyl-glycerol or sphingosine base, these lipids being efficiently delivered to cells by transfer from serum proteins²⁴. For each probe tested, the medium containing either the complex palmitate/BSA or FBS led as expected to greater incorporation than serum/lipid-free media. More importantly, Dioll had a robustly shorter incorporation half-time ($T_{1/2} = 21.99$ min in FBS) compared to Laurdan and

C-Laurdan ($T_{1/2} = 67.30$ min and 157.3 min in FBS) when lipid-protein carriers were present (presence of FBS) (Figure 3C). Hence, uptake in live cells was more efficient for Dioll than for the other dyes.

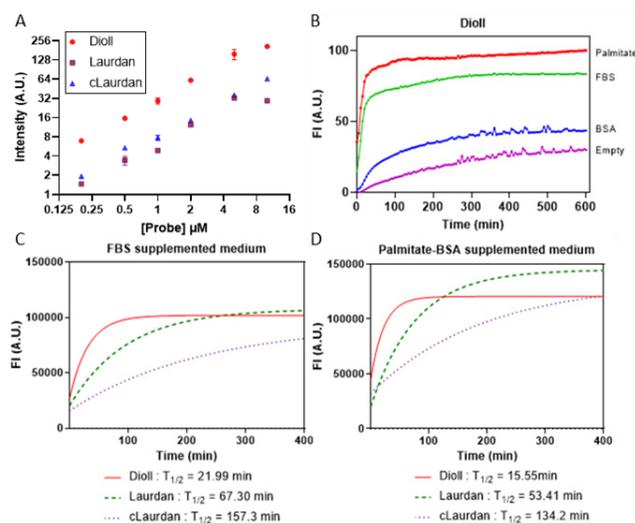


Figure 3. Dye uptake and staining in live cells. (A) Fluorescent intensity of HMECs incubated with different concentrations of indicated dye for 24 h. (B) Real-time measurement of Dioll fluorescence in the same cells grown in the indicated medium (no fetal bovine serum (FBS) (Empty), 10% FBS (FBS), unloaded bovine serum albumin (BSA) or BSA loaded with palmitate (4.1 ratio) (palmitate)). (C) Similar experiment in the presence of 10% FBS with the indicated dyes. Acquisition settings were adjusted to obtain a similar maximum signal between all tested dyes. The curve was fitted to a hyperbolic function and used to determine the half-maximum of dye incorporation. (D) As in C but the experiment was performed in a medium containing BSA loaded with palmitate (4.1 ratio) instead of 10% FBS.

By establishing the stronger ability of Dioll to enter the cell (Figure 3B, 3C), its capacity to report fluidity modification resulting from alternative lipid compositions (Figure 2A, 2B) and the overall increase of signal intensity detected in live cell (Figure 3A), we obtained initial indications that it may outperform other available tools for specifically staining cell membranes *in situ* and precisely highlight their level of fluidity. In order to confirm this, HMECs were thus stained alternatively with Dioll and other Laurdan derivatives at different concentrations. The signal obtained with Dioll was, as expected, stronger than with other dyes (Figure 4A). Dioll revealed structural details such as tubules, vesicles, nuclear and endoplasmic membrane continuity, and nuclear membranes, with an unprecedented level of resolution (Figure 4B). Spectral imaging (see Methods) demonstrated an obvious difference in fluidity of membranous systems of the stained cells. The membrane surrounding the cells displayed a reduced level of fluidity (Figure 4B), as expected from the known composition of plasma membranes enriched in sphingolipid and cholesterol. Focusing on this membrane, we observed with great

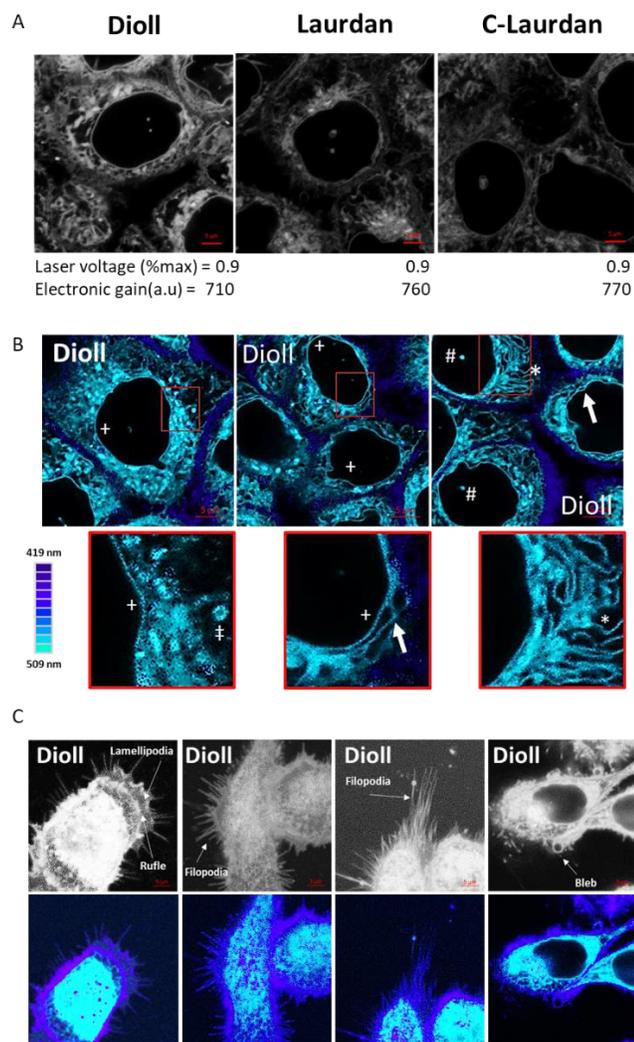


Figure 4. Enhanced detection of membranes by Dioll. (A) Confocal fluorescence images of HMECs stained with the indicated dye ($4 \mu\text{M}$) for 24 h. Laser voltage and electronic gain used for these acquisitions are specified. (B) Confocal fluorescence images of HMECs stained with Dioll ($4 \mu\text{M}$) for 24 h. Spectral encoding of images was performed and converted into a purple-green scale as indicated. Several structures are highlighted: (*) tubules, (‡) intracellular vesicles, (♯) nuclear membrane invagination, (+) nuclear membrane, (#) nuclear membrane invagination. (C) Top: Identical experiments showing structural details of plasma membranes observed through Dioll staining and gray scale encoding. Bottom: the same images were modified using spectral encoding and show the high level of rigidity of the previously highlighted structures.

detail specific structures usually associated with plasma membranes, such as lamellipodia extensions, ruffles and blebs (Figure 4B and 4C).

Regarding improvements obtained with Dioll in comparison with other solvatochromic dyes, we performed a last series of experiments in live cells to determine if the ability to measure membrane fluidity was also improved by this dye independently of its stronger brightness and heightened capacity to stain live cells. Since Dioll conserves a

stronger fluorescence intensity after the shift in its emission wavelength, we expected to obtain a better mapping of membrane fluidity, in particular its heterogeneity within cells. Hence, we adapted acquisition settings to measure the GP parameter according to each dye. Laurdan and C-Laurdan required greater laser intensity for their proper excitation and higher electronic gain for signal detection. When we measured with spectral encoding the difference in fluidity between the well-defined plasma membrane and nuclear membrane representing two extreme cases for this parameter, we confirmed that the range of GP obtained was broader with Dioll than with Laurdan and C-Laurdan (Figure 5A).

We then demonstrated that increasing Dioll concentrations improved the number of membranes detected (Figure 5B), in stark contrast to other dyes unable to reveal the full spectrum of membranous systems. This effect was more pronounced for fluid endomembranes than plasma membranes which were efficiently stained with all the dyes, even at low doses (Figure 5B). Since endomembranes contain more disordered-lipid bilayers, this result confirmed the stronger ability of Dioll to be used in less hydrophobic environments and to measure more efficiently the fluidity of less rigid membranes.

Finally, since isolated membranes have a heterogeneous level of fluidity, we verified whether our dye could reflect this heterogeneity. Measuring differences of fluidity inside a same membrane required a strong sensitivity since the variation are faint, dynamic, and spatially restricted. We concentrated our analysis on plasma membranes known to contain microdomains considered to be a signaling platform for cell interactions with the microenvironment. In order to detect faint variations of fluidity, we reencoded the imaging so as to calculate the GP values for each positive pixel of the stained area and used these values to focus on these more rigid domains. The quartiles of GP values were also calculated for each dye and used to encode the obtained signal, as mean GP was more elevated for Laurdan and C-Laurdan than for Dioll when dyes were used at their optimal concentration for membrane visualization (Figure S4). As a result, clear subdomains showing an apparent non-random GP distribution could be observed on the plasma membrane after Dioll staining (Figure 5C). We used Moran's index as a spatial autocorrelation score to determine how spatial distribution of these GP deviates from a random distribution (Figure 5C and Table S3) and confirmed that Dioll can provide finer measurement of variability in membrane fluidity ($MI=0.32$). GP values fluctuated more randomly across the image for Laurdan and C-Laurdan ($MI=0.12$ and 0.09 , respectively) (Figure 5C) suggesting that these dyes were less likely to quantify faint variations of fluidity in a robust manner. Overall, this result was consistent with the data showing that GP values measured with C-Laurdan beyond phase transition no longer evolved (Figure 1C), in contrast with results obtained with Dioll. In conclusion of this section, we validated Dioll superiority in comparison of other dyes for all key properties required for spectral imaging, opening the way for more detailed cellular studies.

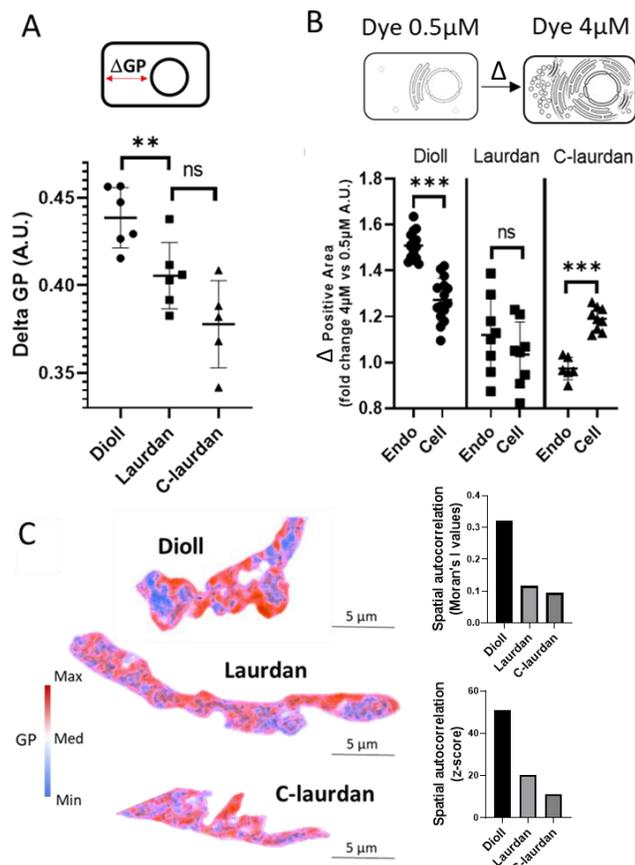


Figure 5. Enhanced measurement of membrane fluidity by Dioll. (A) GP differences between the plasma membrane and the nuclear membrane in HMECs stained with the indicated dyes (4 μ M). Data are mean of GP calculated at each pixel \pm SD. Student's t-test: ns = non-significant, $**=P < 0.01$. (B) Positive signal area was quantified from the same images and expressed as the ratio of the whole surface measured. Measurements were made for the whole cells or their internal section (endomembranes) as indicated. Data are mean fold change \pm SD between cells stained at 0.5 and 4 μ M. Student's t-test: ns = non-significant, $***=P < 0.001$. (C) Left: Confocal fluorescence images of HMECs stained with Dioll (top), Laurdan (Middle) or C-Laurdan (bottom) at 4 μ M and focusing on the plasma membrane (1 representative picture of 5 independent experiments). A spectral encoding through GP calculation and centered on the values present in the plasma membrane was conducted. Color code used and scale bars are indicated. Right: Spatial autocorrelation score (Moran's index) calculated from left images using a direct neighbors approach. Moran's I values report the observed spatial auto-correlation, while Z-scores quantify how it compares to random expectations from the sample (see Table S3 for full description).

Dioll can discriminate between organelles according to the fluidity of their membranes. Our findings suggested that the identity of organelles may be reflected by their different levels of membrane fluidity according to their lipid composition. Along the secretory pathway, it is well known that the liquid-ordered state of membranes decreases due to the progressive enrichment in saturated

sphingolipids and cholesterol. To identify plasma membrane and organelle membranes, co-localization experiments with specific organelle markers were performed (Figure 6A). Dioll efficiently co-localized with markers of plasma membrane (DiI), endoplasmic reticulum (ER-tracker) and mitochondria (TMRE). Moreover, Dioll clearly labeled membrane structures surrounding the nucleus stained with Hoechst. GP values could thus be estimated from the relative fluorescence intensities at 440 and 490 nm for each type of membrane identified above (Figure 6B). As expected, high GP values (around +0.12) were obtained for plasma membrane structures, whereas ER membranes were relatively more fluid with GP values around -0.2. As indicated previously, this is in line with the

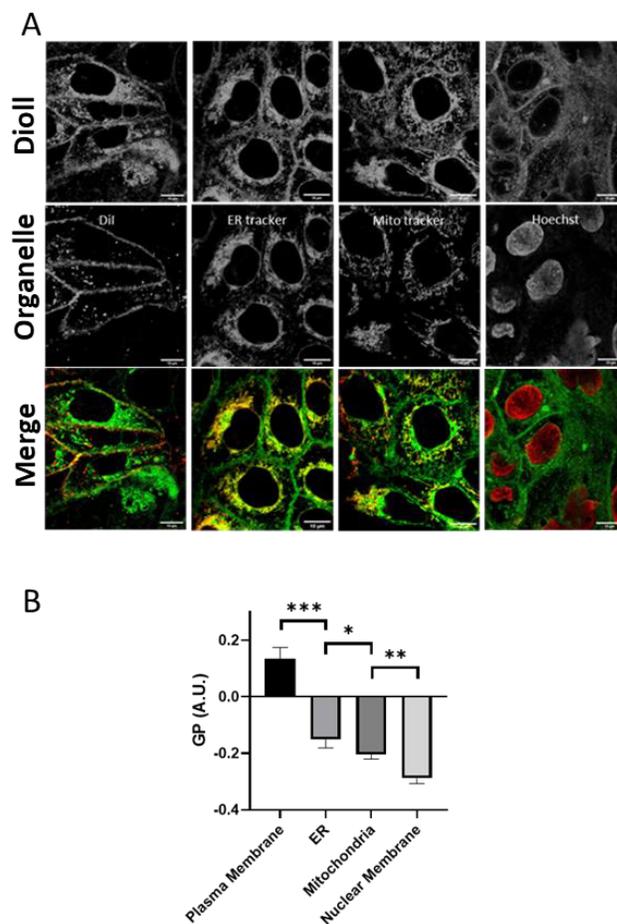


Figure 6. Membrane identity elucidated from the level of their fluidity. (A) Confocal fluorescence (z-section width = 85 μ m) images of HMECs stained with Dioll and the indicated structural tracker (DiI for plasma membrane, ER and Mito tracker for endoplasmic reticulum and mitochondria, respectively, Hoechst for the nucleus). Merged signals for co-localization is shown. (B) Pixels corresponding to merged signals for each indicated structure were extracted and GP was calculated from their spectrum.

membrane composition of ER tubules. ER displays extremely low concentrations of sterols and complex sphingolipids, despite being a main site of lipid and protein synthesis^{25,26}. Interestingly, mitochondria displayed the same

GP value as ER, which was not surprising as the amount of sterols and sphingolipids is also extremely low in this organelle. Finally, nuclear membranes displayed an even lower GP value (around -0.28) than ER. This was not completely expected since the nuclear membrane is believed to be a continuous extension of the ER. However, it is well known that transmembrane proteins strongly reduce membrane fluidity^{27,28}, with the ER concentrating this type of macromolecules, whereas nuclear membranes are largely devoid of them.

Dioll is a powerful sensor of pathophysiological modifications of membrane fluidity. Having demonstrated the ability of Dioll to detect the static distribution of fluidity heterogeneity within the membranous system of a mammalian cell, we then measured the ability of this dye to expose dynamic modifications of membrane fluidity. We first verified that Dioll was not cytotoxic (Figure S5) and did not disturb membrane fluidity (Figure S6) when cells were continuously incubated with this dye over several days. Interestingly, we noted that GP could be measured without any significant variation during the experimental time-course in cells treated with 0.5-2 μ M Dioll even after 4 days of continuous growth (Figure S5). Conversely, signal intensity was too low after 2 days to obtain reliable GP quantification with Laurdan and C-Laurdan at all tested concentrations (Figure S6); hence highlighting an additional advantage of using Dioll over Laurdan derivatives, especially in the context of prolonged experiments. Based on these parameters, we then evaluated the consequences of a nutritive fatty acid imbalance as a first pathophysiological insult susceptible of disturbing membrane fluidity. We treated HMECs for 24 h with excessive palmitate, a common saturated fatty acid associated with high fat diet and metabolic syndromes (Figures 7A and 7B). At the chosen dose (500 μ M), an expected ER stress response and cell cycle arrest were clearly induced but no significant cell death was observed (Figures S7), highlighting the relevance of this perturbation for assessing a typical stress associated with human pathologies. Confocal microscopy and whole cell analysis demonstrated a decrease in membrane fluidity in all membranes measured (Figures 7A and 7B). Endomembranes, in particular, were affected and thin bands of highly rigid membrane could be observed crossing the cell. This effect was not an artefact due to the use of palmitate, since an equivalent result was obtained by incubating cells with arachidate (Figure 7B). We then treated the same cells with horse serum containing linoleic (C18:2 w6) and linolenic (C18:3 w9) acid in larger amounts than a medium containing control FBS^{29,30}. We first performed cell lipid analysis and confirmed an increase in polyunsaturated fatty acids (PUFA) after cell incubation in horse serum compared to those maintained in FBS (Figure S8). Importantly, this effect was observed with the whole pool of free and hydrolyzed fatty acids, and with those more specifically attached to the two main pools of phospholipids, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. In addition, strong responses of SREBP₁ and ₂ (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1/2) were induced (Figure S7). The former response may be correlated with larger

pools of PUFA^{31,32}, whereas SREBP₂ activation is usually linked to the lack of cholesterol. Of note, polyunsaturated acids reduce lipid packing which can consequently increase membrane fluidity, an effect also enhanced by the lack of cholesterol. Accordingly, cell analysis with Dioll in this condition revealed a decrease in GP values indicative of an elevation of membrane fluidity in all tested membranes (Figures 7A and 7B). Since Dioll was always incubated

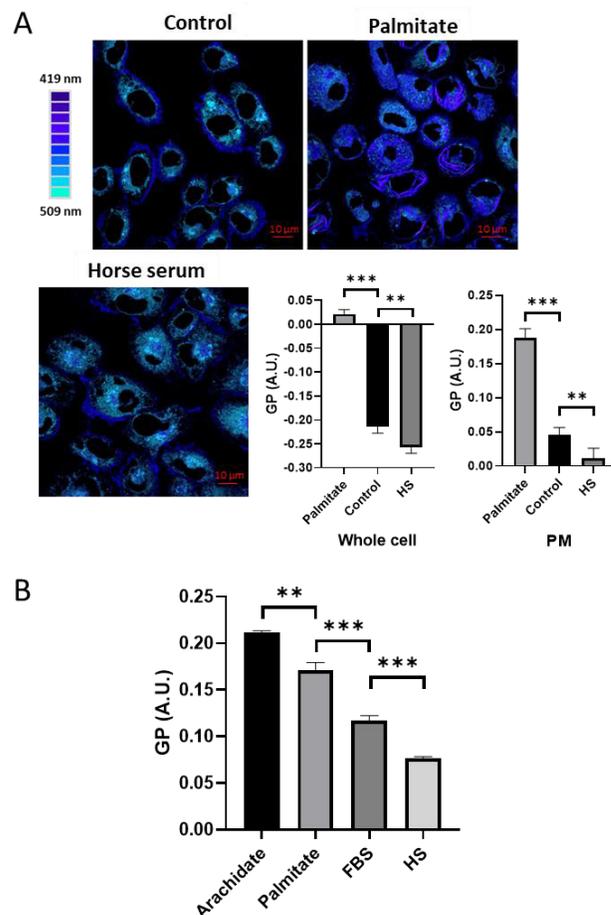


Figure 7. Dioll measures dynamic changes in membrane fluidity following a metabolic insult. (A) Top and bottom left: confocal fluorescence images of HMECs stained with Dioll for 48 h. Normal medium containing FBS was exchanged during the experimental time-course after 24 h by a medium either enriched in palmitate (500 μ M) or supplemented with 10% horse serum. Bottom middle and right: GPs for the indicated membranes were calculated from these images. (B) GP quantification at the whole cell level performed through a direct spectrofluorescence measurement after an overnight pre-incubation in normal medium, in a medium in which horse serum replaced FBS or conditions enriched in palmitic (500 μ M) or arachidic acid (350 μ M). Data are mean \pm s.d.; $n > 3$ independent experiments. Student's t-test, ns=non-significant *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$.

ted with cells 24 h before the onset of metabolic manipulations, these results unveiled the capacity of Dioll to detect dynamic changes in membrane fluidity in response to pathophysiological nutritive insults.

Finally, we subjected to an additional stress known to affect membrane fluidity during epithelial cell proliferation, namely cell packing. The consequence of cell density on the fluidity of their membrane is controversial. A recent publication demonstrated an overall increase in membrane fluidity following cell crowding by using Laurdan³³. However, individual membranes were not analyzed in this study and no image of cells were reported. Inversely, the analysis of giant plasma membrane vesicles (GPMV) used as a surrogate of microviscosity associated with plasma membranes revealed a specific increase in their rigidity in densely packed cells^{34,35}. Therefore, plasma membrane and

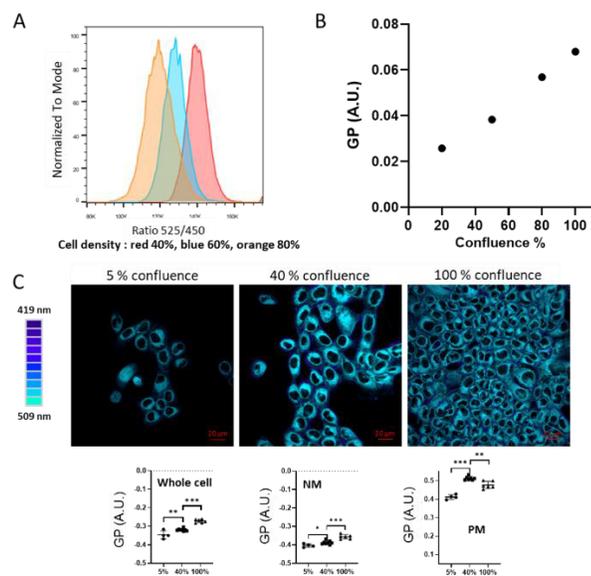


Figure 8. DiIol highlights the consequences of cell crowding on membrane fluidity. (A) HMECs at the indicated density were incubated with DiIol for 24 h before being isolated and analyzed by flow cytometry. Graph shows the emission ratio fluorescence recorded with filters at 545 nm and 450 nm. (B) Fluorescence spectra obtained from an identical experiment were registered from a whole population and used to calculate the GP as a function of cell confluence (One representative of $n=3$ independent experiments). (C) Top: confocal fluorescence images of HMECs stained with DiIol and grown at indicated density. Bottom: GP quantification at the whole cell or the single membrane level as indicated (NM=nuclear membrane, PM=plasma membrane), performed through the analysis of previous images. Data represent mean \pm s.d.; at least four experiments were conducted in (c). Student's t-test, ns=non-significant * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

endomembranes could react differently in the event of mechanical changes associated with cell crowding. However, using whole-cell measurements performed with DiIol, we did could confirm an overall increase in membrane fluidity when cells had more contacts and even observed the opposite effect (Figures 8A and 8B). Importantly, these data were obtained after cell dissociation and detachment, indicating that the changes in membrane fluidity were the consequence of an intrinsic biochemical parameter and not due to mechanical cues. We confirmed these first re-

sults by analyzing membrane fluidity with confocal microscopy using cells displaying a progressive increase in their contacts (Figure 8C). Interestingly, as observed with GPMV study, the fluidity of plasma membranes declined rapidly when cells were engaged in intercellular contacts (Figure 8C), yet it no longer changed when cell density increased. However, ER-related membranes were also more rigid with increasing cell-cell contacts, but this effect was apparently more sensitive to overall cell crowding than cell-cell interactions (Figure 8C). Hence, opposite measurements reported with Laurdan were likely not due to an opposite behavior of endomembranes and plasma membranes. In the study by Frechin et al, overall modifications in fluidity overlapped changes in lipid droplet quantity, their number being reduced in highly confluent cells³³. We thus considered this change as the possible reason for the discrepancies between Laurdan and DiIol analyses. Due to

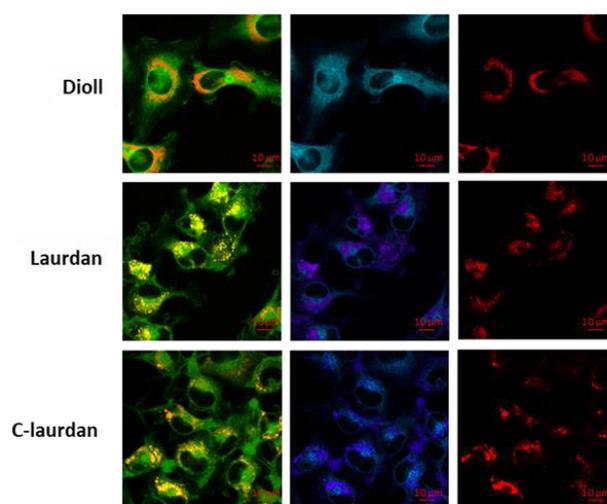


Figure 9. DiIol signal is not disturbed by lipid droplets. HMECs were incubated with the indicated dyes ($4\mu\text{M}$) and placed 48 h in a medium fostering lipid droplet formation (high glucose, oleate ($500\mu\text{M}$), palmitate ($100\mu\text{M}$), rosiglitazone ($2\mu\text{M}$)). Confocal images were then taken after a 20 min incubation with Nile red to stain neutral lipids. Each signal (DiIol or Nile red) and the merged signal are shown.

its very low polarity, Laurdan should be able to be inserted into these lipid droplets, inducing a fluorescent emission similar to a particularly rigid membrane, due to water exclusion. Hence, overall analysis of membrane fluidity using Laurdan could be disturbed by the signals emanating from these structures. Inversely, DiIol being slightly less hydrophobic may not stain these non-membranous lipid structures. We verified these hypotheses and confirmed the presence of Laurdan in lipid droplets by using Nile red (Figure 9), whereas DiIol was completely absent from these structures. Therefore, these results validate the model obtained from GPMV, demonstrating that membrane fluidity decreases when cells start to be densely packed. Moreover, we also investigated whether C-Laurdan could reach lipid droplets, as this dye is more hydrophobic than Laurdan

1 due to the presence of the carboxylic acid. Surprisingly,
2 when used at optimal concentrations for membrane visu-
3 alization, C-Laurdan was similarly present in these struc-
4 tures, strongly decreasing the interest of this dye for quan-
5 tifying membrane fluidity at the whole cell level.

6 CONCLUSION

7 The control of fluidity has been recognized as a key feature
8 of biological membranes providing them with a role ex-
9 tending far beyond that of cell/organelle compartmentali-
10 zation. Typically, functions associated with the different
11 types of membranes existing in a cell are largely influenced
12 by differences in their fluidity. Endoplasmic membranes
13 are for instance characterized by a higher fluidity, a condi-
14 tion necessary for the very high level of protein insertion
15 and mobility required for protein synthesis in the ER lu-
16 men³⁶. Conversely, plasma membranes are more rigid, fa-
17 voring the appearance of membrane domains used as sta-
18 ble platforms for signal transduction, endocytosis and
19 communication with surrounding cells⁸.

20
21 The dye developed in the present study, Dioll, has a very
22 intense fluorescent signal when inserted in the membranes
23 of live-cells and is able to easily differentiate them on the
24 basis of their fluidity. Entry of the dye was also ameliorated
25 in comparison with other analogs and Dioll was able to
26 reach every type of membranes. Furthermore, no interfer-
27 ence from non-membranous lipids was observed, such as
28 that arising with Laurdan and C-Laurdan. The affinity of
29 Dioll for fluid domains as well as its ability to conserve a
30 strong fluorescent signal in disordered lipids, were also en-
31 hanced compared to other Laurdan analogs, both charac-
32 teristics being essential for the proper staining of endo-
33 membranes and an overall reflection of their greater fluid-
34 ity. Moreover, we demonstrated the ability of Dioll to high-
35 light local differences within an individual membrane, an
36 ability likely due to the conservation of its brightness in a
37 fluid membrane area and its stronger sensitivity to modifi-
38 cations in its environment. Importantly, we noticed the ab-
39 sence of cell toxicity during the incubation with Dioll and
40 the stability of the measurement during experiments carry
41 over several days. Therefore, this dye is highly relevant to
42 finely measure alterations in membrane fluidity that can
43 spatially and kinetically disrupt the normal control of
44 membrane physiology.

45 Of note, we demonstrated the relevance of these improve-
46 ments through detailed cellular studies after critical stim-
47 uli for the control of cell biology such as mechano-trans-
48 duction or nutritive stimulation. In both case, we were able
49 to report dynamic change in membrane fluidity and to
50 identify the set of membranes sensitive to these modifica-
51 tions. The specificity of our dye for lipid bilayers helps us
52 to observe the respective contribution of cell junction and
53 cell crowding on the distribution of modifications in mem-
54 brane fluidity. Our results nicely confirmed indirect exper-
55 iments performed with GPMV suggesting that plasma
56 membrane fluidity decreases with higher cell density, and
57 extend these results by showing that cell junctions seem

more important for this effect than mechanical con-
striction. Conversely, the fluidity of endomembranes
seems more sensitive to mechanical forces since it starts to
decrease significantly when crowding restricts cell spread-
ing. Mechanical transduction is known to modify the in-
ternal cytoskeleton and the positioning of several orga-
nelles, especially the nucleus³⁷. However, it was rather un-
expected that external forces could generate a biochemical
signal susceptible to increase the local rigidity of mem-
branes surrounding these organelles. The purpose of these
regulations is not trivial and clearly deserves further inves-
tigation that will be possible with our tool developed in this
study.

Regarding the nutritive stimulations, we were able to cor-
relate modifications in fluidity with the membrane's lipid
composition in live cells. Beyond effectively validating the
link between a lipid disordered environment in a live cell
and a change in emission wavelength of our inserted dye,
this result demonstrated the ability of Dioll to respond dy-
namically to a defined biochemical signal. Indeed, Dioll
was inserted in cell membranes before changing the nutri-
tive conditions, and was still able to report a change in flu-
idity taking place dynamically several hours later. There-
fore, this type of measurement opens the way to a compre-
hensive and robust analysis of pathological mechanisms
connected to changes in membrane fluidity in response to
abnormal regulation of nutritive environment such as dia-
betes or obesity^{38,39}. Dioll should constitute in these con-
texts a fundamental tool and assist future investigations in
these directions.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and reagents. Lauroylchloride and nitrobenzene
were purchased from Acros. 2-bromonaphthalene, aluminium
chloride, *N*-methylallylamine, 2-dicyclohex-
ylphosphinoz'4'6'triisopropylbiphenyl (X-Phos), palladium
acetate (Pd(OAc)₂), *N*-methylmorpholine oxide monohy-
drate, catalytic OsO₄ 2.5% solution in tert-butanol and anhy-
drous dioxane were purchased from Sigma-Aldrich. PBS and
roziglitason were also purchased from Sigma-Aldrich. Potas-
sium tert-butanolate was purchased from Lancaster. Nitro-
benzene and anhydrous dioxane were used without further
purification. Flash chromatographies were performed on silica
gels purchased from Acros Organics. Laurdan was purchased
from GE healthsciences and C-Laurdan was synthesized ac-
cording to the previously described procedure (Cheniour et
al., 2016). Lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Al-
baster, Al). Ultrapure water was obtained with a PureLabOp-
tion Q7 system (Veolia Water STI, Decines, France).

Chemical Synthesis. Reactions were carried out in dried
glassware and under argon atmosphere. All reactions were
magnetically stirred and monitored by thin-layer chromatog-
raphy (TLC) on silica gel 60 F254 (Merck) plates using UV light
to visualize the compounds. Yields refer to chromatographi-
cally and spectroscopically pure compounds unless otherwise
noted. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 23°C using
Bruker Avance DRX300, DRX400 or DRX500. Chemical shifts
are reported according to the residue peaks of the solvent

(CDCl₃: 7.26 ppm for ¹H and 77.16 ppm for ¹³C). The following abbreviations are used to denote the multiplicities: s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets, t = triplet, m = multiplet and br s = broad singlet. NMR solvents were purchased from Euriso-Top (Saint Aubin, France). Low resolution mass spectra (ESI) and HRMS were recorded in positive ion mode using a Thermo Finnigan LCQ spectrometer.

Synthesis of 1-(6-bromonaphthalen-2-yl) dodecan-1-one (1)

2-bromonaphthalene (4 g, 19.3 mmol) was dissolved in 20 mL of nitrobenzene under an Argon atmosphere. The solution was stirred in an ice bath. Aluminium chloride (2.836 g, 21.61 mmol, 1.1 equiv.) was added by portions and lauroylchloride (5.512 mL, 23.18 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for at least 18h. The reaction mixture was quenched with distilled water at 0°C and extracted three times with ethyl acetate. The organic phases were combined, washed with brine, dried over sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The product was purified by crystallization from cold ethanol to obtain a yellowish powder; yield 4.215 g (56%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, 3H, J=6.6 Hz, CH₃); 1.26-1.37 (m, 16H, CH₂); 1.79 (m, 2H, CH₂); 3.07 (t, 2H, J=7.5 Hz, CH₂CO); 7.62 (d, 1H, J=8.7 Hz, H ar); 7.81 (m, 2H, H ar); 8.05 (m, 2H, H ar); 8.42 (s, 1H, H ar).

¹³C NMR: δ = 14.1; 22.7; 24.5; 29.4; 29.5; 29.6; 29.7; 31.9; 38.8; 122.7; 125.2; 127.5; 129.4; 129.9; 130.2; 131.0; 134.8; 136.4; 200.2.

HRMS: m/z (MH⁺) calculated for C₂₂H₃₀BrO: 389.1475, measured: 389.1471.

Synthesis of 1-(6-(allyl(methyl)amino)naphthalen-2-yl)dodecan-1-one (2) (NMAAL)

An oven-dried Schlenk flask was evacuated and backfilled with argon. The flask was charged with 1-(6-bromonaphthalen-2-yl) dodecan-1-one (200 mg, 0.514 mmol); (Pd(OAc)₂) (9 mg, 41.1 μmol, 0.08 equiv.); X-Phos (39 mg, 82.2 μmol, 0.16 equiv.) and cesium carbonate (503 mg, 1.54 mmol, 3 equiv.). The Schlenk flask was capped with a rubber septum, and then evacuated and backfilled with argon three times. *N*-methylallylamine (128 μL, 1.34 mmol, 2.6 equiv.) and anhydrous dioxane (1.5 mL) were added through the septum. The mixture was heated to 120°C in an oil bath and stirred for 16 h. The mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate, filtered through Celite and concentrated under reduced pressure to obtain a brown solid product. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with ethyl acetate/petroleum ether = 3/97. A yellow powder (168 mg, yield 87%) was obtained.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, 3H, J=5.1 Hz, CH₃); 1.25-1.37 (m, 16H, CH₂); 1.77 (m, 2H, CH₂); 3.03 (t, 2H, J=7.7 Hz, CH₂CO); 3.10 (s, 3H, NCH₃); 4.07 (d, 2H, J=3.6 Hz, CH₂N); 5.17-5.22 (m, 2H, CH₂=CH); 5.89 (m, 1H, CH=CH₂); 6.96 (br s, 1H, H ar); 7.16 (dd, 1H, J= 6.6 Hz, J=1.2 Hz, H ar); 7.64 (d, 1H, J=6.6 Hz, H ar); 7.80 (d, 1H, J=6.9 Hz, H ar); 7.93 (dd, 1H, J= 6.3 Hz, J=1.2 Hz, H ar); 8.32 (s, 1H, H ar).

¹³C NMR: δ = 14.1; 22.7; 24.9; 29.3; 29.5; 29.6; 29.7; 31.9; 38.3; 38.4; 55.1; 116.2; 124.7; 126.1; 129.7; 130.7; 133.0; 137.6; 200.2.

HRMS: m/z (MH⁺) calculated for C₂₆H₃₈NO: 380.2948, measured: 380.2938.

Synthesis of 1-(6-((2,3-dihydroxypropyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)dodecan-1-one (3) (DIOLL)

The NMAAL product (164 mg, 0.43 mmol) was placed in a 25 mL flask. 5 mL of acetone, 5 mL of water, 5 mL of THF, 66 mg of *N*-methylmorpholine oxide monohydrate (1.3 equiv), and 1.5 mL of a 2.5% solution of OsO₄ in tert-butanol (catalytic) were added and the reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was then quenched with Na₂S₂O₃ solution, extracted with ethyl acetate (2x30 mL). The organic phases were combined, washed with water (30 mL) and then brine (30 mL), dried over sodium sulphate and concentrated under reduced pressure to obtain a crude product. Methanol was then added and the mixture was filtered over Celite, concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel. Elution was carried out with ethyl acetate to obtain a dark green solid (65 mg, yield 36 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, 3H, J=7.0 Hz, CH₃); 1.25-1.41 (m, 16H, CH₂); 1.77 (m, 2H, CH₂); 3.03 (t, 2H, J=7.5 Hz, CH₂CO); 3.14 (s, 3H, CH₃N); 3.51 (dd, 1H, J=15 Hz, J=5.5 Hz); 3.61 (m, 2H); 3.82 (dd, 1H, J=11.5 Hz, J=3.5 Hz); 4.11 (m, 1H, CHOH); 6.95 (br s, 1H, H ar); 7.22 (dd, 1H, J= 9.5 Hz, J=2.5 Hz, H ar); 7.63 (d, 1H, J=8.5 Hz, H ar); 7.80 (d, 1H, J=9 Hz, H ar); 7.93 (dd, 1H, J= 8.5 Hz, J=1.5 Hz, H ar); 8.32 (s, 1H, H ar).

¹³C NMR: δ = 14.1; 22.7; 24.8; 29.4; 29.5; 29.6; 29.7; 31.9; 38.4; 39.5; 55.3; 64.2; 69.8; 105.9; 116.5; 124.8; 125.5; 126.3; 129.7; 130.9; 131.1; 137.5; 149.5; 200.3.

HRMS: m/z (MH⁺) calculated for C₂₆H₄₀NO₃: 414.3003, measured: 414.2995.

Spectroscopic measurements. Probe fluorescence in organic solvents. Fluorescence measurements were performed with a Hitachi F4500 fluorometer. Excitation and emission slits were set at 5 nm and spectra were recorded at 25°C using a 1 cm path length thermostated quartz micro-cuvette. 0.26 mM solutions of the probes were prepared in a dichloromethane:methanol mixture (3:1 volume ratio). Measurements were performed with 2.6 mM probes diluted in the different solvents. The initial solvent of the stock solution thus represented 1% of the final volume.

Probe fluorescence in liposomes. Liposomes were prepared in PBS buffer using a classical freeze/thawing protocol. Briefly, lipids dissolved in chloroform were dried under vacuum. The lipid film formed was rehydrated with the PBS and agitated until complete suspension of the lipid film. The vesicle solution was then submitted to 6 freeze/thawing (5 min in liquid nitrogen/ 10 min in 37°C water bath) cycles and then sequentially extruded 19 times through 400 nm and 200 nm polycarbonate membranes (Avanti Polar Lipids Liposome Extruder). The 200 nm liposome suspension was stored at 4°C.

Fluorescence data were obtained using a Hitachi F4500 fluorometer. Emission spectra were recorded between 420 and 600 nm with an excitation wavelength fixed at 385 nm and 5 nm excitation and emission slits. Ethanol solutions of fluorescent probes were prepared and added to liposomes at a 1:400 (probe: phospholipid) molar ratio. Liposomes were used at a 40 μg mL⁻¹ final concentration. Measurements were done at 21°C for all liposome compositions indicated in Table S2, except for DMPC for which a range of temperatures from 5°C to 65°C was also applied.

Cell culture and dye incubation. Human mammary epithelial cells (HMECs) and HL-60 cells were provided by Lonza and the ATCC, respectively. All cells were grown at 37°C and 5% CO₂. HMECs were maintained in 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/HAMF12 medium (Gibco) complemented with 10% FBS (Gibco), 91 U.mL⁻¹ penicillin-streptomycin (P/S) (Gibco), 10 ng.mL⁻¹ human epidermal growth factor (EGF) (Promocell), 262 mU.mL⁻¹ insulin (NovoRapid) and 0,5 µg.mL⁻¹ hydrocortisone (Sigma). HL-60 were grown in RPMI1640 supplemented with 10% FBS and 91 U.mL⁻¹ penicillin-streptomycin (P/S) (Gibco).

For staining, cells were usually directly pre-incubated with dye of the Laurdan series (0.1-10µM final concentration) for 24 h. When the lipid environment was modified, extra-fatty acids (arachidate or palmitate (Merck)) or new serum (Horse serum (Gibco) instead of FBS) were added 24 h before staining, and cells were further incubated for 24 h.

For accumulation of lipid droplets, cells were incubated during 48 h in highly concentrated glucose (20mM), oleate (500 µM), palmitate (100 µM), and the PPAR γ agonist rosiglitazone (2µM).

Dye loading kinetic. HMECs were plated in CellCarrier-96 Black plates (PerkinElmer). When cells were completely confluent, they were cleaned twice with PBS and 195 µL of experimental medium was added (DMEM containing either 2 µM of DiIol, Laurdan or C-Laurdan and no phenol red). In these experimental media, FBS was removed or replaced by 500 µM of palmitate complexed with BSA (1:4 BSA:Palmitate), or an equivalent amount of BSA. A control condition with a standard concentration of FBS was also analyzed. Fluorescence was read directly from 410 to 610 nm via the fluorescence kinetics bottom mode on the microplate reader ClarioStar® (BMGLabtech) for 12h at 37°C and 5% CO₂. Curve analysis was fitted through an exponential law ($1 - e^{-\lambda x}$ with λ corresponding to the rate parameter of the exponential) using GraphPad Prims 8.

Fluorescence acquisition from cells or liposomes prepared in suspension. Cells were stained as described above. At the end of the incubation time, cells were harvested and dissociated with trypsin, and the protease was then removed. For liposome analyses, incubation was performed either ex-temporaneously after their preparation or directly during their *in vitro* synthesis. In each case, 1 nmol of dye per 50 µg of lipids was added to the vesicles. Dye was incubated overnight before acquisition when it was added on pre-formed liposomes.

Cytometric analysis: Cells were resuspended in PBS containing 10% FBS. Acquisition was performed with a BD LSRFortessa™ Flow Cytometer, violet laser, with 10,000 events recorded. Bandpass filter at 450 nm and 510 nm were used to quantify the fluorescence emission ratio. The final data were analyzed using the Flow Jo 7.5.5 software.

Acquisition with a microplate reader: After cell dissociation, cell populations were resuspended in their medium and seeded onto 96-well black plates (10,000 cells per well). Their fluorescence spectrum was immediately recorded with a microplate reader ClarioStar® (BMGLabtech) and a monochromator in spectral scan mode (ex=380-400nm/em=400-600nm).

Purified liposomes were resuspended in PBS (100µg/ml) and analyzed with a spectrofluorometer (Jasco FP-8500™, ex=390nm/em=400-600nm).

Confocal microscopy. Cells were grown in 8-well Lab-TEK® µslides and stained with dye (0.5 or 4 µM) similarly to previous analyses. All samples were imaged using a confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 880 AxioObserver inverted spectral confocal microscope, environmental control: temperature, CO₂ and hygrometry) with two different objectives Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 or 100x/1.46 Oil DIC M27. Laser power and electronic gain used for experiments are specified in the figure captions when signal intensities were compared. Laurdan and its derivatives were excited with a 405 nm diode laser and, for classic acquisition, emission was recorded with a filter band 424-513 nm. For spectral mode acquisition, emission spectrum was divided into 8/9 nm bands from 424 to 513 nm and color-coded in violet-green scale.

Specific organelle markers (plasma membrane (DiI), endoplasmic reticulum (ER tracker), mitochondria (Mito tracker red), lipid droplets (Nile red) were added 20 minutes before observation. Parameters for signal acquisition followed the manufacturer's recommendations. Nuclear staining (Hoechst) was injected automatically into the chamber after DiIol fluorescence acquisition and recorded after 5 min with an excitation of 405 nm using a diode laser.

GP parameter analysis from microscopy. A composite image was created from the spectral slices obtained with DiIol, Laurdan or C-Laurdan. Whole cell analysis was performed automatically after background correction and selection of positive signals. Specific areas studied were either manually defined in the absence of co-marker or automatically retained through pixel selection using the specific subcellular markers (DiI, ER-tracker, Mito tracker). Background correction was also performed in these cases. Emission intensity values of each selected pixel in the 440 and 490 nm channels were recovered and used to calculate a GP of each position with the same formula as for spectroscopy experiment: $GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$

A median for the calculated GP values was then estimated for each field and at least 5 independent fields (each of them containing at least 10 cells) were measured for each experiment.

For subdomain analysis of the plasma membranes, positive pixels were selected and their GP calculated similarly. GP distribution was then performed to define 4 quartiles then used for image encoding (deep blue, blue, red, deep red). Subdomains were accentuated by using an "Accented Edges filter" adding white chalk dash (1 pixel width) around each homogeneous area (Adobe design Premium).

Spatial Autocorrelation Score (Moran's index). We used the ape R package⁴⁰ to calculate Moran's I, a spatial autocorrelation statistic. Only points with a defined value in the 2D space were included in the calculation. We used both Euclidian distances between points, and a bin-based approach to select only the direct neighbors of each point via a maximum distance cut-off of $\sqrt{2}$ to consider two points as neighbors. As all datasets demonstrated highly significant autocorrelation, a Z-score was calculated to quantify how superior the observed autocorrelation statistic was to expectations in each dataset.

mRNA expression quantification and multivariate analysis. 1 µg of extracted mRNA obtained from 1 million cells (Qiagen RNeasy Kits) was reverse transcribed (SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit). Real-time PCR intron-spanning assays were performed with the SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad). Primers used are available on request. The relative quantification of gene expression

was performed using the comparative CT method, with normalization of the target gene against the endogenous house-keeping gene 36B4 (RPLP0 - ribosomal protein, large, P0). Primer sequences are available on request. For multivariate analysis of gene expression, the CT method was adapted as follows. Gene expression corresponding to 24 CT was set at 1. With this reference, the obtained fold change from the CT methods were used to scale other mRNA expressions. All values obtained for one specific gene were then divided by the mean expression of this gene in all the tested conditions. Finally, these values were log₂-transformed for the principal component analysis. This strategy center the analysis on the difference in gene expression and defines gene expression against the whole set of samples instead of arbitrarily using only one sample as a reference. PCA analysis was then performed using the R-software ((v3.2.2), package ade4). Results are represented as a scatterplot (PC₁ vs. PC₂), and corresponding eigenvectors for each condition are drawn as arrows. Gene coordinates are also used to add their position on the plot.

Cell death and proliferation analysis. For cell death analysis, cells were harvested with trypsin and then incubated with 1.5 μM of 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 20 min in their own medium. Since only dying cells incorporate the dye, cell death was counted by gating positive fluorescent cells by flow cytometry (FORTESSA, BD). The final data were analyzed using the Flow Jo 7.5.5 software.

For proliferation analysis, cells were harvested at the end of the experiment and lysed in a RIPA buffer containing 0.5% of Sodium Dodecyl Sulfate. The extract was boiled for 10 min and the amount of DNA present in the extract was quantified with the QuantiFluor® dsDNA System (Promega).

Lipidomics analysis. Lipids were extracted from cell pellets using the Folch method (FOLCH et al., 1951). For analysis of a particular class of lipids, lipids were separated by thin-layer chromatography on silicagel plates (Merck 5721, Germany), using petroleum of ether-ethylc and ether-acetic acids as developing solvents. The plates were sprayed with bromophenol blue and individual bands of phospholipids were scraped off. The phospholipid (PL) fraction or the whole set of lipids was saponified and transmethylated with sodium methylate. The methyl esters were extracted by hexane, and analyzed by gas-liquid chromatography, using a FOCUS, Trace/ULTRA GC gas chromatograph (Thermo Separation Products) equipped with a CP-SIL fused silica capillary column (25 m x 0.25 mm internal diameter) coated with 100% cyanopropyl siloxane. Identification of individual methyl ester components was performed by comparison of the retention times with those of standard values. The results were given based on the relative abundance of individual fatty acids (in %).

Statistical analysis and reproducibility. Student's t-tests with two tails and Bonferroni's correction were performed for sample comparisons. Statistical significance is indicated in the caption of the figure. GraphPad Prism software was used to generate graphs and perform statistical analyses, When not indicated in the legend of the figure, experiments shown are representative of n=3 independent biological replicates.

ASSOCIATED CONTENT

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Figures of synthesis schemes, kinetic of Laurdan and C-Laurdan incorporation in cell, recorded GP from pixel corresponding to plasma membrane, cytotoxic and membrane – disturbing effect of solvatochromic dye, physiological end genetic stress. Table describing lipid used for liposome preparation (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Arnaud M. Vigneron. 2 ; "EMT and Cancer Cell Plasticity" laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

3 ; Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Thierry Granjon. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Authors

Sébastien Ibanez. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

2 ; "EMT and Cancer Cell Plasticity" laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

3 ; Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Mouhedine Cheniour. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

David Gueyrard. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Milène Nitenberg. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Larissa Socrier. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Jihen Zouaoui. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

4 ; Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Unité Risques Liés au stress Environnemental, lutte et prévention UR17ES20. Faculté des sciences de Bizerte, Tunisie. 7021 Jarzouna, Bizerte.

Layth Ben Trad. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

4 ; Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Unité Risques Liés au stress Environnemental, lutte et prévention UR17ES20. Faculté des sciences de Bizerte, Tunisie. 7021 Jarzouna, Bizerte.

Julien Bompard. 5 ; Université de Lyon, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, équipe GEMBAS, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Thomas Guillot. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Samia Selmi-Ruby. 2 ; "EMT and Cancer Cell Plasticity" laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

3 ; Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Ahmed Landoulsi. 4 ; Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Unité Risques Liés au stress Environnemental, lutte et prévention UR17ES20. Faculté des sciences de Bizerte, Tunisie. 7021 Jarzouna, Bizerte.

Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu. 6 ; Laboratoire de Mécanique des Contacts et Structures, LaMCoS UMR 5259, CNRS, Univ Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.

Agnès Girard-Egrot. 5 ; Université de Lyon, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, équipe GEMBAS, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Christophe Vanbelle. 7 ; Plateforme d'Imagerie cellulaire, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL).

Léa Payen-Gay. 8 ; Biochemistry Laboratory of Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

Pierre Martinez. 2 ; "EMT and Cancer Cell Plasticity" laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

3 ; Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Alain Puisieux. 2 ; "EMT and Cancer Cell Plasticity" laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

3 ; Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Peter Goekjian. 1 ; Université de Lyon, Laboratoire Chimie Organique 2, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France.

Ofélia Maniti. 5 ; Université de Lyon, ICBMS UMR 5246 CNRS-UCBL-CPE, équipe GEMBAS, Bat. LEDERER, 1 rue Victor GRIGNARD, Université Lyon 1 - F-69622 Villeurbanne cedex – France

Olivier Marcillat. 3 ; Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Present Addresses

Alain Puisieux. CNRS UMR3666, Inserm U1143, Cellular and Chemical Biology, Institut Curie, PSL Research University, 75005 Paris, France.

Arnaud M. Vigneron. "Signalling, metabolism and tumor progression" laboratory, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Thomas Guillot. "Signalling, metabolism and tumor progression" laboratory, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France. Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

Pierre Martinez. "Integrated analysis of the dynamics of cancer" laboratory, Université de Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France.

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org>

Author Contributions

All authors have reviewed and approved the final version of this manuscript.

§ These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed: Arnaud M. Vigneron-Thierry Granjon.

Funding Sources

This work was supported by the Technology Transfer Accelerator Office Lyon-Saint-Etienne Pulsalys, a CNRS premature program, funding from ANR, Institut de Chimie de Lyon, French Ligue Nationale contre le Cancer, Institut PLAsCAN (Convergence Program of ANR). MN was supported by a Pulsalys fellowship

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Brigitte Manship for proofreading the manuscript and Thibault Andrieu for technical support and helpful discussions.

REFERENCES

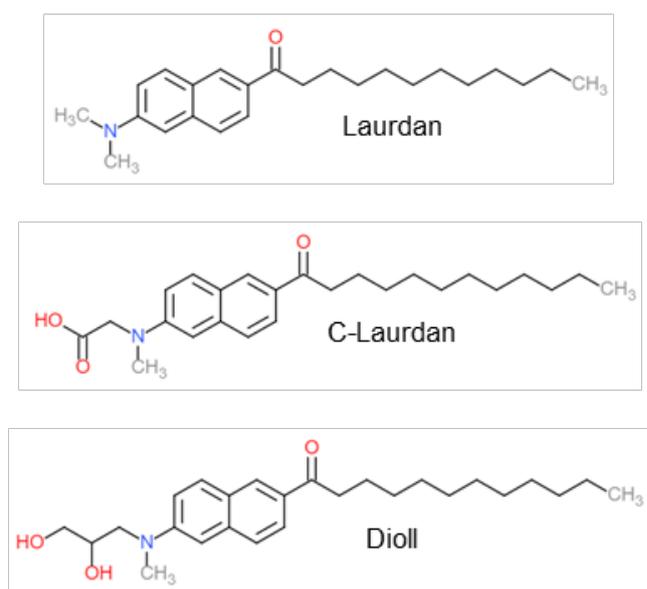
- (1) Arab, J. P.; Arrese, M.; Trauner, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2018**, *13*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>.
- (2) Ho, N.; Xu, C.; Thibault, G. From the Unfolded Protein Response to Metabolic Diseases - Lipids under the Spotlight. *Journal of cell science.* **2018**. <https://doi.org/10.1242/jcs.199307>.
- (3) Hou, N. S.; Gutschmidt, A.; Choi, D. Y.; Pather, K.; Shi, X.; Watts, J. L.; Hoppe, T.; Taubert, S. Activation of the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response by Lipid Disequilibrium without Disturbed Proteostasis in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (22). <https://doi.org/10.1073/pnas.1318262111>.
- (4) Krausser, J.; Knowles, T. P. J.; Šarić, A. E. Physical Mechanisms of Amyloid Nucleation on Fluid Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *117* (52). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2007694117>.
- (5) Barucha-Kraszewska, J.; Kraszewski, S.; Jurkiewicz, P.; Ramseyer, C.; Hof, M. Numerical Studies of the Membrane Fluorescent Dyes Dynamics in Ground and Excited States. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.05.020>.
- (6) Jurkiewicz, P.; Olzyńska, A.; Langner, M.; Hof, M. Headgroup Hydration and Mobility of DOTAP/DOPC Bilayers: A Fluorescence Solvent Relaxation Study. *Langmuir* **2006**. <https://doi.org/10.1021/la061597k>.
- (7) Parasassi, T.; De Stasio, G.; Ravagnan, G.; Rusch, R. M.; Gratton, E. Quantitation of Lipid Phases in Phospholipid Vesicles by the Generalized Polarization of Laurdan Fluorescence. *Biophys. J.* **1991**. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82041-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0).
- (8) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **2017**. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- (9) Sezgin, E.; Waithe, D.; Bernardino De La Serna, J.; Eggeling, C. Spectral Imaging to Measure Heterogeneity in Membrane Lipid Packing. *ChemPhysChem* **2015**, *16* (7), 1387-1394. <https://doi.org/10.1002/cphc.201402794>.
- (10) Zhao, X.; Li, R.; Lu, C.; Baluška, F.; Wan, Y. Di-4-ANEPPDHQ, a Fluorescent Probe for the Visualisation of Membrane Microdomains in Living Arabidopsis Thaliana Cells. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.015>.
- (11) Dinic, J.; Biverstahl, H.; Mäler, L.; Parmryd, I. Laurdan and Di-4-ANEPPDHQ Do Not Respond to Membrane-Inserted Peptides and Are Good Probes for Lipid Packing. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.10.002>.
- (12) Amaro, M.; Reina, F.; Hof, M.; Eggeling, C.; Sezgin, E. Laurdan and Di-4-ANEPPDHQ Probe Different Properties of the Membrane. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2017**. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa5dbc>.
- (13) Danylchuk, D. I.; Jouard, P. H.; Klymchenko, A. S. Targeted Solvatochromic Fluorescent Probes for Imaging Lipid Order in Organelles under Oxidative and Mechanical Stress. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (2). <https://doi.org/10.1021/jacs.oc10972>.
- (14) Mazeris, S.; Fereidouni, F.; Joly, E. Using Spectral Decomposition of the Signals from Laurdan-Derived Probes to Evaluate the Physical State of Membranes in Live Cells. *F1000Research* **2017**, *6*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11577.2>.
- (15) Kim, H. M.; Choo, H. J.; Jung, S. Y.; Ko, Y. G.; Park, W. H.; Jeon, S. J.; Kim, C. H.; Joo, T.; Cho, B. R. A Two-Photon Fluorescent Probe for Lipid Raft Imaging: C-Laurdan. *ChemBioChem* **2007**, *8* (5). <https://doi.org/10.1002/cbic.200700003>.
- (16) Cheniour, M.; Gueyrard, D.; Goekjian, P. G.; Granjon, T.; Marcillat, O. A Convenient and Versatile Synthesis of Laurdan-like Fluorescent Membrane Probes: Characterization of Their Fluorescence Properties. *RSC Adv.* **2016**, *6* (7), 5547-5557. <https://doi.org/10.1039/c5ra20369d>.
- (17) Kaiser, H. J.; Lingwood, D.; Levental, I.; Sampaio, J. L.; Kalvodova, L.; Rajendran, L.; Simons, K. Order of Lipid Phases in Model and Plasma Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (39). <https://doi.org/10.1073/pnas.0908987106>.
- (18) Bianchi, F.; Pereno, V.; George, J. H.; Thompson, M. S.; Ye, H. Membrane Mechanical Properties Regulate the Effect of Strain on Spontaneous Electrophysiology in Human iPSC-Derived Neurons. *Neuroscience* **2019**, *404*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.014>.
- (19) Lauk, U. H.; Skrabal, P.; Zollinger, H. Synthese Und Flüssigkristalline Eigenschaften 2,6-disubstituierter Naphthaline. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68* (5). <https://doi.org/10.1002/hlca.19850680533>.
- (20) Schneider, C.; Goyard, D.; Gueyrard, D.; Joseph, B.; Goekjian, P. G. Synthesis of 2-, 3-, and 4-Substituted Pyrido[2,3-b]Indoles by C-N, C-O, and C-C(Sp) Bond Formation. *European J. Org. Chem.* **2010**. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201000795>.
- (21) Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. Reaction Intermediates and Catalyst Improvements in the Hetero Cross-Coupling of Aryl Halides and Tin Amides. *Journal of the American Chemical Society.* **1994**. <https://doi.org/10.1021/ja00092a058>.
- (22) Guram, A. S.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Aromatic Animations with in Situ Generated Aminostannanes. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**. <https://doi.org/10.1021/ja00096a059>.
- (23) Hamilton, J. A. NMR Reveals Molecular Interactions and Dynamics of Fatty Acid Binding to Albumin. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (12). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.002>.
- (24) Koh, J. S.; Lieberthal, W.; Heydrick, S.; Levine, J. S. Lysophosphatidic Acid Is a Major Serum Noncytokine Survival Factor for Murine Macrophages Which Acts via the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *J. Clin. Invest.* **1998**, *102* (4). <https://doi.org/10.1172/JCI1002>.
- (25) Bell, R. M.; Ballas, L. M.; Coleman, R. A. Lipid Topogenesis. *J. Lipid Res.* **1981**.
- (26) Sprong, H.; Kruithof, B.; Leijendekker, R.; Slot, J. W.; Van Meer, G.; Van Der Sluijs, P. UDP-Galactose:Ceramide Galactosyltransferase Is a Class I Integral Membrane Protein of the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **1998**. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25880>.
- (27) Heyn, M. P.; Dencher, N. A.; Cherry, R. J. Lipid-Protein Interactions in Bacteriorhodopsin-Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles. *Biochemistry* **1981**, *20* (4). <https://doi.org/10.1021/bi00507a029>.
- (28) de Paillerets, C.; Gallay, J.; Alfsen, A. Effect of Cholesterol and Protein Content on Membrane Fluidity and β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Mitochondrial Inner Membranes of Bovine Adrenal Cortex. *BBA - Biomembr.* **1984**, *772* (2). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90042-7).
- (29) Stoll, L. L.; Spector, A. A. *CHANGES IN SERUM INFLUENCE THE FATTY ACID COMPOSITION OF ESTABLISHED CELL LINES*; Tissue Culture Association, Inc, 1984; Vol. 20.

- (30) Spector, A. A.; Mathur, S. N.; Kaduce, T. L. Lipid Nutrition and Metabolism of Cultured Mammalian Cells. *Progress in Lipid Research*. 1980. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(80\)90003-X](https://doi.org/10.1016/0163-7827(80)90003-X).
- (31) Rong, X.; Wang, B.; Palladino, E. N. D.; De Aguiar Vallim, T. Q.; Ford, D. A.; Tontonoz, P. ER Phospholipid Composition Modulates Lipogenesis during Feeding and in Obesity. In *Journal of Clinical Investigation*; 2017; Vol. 127. <https://doi.org/10.1172/JCI93616>.
- (32) Wang, B.; Tontonoz, P. Liver X Receptors in Lipid Signalling and Membrane Homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0037-x>.
- (33) Frechin, M.; Stoeger, T.; Daetwyler, S.; Gehin, C.; Battich, N.; Damm, E. M.; Stergiou, L.; Riezman, H.; Pelkmans, L. Cell-Intrinsic Adaptation of Lipid Composition to Local Crowding Drives Social Behaviour. *Nature* 2015, 523 (7558). <https://doi.org/10.1038/nature14429>.
- (34) Gray, E. M.; Díaz-Vázquez, G.; Veatch, S. L. Growth Conditions and Cell Cycle Phase Modulate Phase Transition Temperatures in RBL-2H3 Derived Plasma Membrane Vesicles. *PLoS One* 2015, 10 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137741>.
- (35) Steinkühler, J.; Sezgin, E.; Urbančič, I.; Eggeling, C.; Dimova, R. Mechanical Properties of Plasma Membrane Vesicles Correlate with Lipid Order, Viscosity and Cell Density. *Commun. Biol.* 2019, 2 (1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0583-3>.
- (36) Thibault, G.; Shui, G.; Kim, W.; McAlister, G. C.; Ismail, N.; Gygi, S. P.; Wenk, M. R.; Ng, D. T. W. The Membrane Stress Response Buffers Lethal Effects of Lipid Disequilibrium by Reprogramming the Protein Homeostasis Network. *Mol. Cell* 2012, 48 (1). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.016>.
- (37) Almeida, F. V.; Walko, G.; McMillan, J. R.; McGrath, J. A.; Wiche, G.; Barber, A. H.; Connelly, J. T. The Cytolinker Plectin Regulates Nuclear Mechanotransduction in Keratinocytes. *J. Cell Sci.* 2015, 128 (24). <https://doi.org/10.1242/jcs.173435>.
- (38) Pilon, M. Revisiting the Membrane-Centric View of Diabetes. *Lipids in Health and Disease*. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0342-0>.
- (39) Morigny, P.; Houssier, M.; Mairal, A.; Ghilain, C.; Mouisel, E.; Benhamed, F.; Masri, B.; Recazens, E.; Denechaud, P. D.; Tavernier, G.; Caspar-Bauguil, S.; Virtue, S.; Sramkova, V.; Monbrun, L.; Mazars, A.; Zanoun, M.; Guilmeau, S.; Barquissau, V.; Beuzelin, D.; Bonnel, S.; Marques, M.; Monge-Roffarello, B.; Lefort, C.; Fielding, B.; Sulpice, T.; Astrup, A.; Payrastre, B.; Bertrand-Michel, J.; Meugnier, E.; Ligat, L.; Lopez, F.; Guillou, H.; Ling, C.; Holm, C.; Rabasa-Lhoret, R.; Saris, W. H. M.; Stich, V.; Arner, P.; Rydén, M.; Moro, C.; Viguier, N.; Harms, M.; Hallén, S.; Vidal-Puig, A.; Vidal, H.; Postic, C.; Langin, D. Interaction between Hormone-Sensitive Lipase and ChREBP in Fat Cells Controls Insulin Sensitivity. *Nat. Metab.* 2019, 1 (1). <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0007-6>.
- (40) Paradis, E.; Schliep, K. Ape 5.0: An Environment for Modern Phylogenetics and Evolutionary Analyses in R. *Bioinformatics* 2019, 35 (3). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>.

Supporting information for :

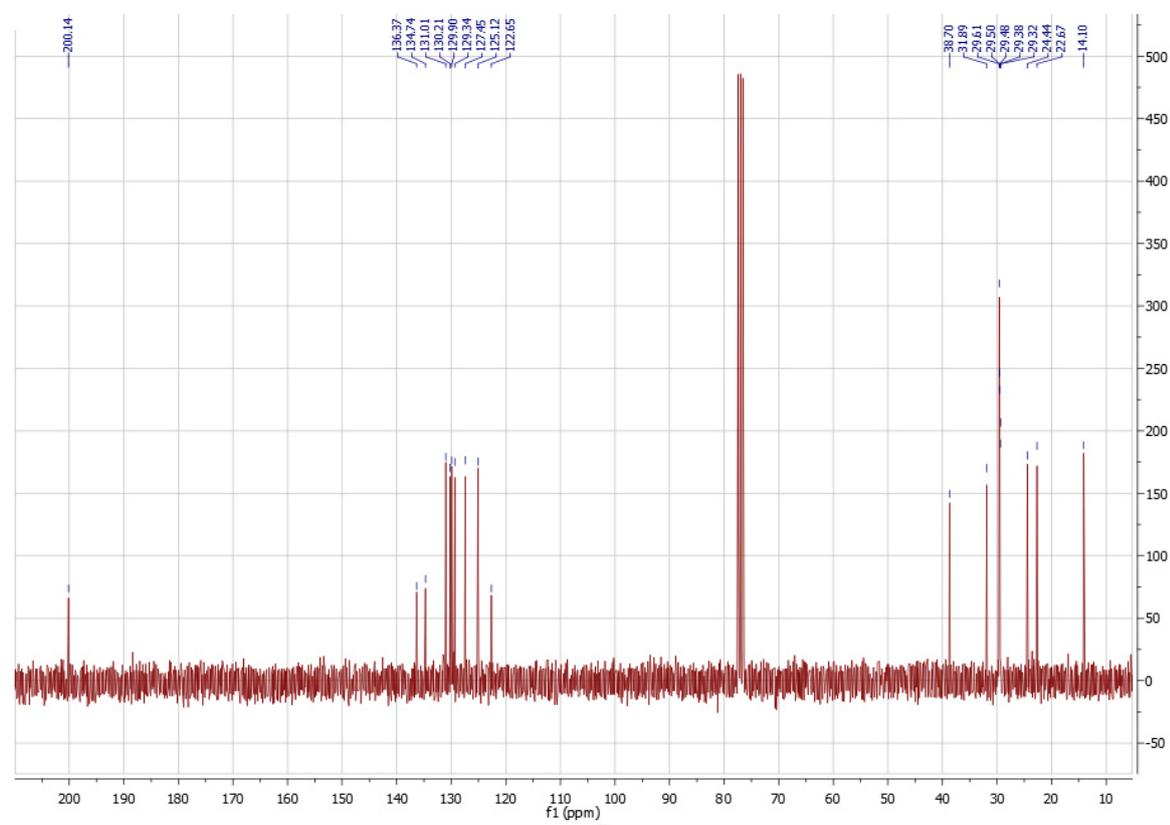
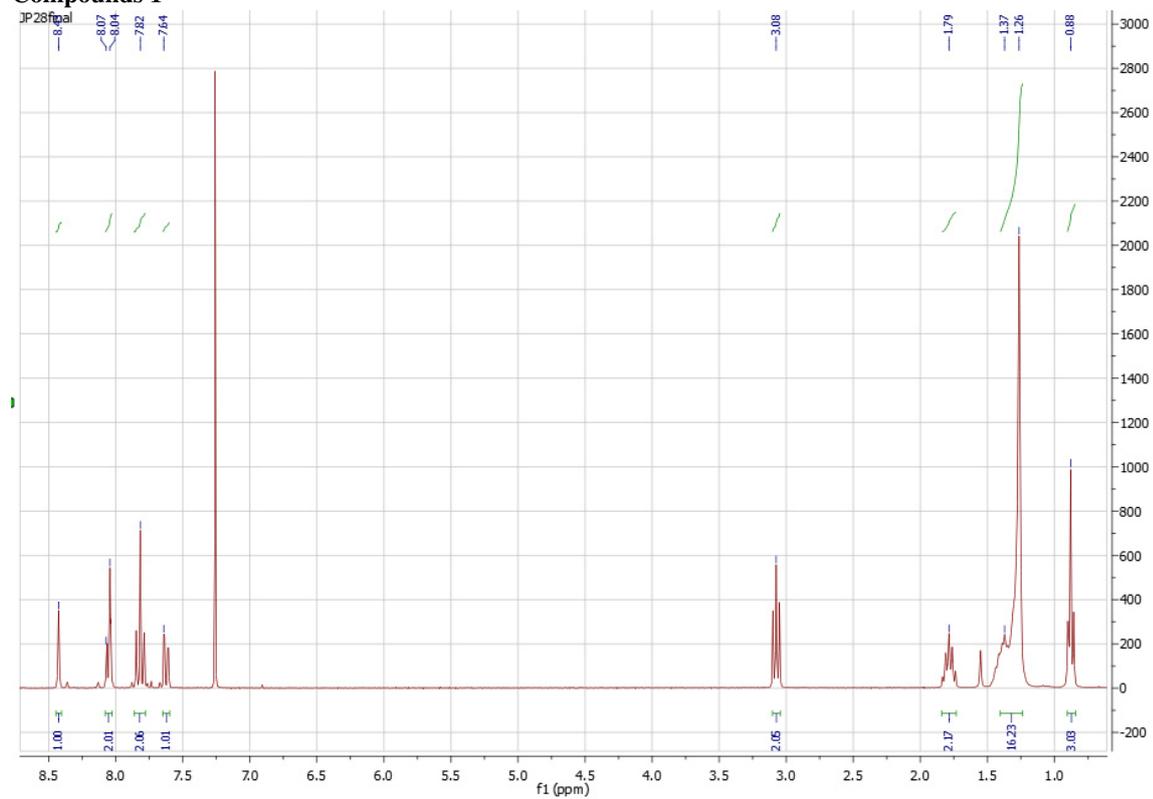
Synthesis routes

Figure S1. Structure of Dioll analogs and NMR characterization of Dioll and its precursors



NMR spectra

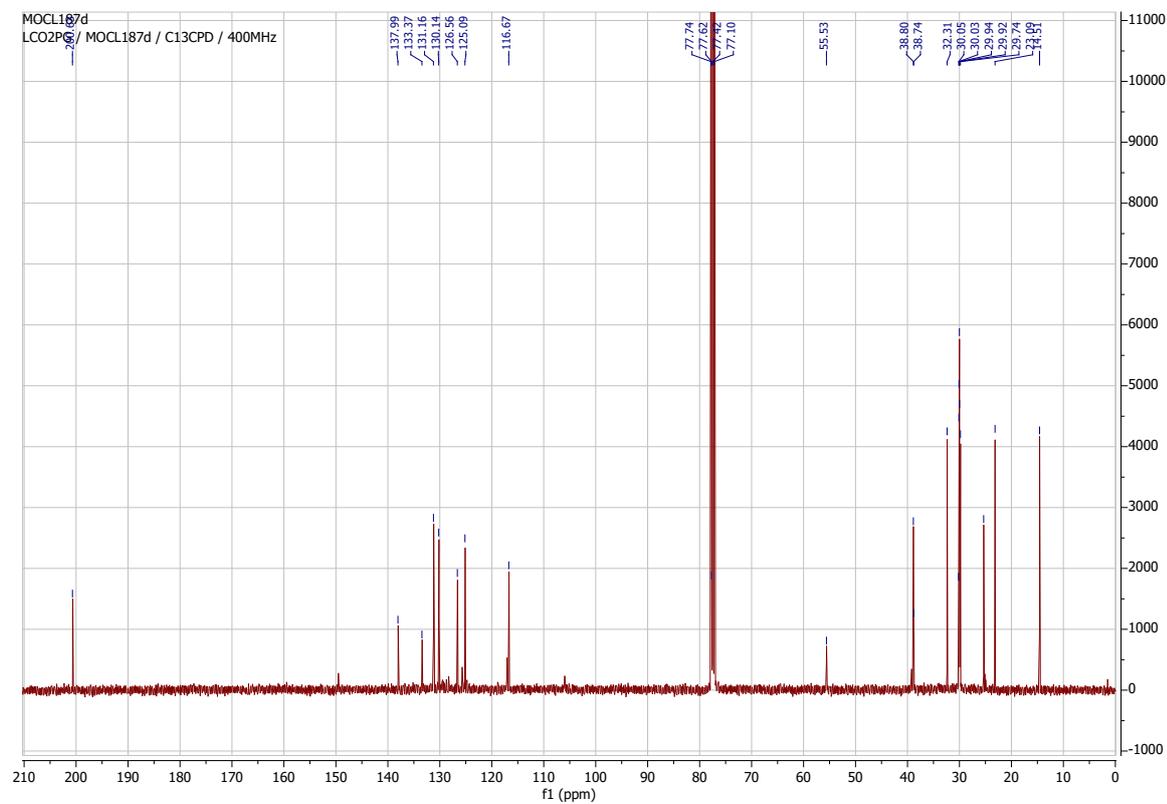
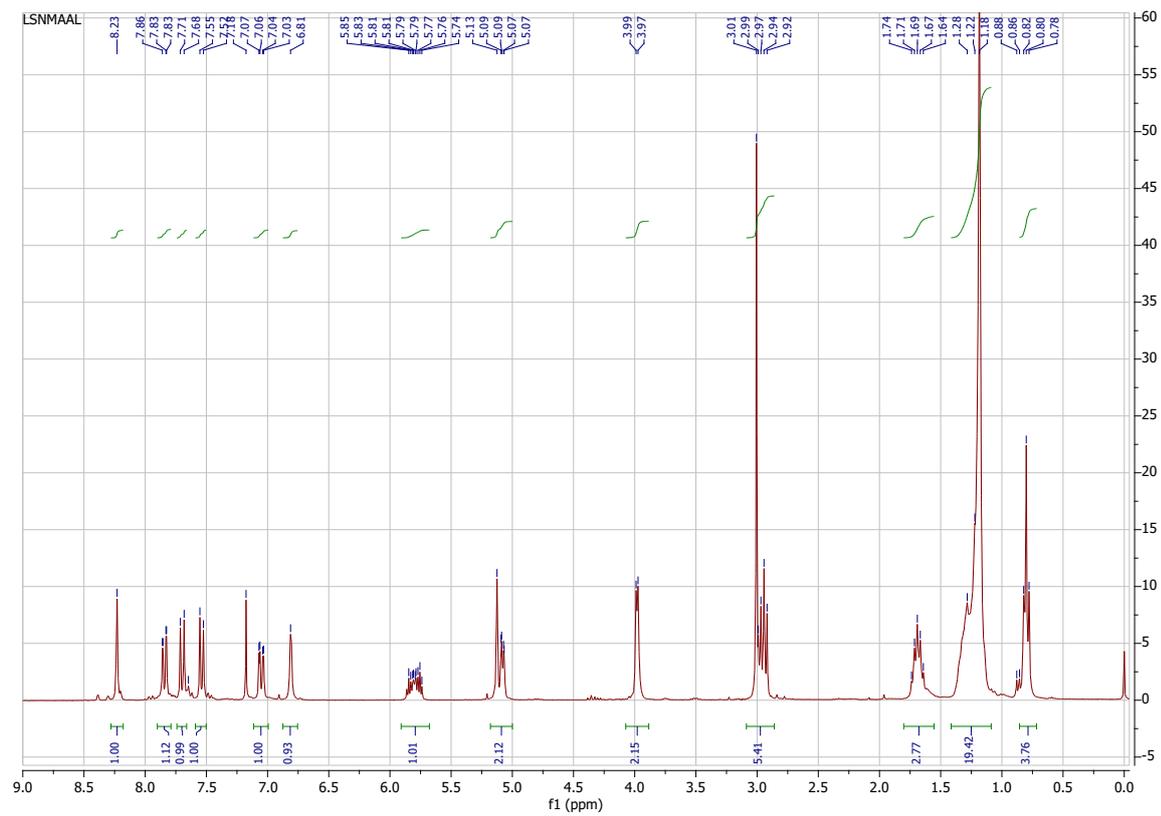
Compounds 1



Top : ¹H spectrum

Bottom : ¹³C spectrum

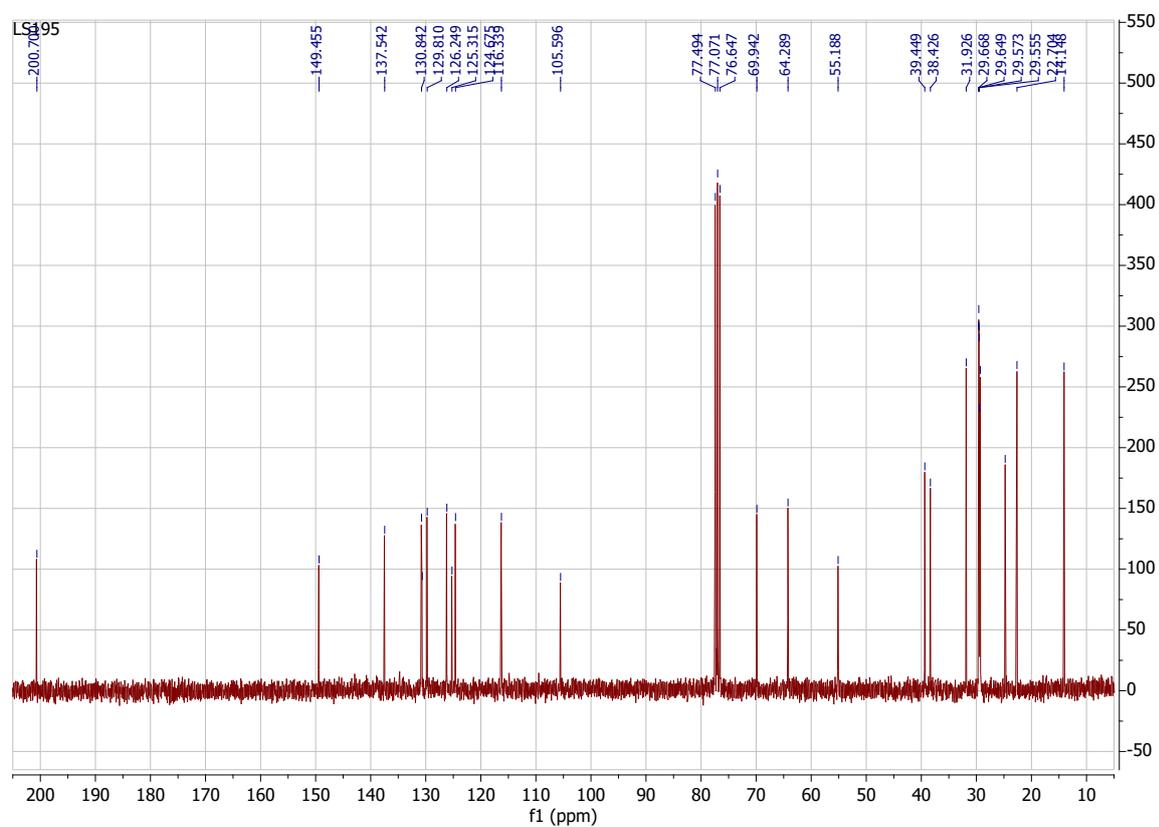
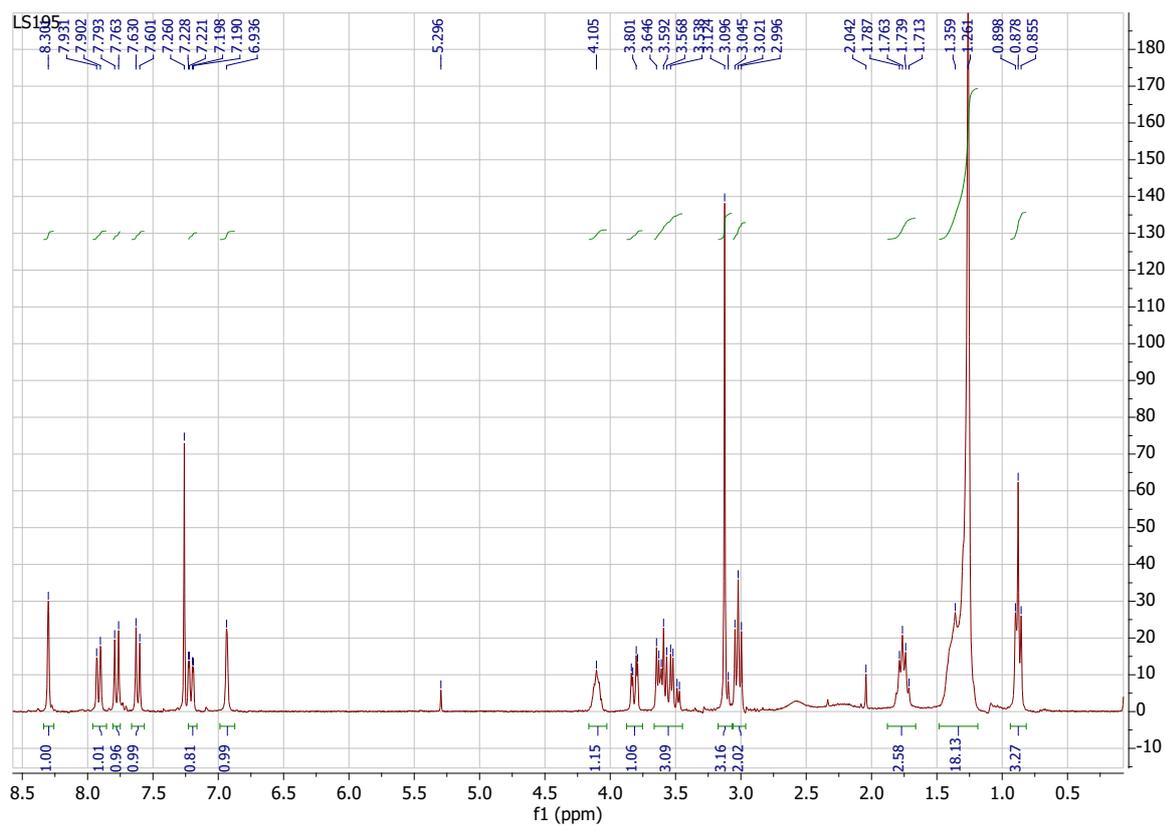
Compounds 2



Top : ¹H spectrum

Bottom : ¹³C spectru

Compounds 3 (DIOLL)



Top : 1H spectrum

Bottom : 13C spectrum

Photophysical data

Table S1. The optical properties of Laurdan, C-Laurdan and Dioll

Polarity



Solvent		Toluene	Chloroform	DMSO	Ethanol
λ emission maximum (nm)	Laurdan	423	440	460	485
	C-Laurdan	416	432	450	485
	Dioll	425	441	460	486
Maximum fluorescence intensity (A. U.)	Laurdan	3814	4441	5533	4221
	C-Laurdan	359	3115	2428	1491
	Dioll	5041	5041	9384	7647

Table summarizing the fluorescence properties of the indicated dyes in several solvents (λ =wavelength)

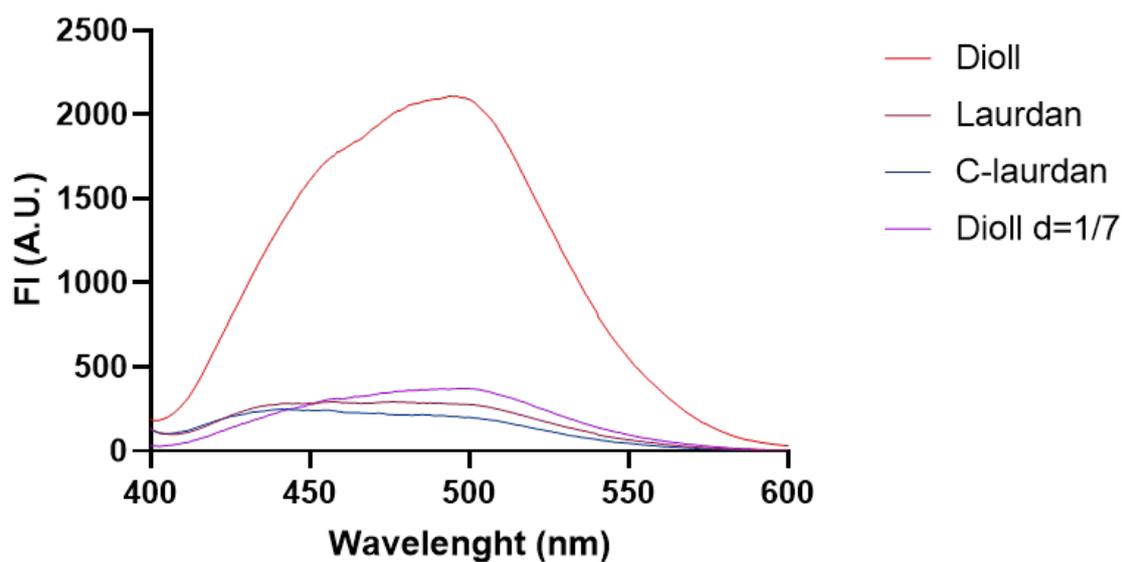


Figure S2. Fluorescence intensity of Laurdan derivatives in liposomes. Fluorescence of polarity-sensitive probes (0.2 μ M) in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) liposomes (0.1 mg/mL). An additional measurement is shown for Dioll following a 7 times dilution.

Table S2. Structural and melting temperature information of standard glycerophospholipids used to test GP analysis in various liposomes.

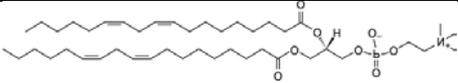
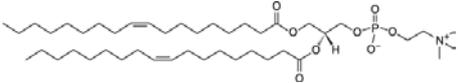
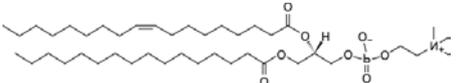
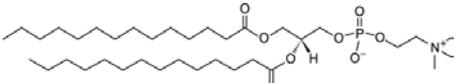
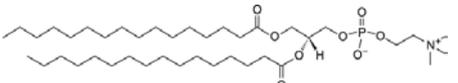
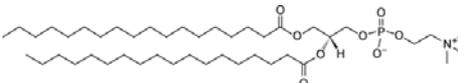
	Lipid	Acyl chain composition	Schematic structure	T _m
DLPC	1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	18:2 ($\Delta^{9,12}$ -Cis) PC		-57°C
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	18:1 (Δ^9 -Cis) PC		-17°C
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0-18:1 PC		-4°C
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	14:0 PC		24°C
DPPC	1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0 PC		41°C
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	18:0 PC		55°C

Table indicates the name of phospholipids used for liposome preparation. Their acyl chain composition, structure and T_m are also specified.

Biochemical data

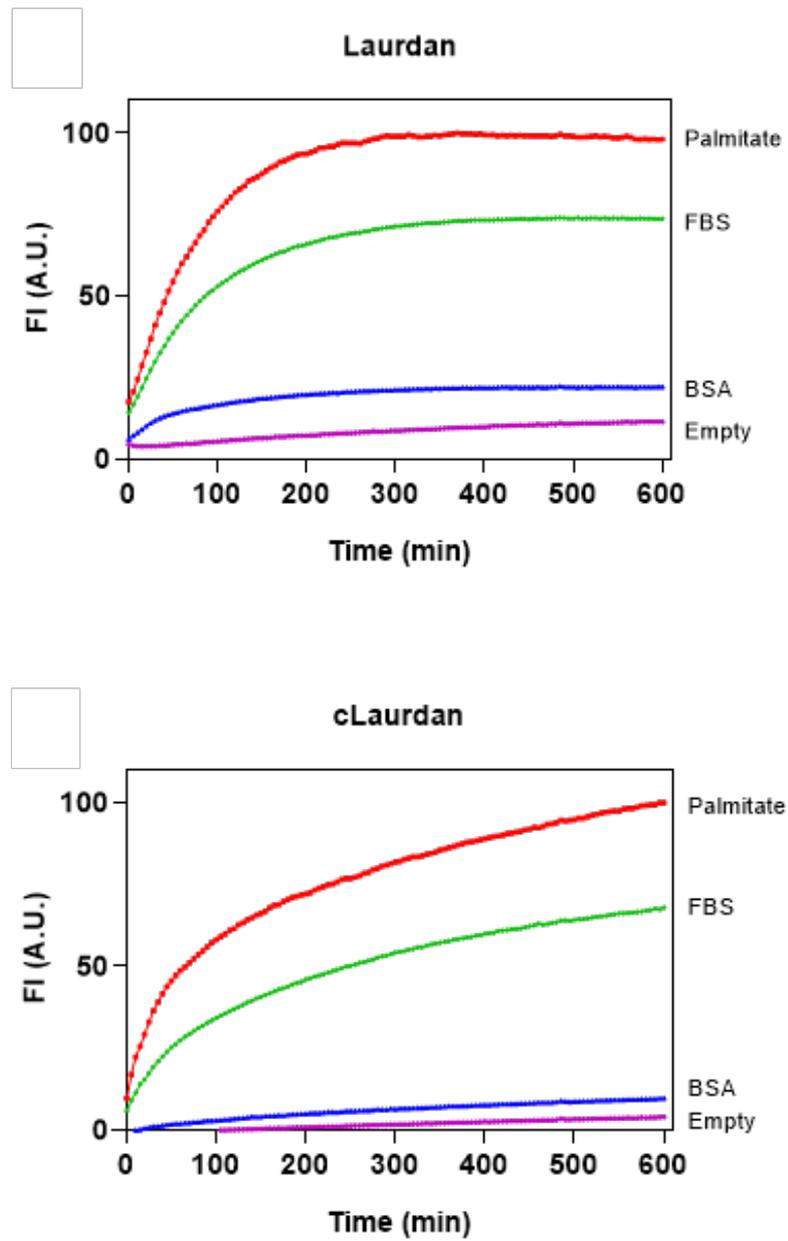


Figure S3. Laurdan, C-Laurdan uptake and signal in live cells. HMECs grown in medium containing no fetal bovine serum (FBS) (Empty) were incubated with Laurdan or C-Laurdan as indicated and fluorescence was recorded in real-time. Similar experiments were also performed in the presence of 10% FBS or after the addition of unloaded bovine serum albumin (BSA) or BSA loaded with palmitate (4.1 ratio). All results are expressed as a percentage of the maximal fluorescence obtained for each medium condition

Image analysis

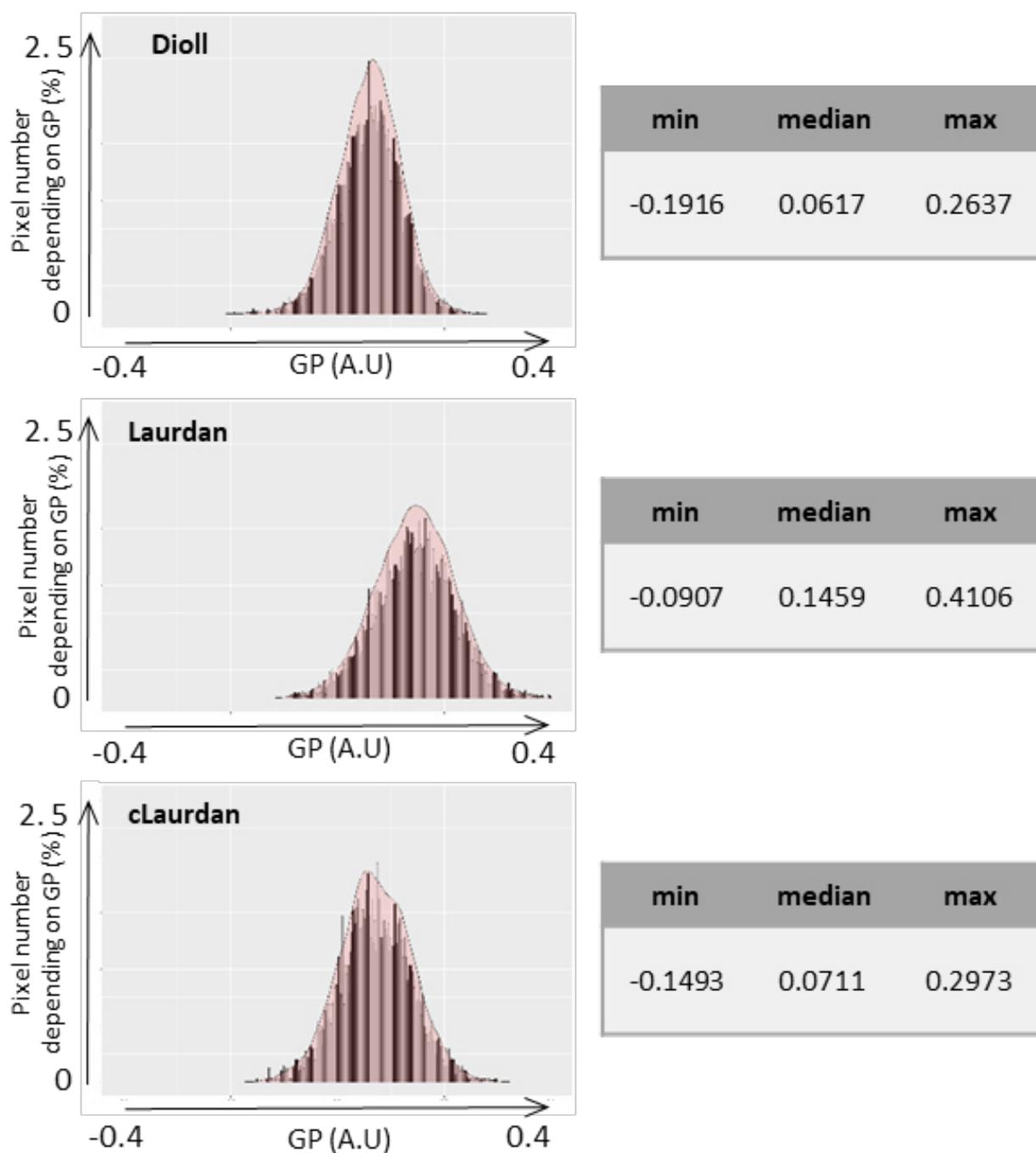


Figure S4. GP distribution in plasma membrane according to each solvatochromic fluorescent dye. GP distribution for DiIol (up), Laurdan (Middle) and C-Laurdan (Bottom) corresponding to images presented in the Figure 5C. Min, Median and Max values are indicated for each experiment.

Table S3. Spatial Autocorrelation Score (Moran's index) for GP values issue from images corresponding to plasma membrane sections stained with Dioll or its analogs.

	Euclidean Distances			
	observed	expected	sd	Z
MatrixGP_cLaurdan	0.013091	-0.00025	0.000565	23.6168
MatrixGP_Dioll	0.055114	-0.00014	0.00035	158.0225
MatrixGP_Laurdan	0.016287	-0.00012	0.000324	50.63495

	Direct neighbours			
	observed	expected	sd	Z
MatrixGP_cLaurdan	0.093922	-0.00025	0.008447	11.14817
MatrixGP_Dioll	0.319838	-0.00014	0.006287	50.89829
MatrixGP_Laurdan	0.11615	-0.00012	0.005713	20.35177

Table reports the complete statistical analysis presented in the Figure 5C. The Euclidean distances approach takes into account all pairwise point combinations, based on the correlation between the inter-point Euclidean distance and the reported GP. The direct-neighbor approach focuses on the correlation between the GP of a point and its direct neighbors (as in a square centred on a specific point) compared to all other points in the 2D space. Scores for both approaches are shown. Expected values and their standard deviation for a random distribution are indicated in each case. A Z-score was finally calculated to quantify how superior the observed autocorrelation statistic was to expectations in each dataset.

Cell analysis

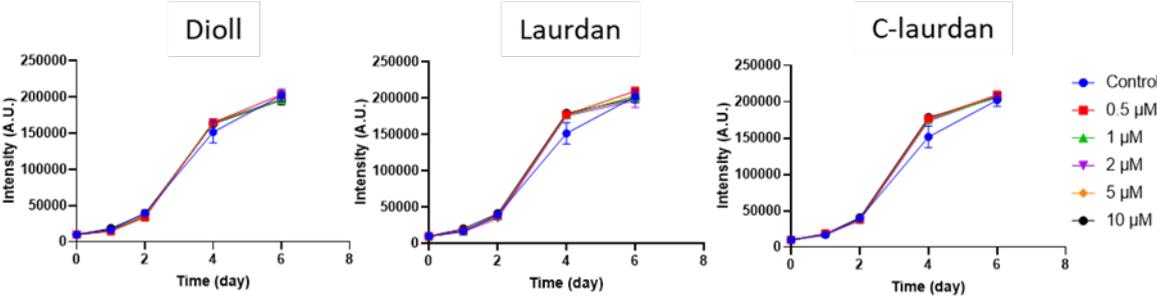


Figure S5. Effects of long-term staining on cell proliferation. HMECs were incubated with indicated dyes at specified concentrations. Cell proliferation was followed for six days by measuring oxidative activity of the whole population.

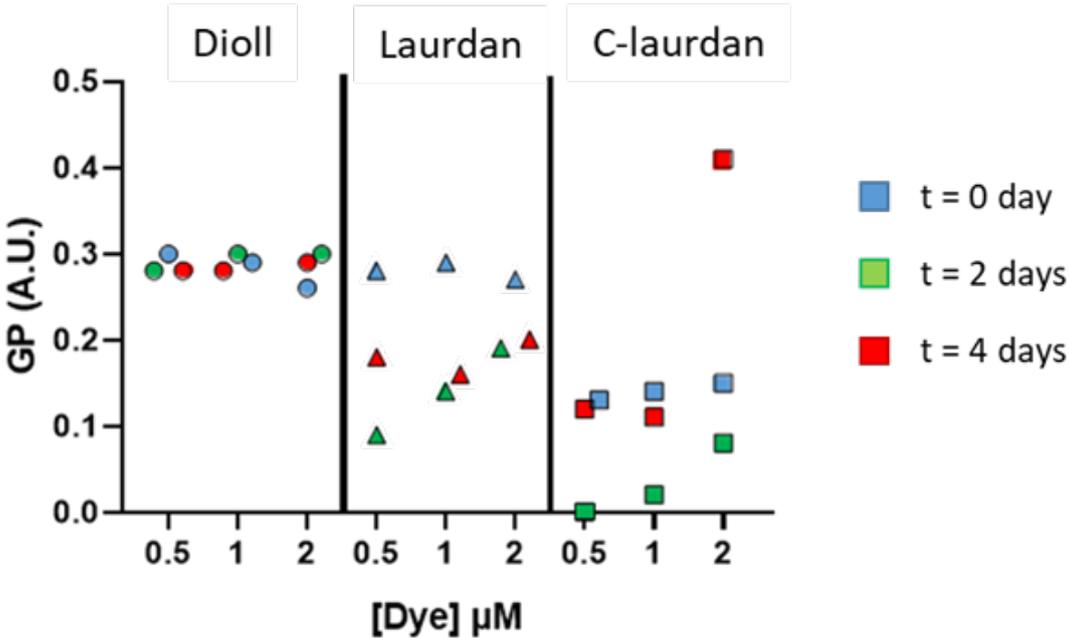
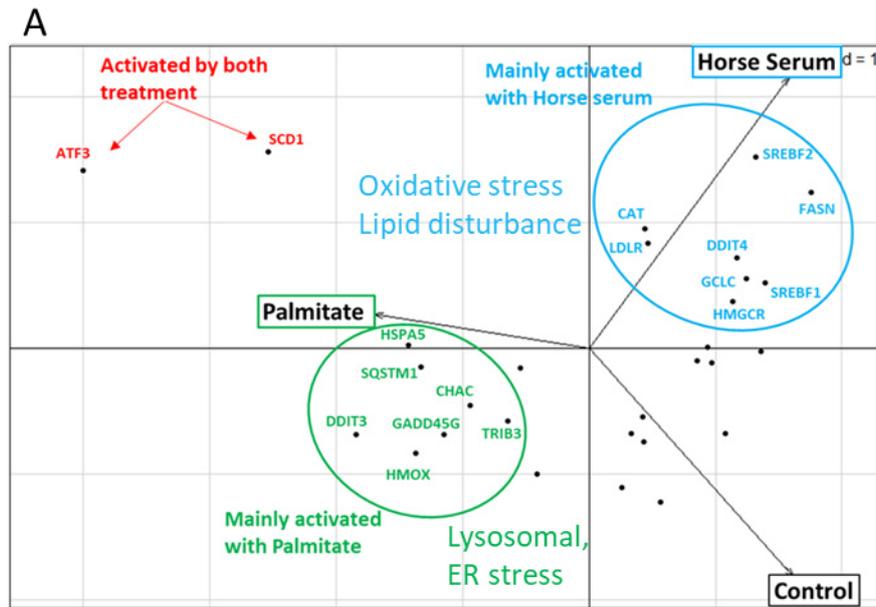


Figure S6. Effects of long-term staining on apparent membrane fluidity. HMECs were incubated for 24 h with Dioll, Laurdan and C-Laurdan at the indicated concentrations. GPs associated with membranes of the whole population were calculated immediately prior to medium renewal, 2 days later or 4 days later as indicated.



SREBP1 (*SREBF1*) target genes : *FASN*, *SCD1*
 SREBP2 (*SREBF2*) target genes : *HMGCR*, *LDLR*

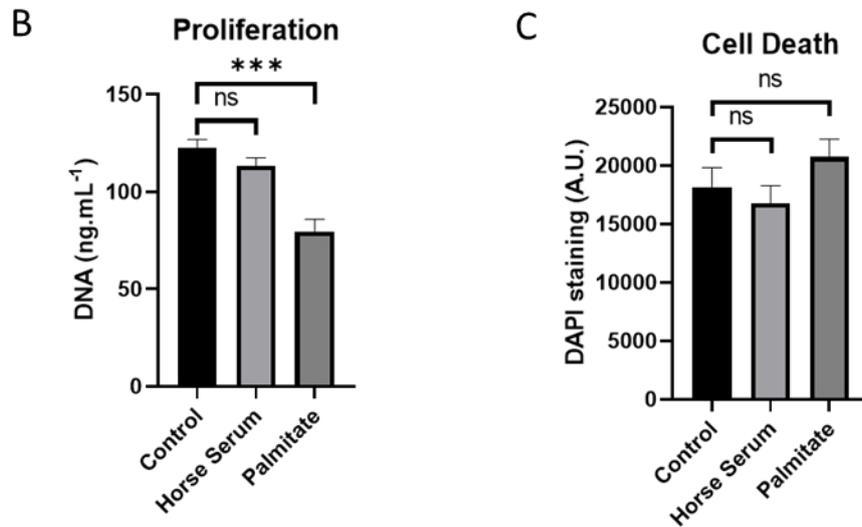


Figure S7. Stress analysis of cells treated with different lipid contents in the extracellular medium. (A) HMECs were treated with 500 μ M of palmitate or 10% horse serum for 48 h. mRNA gene expression (30 genes) corresponding to stress markers (ER stress, autophagy/lysosomal stress, oxidative stress and sterol/lipid disturbance) was then analyzed through RT-qPCR. Unsupervised multivariate analysis was then performed through a principal component analysis represented by a dot/scatter plot showing the contribution of each gene to the discrimination of control, palmitate-treated and horse serum treated conditions. Kernel target genes of SREBP1 and SREBP2 is also indicated. (B) Cell proliferation was analyzed after the same treatments through the quantification of DNA in cell extracts. (C) Cell death was also analyzed in the same conditions through the spectrofluorometric quantification of DAPI incorporated exclusively in dying cells.

Data represent mean \pm s.d.; three experiments were conducted for each condition in (B) and (C). Student's t-test, ns=non-significant $*$ = $P < 0,05$, $**$ = $P < 0.01$, $***$ = $P < 0,00$

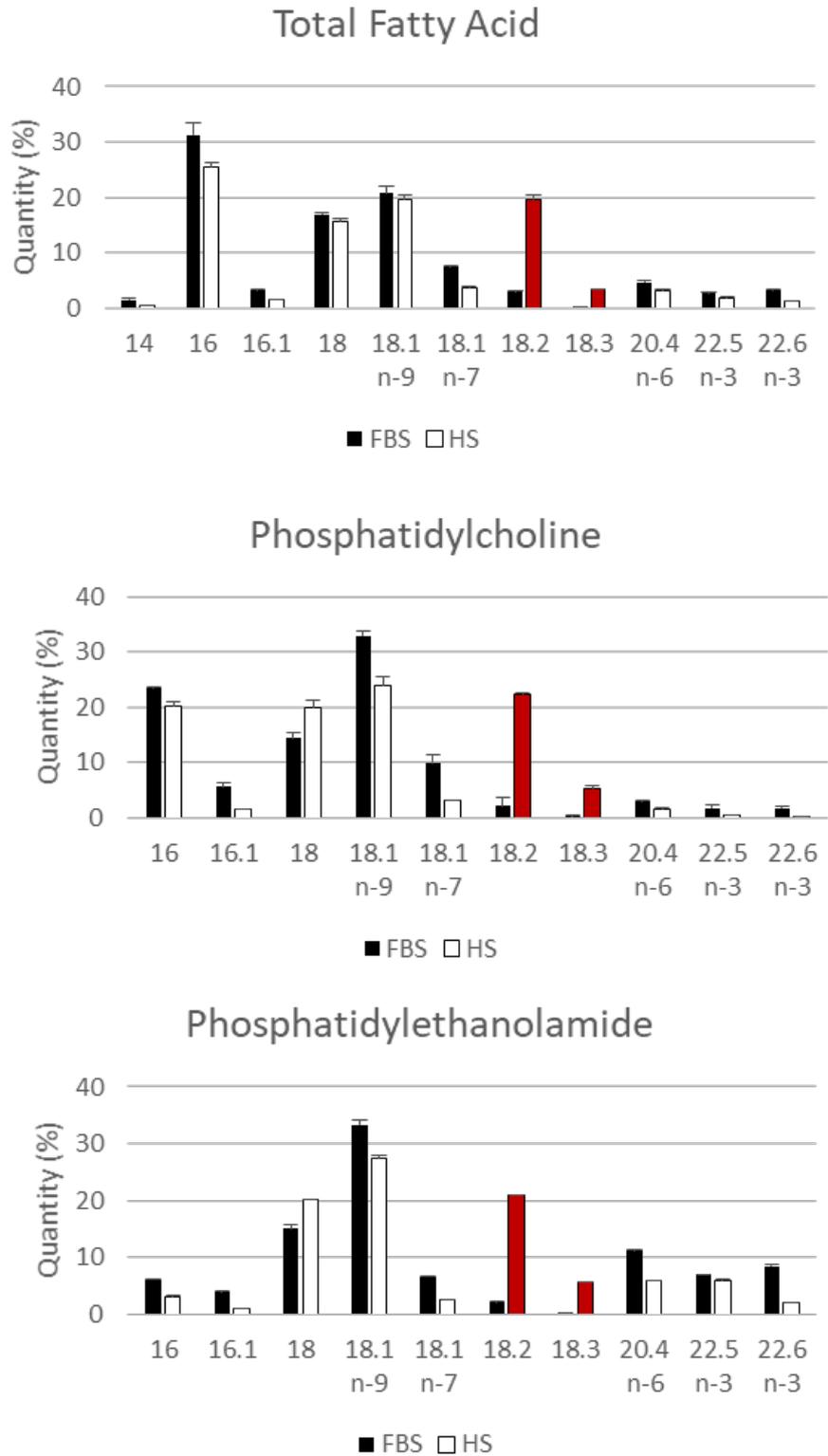


Figure S8. Lipidomic analysis of HMECs maintained in FBS or Horse serum. Top: Whole lipid chain analysis of control cells or cells treated with 10% of horse serum. Center and Bottom: Lipid chain analysis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the same conditions (n=2 independent experiments). Data represent mean \pm s.d.

Travaux supplémentaire en lien avec la publication

Introduction :

Nous nous sommes intéressées, en plus de l'étude des cellules, aux vésicules extracellulaires (*Extracellular vesicles*: EV). Ces vésicules sont sécrétées par l'ensemble des cellules et sont regroupées en 3 groupes : les exosomes, les microvésicules (ou ectosomes) et enfin les corps apoptotiques. La caractérisation d'origine de ces vésicules s'effectuait par des marqueurs de surface mais aussi grâce à leurs différences de tailles. Les exosomes sont caractérisées par une taille de 30 nm à 150 nm, enrichies en marqueurs de surface tels que CD63¹, CD81¹ et CD9² avec pour origine membranaire le système endosomal dans lequel la fusion du corps multivésiculaire avec la membrane plasmique permet leur libération dans la matrice extracellulaire³. Les microvésicules, aussi appelées ectosomes ou encore oncosomes, possèdent une taille entre 50 nm et 1000 nm et sont générées par bourgeonnement puis fission de la membrane plasmique permettant alors leur libération dans la matrice³. Cependant l'échelle de taille qui se chevauche, la morphologie similaire et la composition variable et croisée de leur contenu entre ces deux types de vésicules rendent difficiles les tentatives actuelles de créer une nomenclature précise de ces EV⁴. Leur nature étant membranaire et leurs biogenèses étant différentes, nous nous sommes alors demandé si la fluidité membranaire ne pourrait pas servir de paramètre permettant leur séparation.

Résultats :

Nous avons dès lors utilisé le Dioll pour marquer les vésicules extracellulaires après purification. En effet son intensité élevée est un avantage pour la quantification de la fluidité membranaire de ces vésicules de tailles réduites. Comme preuve concept nous avons dans un premier temps montré que des liposomes pouvaient être détectés après un marquage au Dioll (Figures A-C) au microscope confocal mais aussi en cytométrie, et qu'il était possible de mesurer leur fluidité en effectuant un rapport d'émission de fluorescence (apparenté au GP mais non identique). La mesure de la fluidité membranaire peut s'effectuer par des mesures sur cytométrie classique (Figure B), mais aussi par cytométrie spectrale qui permet par déconvolution des spectres à partir de spectres de références de définir un paramètre rigide et fluide (Figure C). Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux vésicules extracellulaires sécrétées par des cellules. Afin d'obtenir une quantité importante de matériel biologique, nous avons utilisé une lignée cancéreuse non adhérente issue d'un syndrome myélosplasique. Comme nous l'avons vu la nomenclature recommandée par la « International Society for Extracellular Vesicles » reflète notamment bien la difficulté de séparer clairement les exosomes et les microvésicules (ectosome)⁵. En utilisant la chromatographie d'exclusion stérique, nous avons à partir du milieu de culture cellulaire, pu obtenir deux fractions contenant chacune deux populations d'EV de taille différente, l'une légèrement inférieure à nos liposomes de 100 nm et une autre autour de 150-250 nm (**Figure D**). En se basant sur la taille des EV, les microvésicules sont enrichies dans la première fraction d'élution de la chromatographie, mais sont clairement toujours présentes dans la suivante. A l'inverse, les exosomes sont moins abondantes dans la première fraction avec une augmentation de leur quantité au cours de l'élution (**Figure D**). Comme nous l'avons vu les petites vésicules associées aux exosomes ont pour origine les corps multivésiculaires, dérivés des endosomes, tandis que les grandes

vésicules, qui elles sont associées aux microvésicules, ont pour origine le bourgeonnement de la membrane plasmique enrichie en cholestérol et sphingolipide. Sur la base de ces caractéristiques et en vue de nos mesures de GP effectuées sur cellules, nous avons émis l'hypothèse que les microvésicules seraient associées à une fluidité membranaire plus faible que celle des exosomes. Remarquablement, le Dioll peut marquer les deux types d'EV mais peut aussi les discriminer en se basant sur leur fluidité respective (**Figure E**). Les EV présentant une fluidité plus faible sont comme nous l'attendions enrichies dans la fraction initiale et avec une médiane de leur taille plus importante que les EV plus fluide. A l'inverse, les EV les plus enrichies dans une fraction plus tardive sont plus petites et se caractérisent par une fluidité plus élevée. Le Dioll pourrait ainsi être utilisé très efficacement en combinaison avec la cytométrie spectrale pour la discrimination des différents types d'EV à partir de leur fluidité membranaire.

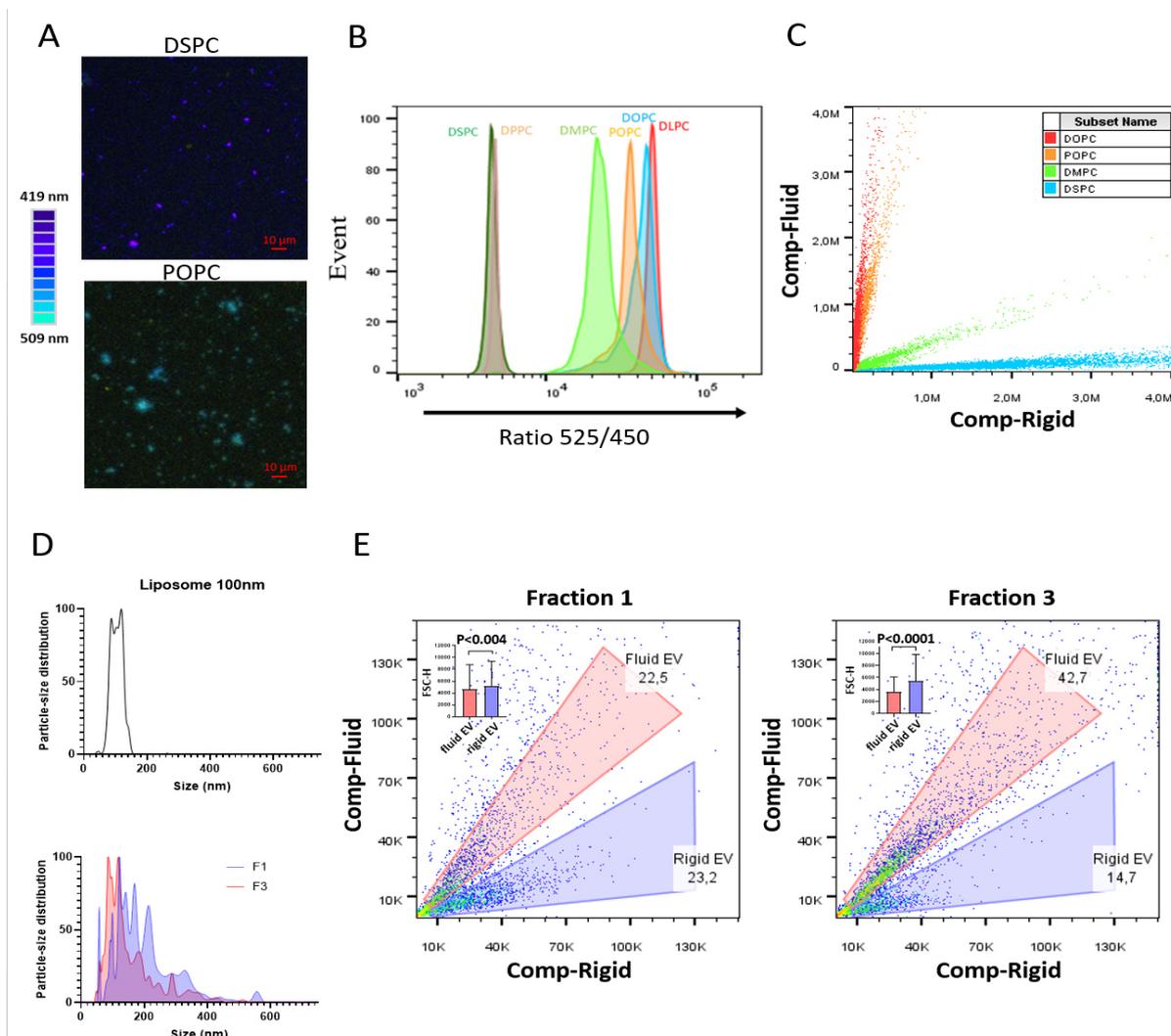


Figure : Propriété du Dioll à mesurer la fluidité membranaire de vésicules biomimétiques et physiologiques. **A)** Images représentatives des liposomes indiqués adsorbés sur lame et incubé avec 0.5 μM . **B)** Ratio de la fluorescence des canaux 525 nm vs 450 nm du Dioll inséré dans les liposomes indiqués et mesurés par cytométrie en flux conventionnel. **C)** Fluorescence d'émission séparée du Dioll inséré dans les liposomes indiqués et mesurés par cytométrie en flux spectral. **D)** Nanoparticle Tracking Analysis de liposomes extrudés à 100 nm (graphique du haut) Nanoparticle Tracking Analysis des EV obtenues par chromatographie d'exclusion (graphique du bas). Résultats montrés sont la première et la troisième fraction. **E)** Fluorescence d'émission post-déconvolution du Dioll inséré dans les EV obtenues de la fraction 1 et de la fraction 3. Les graphique internes aux dot plot indiquent la médiane de la taille (paramètre Forward Side Scatter) and la déviation standard des populations rouge et bleue sélectionnées.

Discussion :

Les premiers travaux ont permis de décrire une nouvelle sonde synthétisée au sein de notre équipe qui possède des caractéristiques plus pertinentes pour le suivi de la fluidité membranaire que les sondes préexistantes. Une meilleure résolution sur l'ensemble des membranes, notamment les régions plus fluides, qui couplé à l'absence de marquage des gouttelettes lipidiques font du Dioll un outil puissant pour suivre la fluidité membranaire des cellules. Il est cependant important de repréciser que dans ces travaux nous corrélons la fluidité membranaire par la mesure du niveau de l'hydratation des membranes. Or d'autres paramètres biophysiques permettent de décrire le niveau de la fluidité membranaire, comme par exemple la viscoélasticité. L'autre point fort du Dioll est son rapport quantique qui permet dans un premier temps de diminuer la puissance du laser et par conséquent la quantité de chaleur pouvant induire des variations de fluidité membranaire, et dans un second temps son utilisation pour le marquage des vésicules extracellulaires et leur détection au cytomètre spectral. Cependant, des expériences sont à venir sur ce dernier point pour savoir si les vésicules détectées sont des particules uniques ou des particules agrégées mais aussi si tout comme les cellules, l'analyse des vésicules extracellulaires permettraient de suivre les modifications de fluidité membranaire des cellules d'origines. En effet dans un contexte pathologique lors la tumorigenèse, les contraintes mécaniques de la matrice extracellulaire exercée sur les cellules peut être très variable. Ces effets mécaniques peuvent alors se traduire par une réponse différente des cellules. Même si des travaux ont notamment démontré que les cellules les plus agressives avaient une viscoélasticité plus importante ce qui correspondrait à une plus grande fluidité membranaire⁶⁻⁷, l'utilisation des vésicules extracellulaires pour le suivi de la plasticité cellulaire possède plusieurs avantages. Premièrement, des analyses préliminaires au sein de notre équipe semblent montrer que les vésicules extracellulaires ont une fluidité membranaire corrélée à la cellule sécrétrice. Ainsi une lignée cellulaire possédant une fluidité plus importante que celle d'une autre lignée sécrète des EV plus fluides que la seconde. Deuxièmement, les EV se retrouvent dans les biofluides tels que le sang, la salive et les urines permettant alors d'effectuer des biopsies liquides beaucoup moins invasives qu'une biopsie classique sur la tumeur *in situ*. Enfin les cellules cancéreuses sécrètent une quantité plus importante d'EV que les cellules saines. Ainsi l'analyse des EV pour la création d'un outil diagnostique basé sur des modifications de fluidité membranaire semble être une approche prometteuse.

Matériels et Méthodes :

Préparation des liposomes :

Les liposomes sont préparés dans un tampon PBS préfiltré à 0.22 µm par le protocole classique de congélation/décongélation. Brièvement, les lipides sont solubilisés dans du chloroforme puis séché par évaporateur rotatif. Le film lipidique formé est ensuite réhydraté avec le tampon PBS et agité jusqu'à une complète resuspension du film. La solution de vésicules est ensuite soumise à 6 cycles de congélation/décongélation (5 min dans de l'azote liquide / 10 min à 37°C dans un bain-marie) et enfin extrudée 19 fois à 400 nm suivie de nouveau 19 fois à 100 nm à travers des membranes de polycarbonates (AvantiPolar® Lipids Liposome Extruder). La solution de liposomes est ensuite conservée à 4°C.

Préparation des vésicules extracellulaires :

4 millions de cellules en suspension d'une lignée cancéreuse myéloïde HL60 (ATCC), sont maintenues une nuit dans 20 mL de leur milieu sans sérum : milieu RPMI1640 complété avec 91 U.mL⁻¹ penicillin-streptomycin (P/S) (Gibco). Le milieu est ensuite récupéré et les cellules suspendues sont éliminées par centrifugation 300g, 4min, 4°C. Deux autres centrifugations sont ensuite effectuées respectivement à 1500g et 10000g pendant 10min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires et les larges particules. 10 mL de ce milieu pré-purifié sont utilisés pour la chromatographie d'exclusion (qEV10-35nm iZon™). L'ensemble des tampons sont préalablement filtrés 0.22 µm et la chromatographie est effectuée en suivant le protocole fourni par l'entreprise iZon™. Les fractions obtenues de 5 mL sont ensuite analysées à l'aide du traqueur de nanoparticules Nanosight NS300 pour déterminer la distribution de taille des particules ainsi que leur quantité globale.

Acquisition de la fluorescence des EV :

Les EV et les liposomes sont marqués extemporanément au Dioll. 1 nmol de sonde pour 50 µg de lipides est additionnée par vésicules. Le Dioll est ajouté la veille au soir avant les analyses des EV et des liposomes.

Analyse par cytométrie : Les liposomes et les EV sont resuspendues dans un PBS. Pour la cytométrie classique, l'acquisition est effectuée par le cytomètre en flux BD LSRFortessa™, à l'aide du laser violet laser et 10 000 événements ont été enregistrés. Les filtres à 450 et 510 nm ont été utilisés pour quantifier un ratio de fluorescence d'émission. Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Flow Jo 7.5.5. Pour le cytomètre en flux de type spectral, la signature spectrale associée au Dioll au sein des liposomes DSPC et DOPC sont utilisées afin de discriminer la composante rigide et fluide de l'ensemble du spectre d'émission obtenu chez d'autres liposomes et EV. Les mesures sont effectuées à partir du cytomètre spectral Aurora de chez Cyteck®.

Analyse par microscopie confocale. Les images des échantillons ont été capturées par microscopie confocale (Zeiss LSM 880 AxioObserver inversé, avec environnement contrôlé : température, CO₂ et hygrométrie) avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27. Le Dioll est excité avec laser diode 405 nm, d'énergie = 1.0 %_{max} et l'acquisition s'effectue en mode spectral avec un gain = 759 A.U, le spectre d'émission est subdivisé en canaux de 8/9 nm de 424 à 513 nm avec une échelle de couleur reflétant les différentes longueurs d'onde du violet au vert.

Bibliographie :

1. JM, E. *et al.* Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 20121–20127 (1998).
2. C, T. *et al.* Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* **147**, 599–610 (1999).
3. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2014) doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

4. J, K. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E968–E977 (2016).
5. C, T. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. vesicles* **7**, (2018).
6. J, L. *et al.* Cell softness regulates tumorigenicity and stemness of cancer cells. *EMBO J.* **40**, (2021).
7. J, Z. *et al.* Multi-scale mechanical characterization of prostate cancer cell lines: Relevant biological markers to evaluate the cell metastatic potential. *Biochim. Biophys. acta. Gen. Subj.* **1861**, 3109–3119 (2017).

Résultat n°2



Suivi de la plasticité cellulaire par la fluidité
membranaire

Introduction :

Le tissu mammaire est intrinsèquement hétérogène en raison de la coexistence de deux lignages épithéliaux, luminaux et myoépithéliaux, supportés par une dynamique complexe de progéniteurs. D'autre part, une certaine plasticité existe au sein de ce tissu, certains de ces progéniteurs étant capables de régénérer ces différentes composantes cellulaires. Il a notamment été montré que dans un tissu sain, les progéniteurs unipotents des cellules basales normalement à l'origine des cellules myoépithéliales peuvent en absence des progéniteurs des cellules luminales acquérir un statut multipotent pour reconstituer l'ensemble de la hiérarchie mammaire¹. Cette plasticité associée à ces progéniteurs basaux constitue un mécanisme susceptible d'expliquer l'hétérogénéité des tumeurs mammaires, cette propriété étant fréquemment exacerbée lors des processus de transformation néoplasique.

De façon simplifiée, l'hétérogénéité tumorale des lésions mammaires s'est d'abord conceptualisée sous la forme de cinq grands groupes : Luminal A, Luminal B, HER2⁺, Basal-like et Claudin-low, caractérisé principalement par des outils génétiques et histologiques. L'un des paramètres majeurs de cette classification est l'expression des récepteurs hormonaux caractéristique des cellules les plus différenciées (récepteur à l'œstrogène, à la progestérone), ou d'un récepteur aux facteurs de croissance EGF, connu sous le nom de HER2 ou ERBB2²⁻⁴. Malgré ces premières classifications, il est vite apparu cependant que l'hétérogénéité des tumeurs mammaires reposait sur des mécanismes plus complexes, favorisant non seulement l'existence d'une hétérogénéité entre les tumeurs, mais aussi à l'intérieure d'une même tumeur. L'existence de cellules au pouvoir tumorigénique plus important présentant des caractères très indifférenciés a notamment pu être mise en évidence dans tous ces sous-groupes⁵. Ces cellules ne constituent sans doute pas une population stable au sommet d'une hiérarchie de cellules cancéreuses plus classiques, mais plutôt un pool dynamique de taille variable en fonction des tumeurs⁶. La proportion de ces cellules au sein de la tumeur dépendrait ainsi très directement de l'amplitude des altérations des mécanismes supportant normalement le contrôle de l'identité cellulaire. Ces notions ont un intérêt clinique majeur puisqu'on considère que ces cellules très indifférenciées et la dynamique associée à leur émergence à partir de cellules cancéreuses phénotypiques moins altérées favorisent et accélèrent le développement tumoral, la résistance thérapeutique ainsi que des métastases.

Les mécanismes à l'origine des altérations de l'identité cellulaire des cellules cancéreuses sont complexes et dépendent à la fois de leur cellule normale d'origine, des combinaisons oncogéniques ayant conduit à leur transformation néoplasique, et de programme cellulaire contrôlant normalement la plasticité des cellules épithéliales dans des contextes de réparation ou de régénération tissulaire⁷. Parmi ces programmes, on trouve notamment le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), favorisant la perte d'identité des cellules épithéliales mammaire. Ce programme induisant un fort remodelage épigénétique est fréquemment activé de manière, au moins, partielle lors de la tumorigenèse. Au sein des tumeurs, cette activité génère un continuum phénotypique entre des cellules ayant complètement conservé leurs propriétés épithéliales et d'autres très fortement engagées dans un lignage mésenchymateux. Entre les deux, des cellules de type hybrides sont fréquemment retrouvées. Cet état hybride représente une aberration phénotypique dans laquelle une

configuration épigénétique normalement transitoire est maintenue d'où le terme fréquemment utilisé de cellules métastables. D'autre part, les cellules présentant de telles caractéristiques auraient une grande capacité à osciller phénotypiquement autour de cet état hybride pouvant présenter transitoirement des caractéristiques de cellules plus différenciées avant de revenir à ce statut hybride. L'engagement des programmes EMT, par leur capacité à générer ces états métastables, jouerait ainsi un rôle très fort sur l'adaptabilité des cellules lors de changement de leur environnement (stress thérapeutique, stress oncogénique, changement tissulaire)⁸.

La plasticité cellulaire en particulier épigénétique, constituant les racines de ces états métastables, est un paramètre excessivement difficile à mesurer. Du fait d'une structuration globale de la chromatine potentiellement spécifique liée à cette plasticité⁹, des outils de mesures pourraient être utilisés comme l'ATAC-seq, l'HiC ou encore le CHIP-seq. Cependant, ces techniques restent complexes et coûteuses. Or quelques travaux ont pu mettre en évidence une modulation du métabolisme des différents composants des membranes cellulaires lors de l'acquisition d'un phénotype se rapportant à ces états métastables. Notamment une augmentation de l'incorporation des lipides polyinsaturés au sein des membranes accompagnées par une augmentation des mécanismes anti-ferroptoses¹⁰⁻¹⁴ ou encore la diminution du cholestérol libre pour la structuration des membrane notamment grâce à son efflux hors de la cellule par le transporteur ABCA1^{15,16}. Dans ces travaux, nous avons donc utilisé la sonde fluorescente ratiométrique, le Dioll, que nous avons développé pour la mesure de la fluidité membranaire via le calcul du paramètre GP (*Generalized Polarization*) dans différents contextes de plasticité cellulaire. Nous avons pu ainsi mettre en évidence que la fluidité membranaire permettait de discriminer les différents sous-groupes tumoraux avec une fluidité membranaire la plus importante chez les cellules de types Basal-like et que ces mesures étaient reliées à leur sensibilité à l'inhibition des voies anti-ferroptoses. De plus, l'activation du programme de la transition épithélio-mésenchymateuse par activation de l'EMT-TF ZEB1 exogène est accompagnée par une diminution de la fluidité membranaire. Enfin, nous avons créé un modèle cellulaire *in vitro* 2D permettant de moduler l'identité cellulaire par la création de cellules très plastiques multipotentes avec lesquelles nous effectuons des différenciations en progéniteur myoépithélial ou luminal. La perte et l'acquisition d'une identité cellulaire sont tous deux accompagnées par une variation de la fluidité membranaire, montrant que le suivi de la fluidité membranaire permettrait la création d'outils diagnostiques du suivie de la plasticité cellulaire.

Résultats :

Mise en évidence d'un lien de corrélation entre sous-type tumoral, sensibilité à la ferroptose et fluidité membranaire :

Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, une des caractéristiques associées à la plasticité cellulaire est la présence d'une plus forte sensibilité à la ferroptose en raison d'une probable surreprésentation des acides gras polyinsaturés dans les membranes. Les lignées de type Basal-like sont considérées le plus souvent comme les plus dédifférenciées, un état associé à leur plus grand pouvoir tumorigénique et la présence de marqueurs de surface retrouvés chez les progéniteurs mammaires les plus précoces. Afin d'obtenir une première indication de particularités membranaires dans ces lignées et d'un lien corrélatif entre plasticité cellulaire et propriétés membranaires, nous avons donc tout d'abord vérifié la plus grande sensibilité des cellules cancéreuses de type basal-like à la ferroptose en utilisant un couple de trois agents pharmacologiques, RSL3, iFSP, et FIN56^{17,18,19}. Les deux premiers inhibent respectivement GPX4 et FSP1 tandis que le troisième active notamment la Squalène synthase. Ces trois enzymes contrôlent la ferroptose à différents niveaux. GPX4 permet la réduction des lipides peroxydés, et FSP1 favorise la régénération du CoQ10, une molécule constituant un autre agent réducteur de ces mêmes lipides altérés. Enfin, l'activation de la Squalène synthase agit aussi sur le CoQ10 en favorisant sa diminution intracellulaire, sensibilisant ainsi la cellule à la ferroptose. Ces expériences ont été réalisées avec des représentants de chaque sous-groupe, à savoir les MCF7 et ZR75-1 pour les lignées Luminal, BT20 et HCC1937 pour les lignées Basal-like, MDA-MB-231 et HS578T pour les lignées Claudin-low, et HCC1954 correspondant à un sous-groupe mixte Basal-like/HER2+. Nous avons également inclus dans cette analyse des cellules épithéliales mammaires humaines (HMEC), non tumorigéniques, comme contrôles. Afin d'éviter de potentiel biais nutritif, nous avons aussi adapté toutes ces lignées à un même milieu MEM (Minimum Essential Media) complémenté avec 5% de sérum de vœu fœtal (SVF).

Pris de façon isolée, les inhibiteurs RSL3 et iFSP n'induisent pas de façon évidente la mort cellulaire après 24h de traitement (Figure 1-A), en revanche leur combinaison permet quant à elle d'induire fortement la ferroptose chez des lignées Basal-like BT20 et HCC1937 avec respectivement 57% et 60% de viabilité cellulaire restante (Figure 1-A). L'inhibiteur FIN56 permet d'obtenir des résultats similaires avec une nouvelle fois, un effet plus important chez les cellules de types Basal-like, BT20 et HCC1937 (Figure 1-A). L'ajout d'iFSP ne modifie pas ensuite la tendance observée avec l'inhibiteur FIN56 utilisé seul, augmentant simplement légèrement la mort cellulaire dans toutes les lignées (Figure 1-A). Il est intéressant de noter que le mécanisme toxicologique associé à FIN56 est complexe associant la déplétion du CoQ10, mais aussi probablement l'induction de la dégradation de GPX4. Ainsi, l'obtention de résultats similaires après un traitement avec cet inhibiteur ou après une combinaison RSL3/iFSP suggère que la double inhibition des réactions de réduction des lipides peroxydés, dépendant de GPX4 et du CoQ10, constitue le mécanisme permettant de déclencher le processus de ferroptose de façon préférentielle dans les lignées Basal-like. Ces résultats

constituaient ainsi un premier indice suggérant qu'une plus grande plasticité cellulaire était bien associée à un métabolisme membranaire spécifique vraisemblablement dépendant d'une plus forte concentration de lipides polyinsaturés.

À la suite de ces observations, nous avons donc effectué la mesure des fluidités membranaires de l'ensemble des lignées. Nous avons, dans un premier temps, vérifié que le GP des cellules évoluait de façon identique en fonction de la température. Pour rappel, les valeurs de GP peuvent s'étaler entre -1 et 1, cette dernière valeur constituant un extrême de rigidité, et sont sensibles à la température qui lorsqu'elle s'élève favorise la transition des lipides membranaires d'une phase gel vers une phase liquide diminuant alors la rigidité des membranes. Nous avons effectué les mesures des GP sur l'ensemble des lignées sur une gamme de température de 21 à 41°C (Figure 1-B) et vérifié que les valeurs de GP diminuaient bien de façon linéaire avec la température pour toutes les lignées testées en suivant une pente similaire. Les comparaisons de fluidité peuvent donc se faire à différentes températures sans modifier les différences relatives potentiellement observées. Grâce à ces méthodes, nous avons pu vérifier que les lignées Basal-like (BT20, HCC1937 et HCC1954) avaient un GP plus faible que les autres lignées, donc une fluidité membranaire plus importante. À l'inverse la lignée de contrôle HMEC, non tumorigénique, est quant à elle la moins fluide avec le GP le plus élevé des différentes lignées. Ainsi une corrélation évidente semble exister entre une plus grande plasticité cellulaire, une sensibilité à la ferroptose et une plus grande fluidité membranaire, ces deux dernières caractéristiques pouvant résulter d'une plus grande concentration de lipides polyinsaturés dans les membranes des lignées Basal-like.

Pour confirmer ce résultat, nous avons répété ces mesures de la fluidité membranaire à 37 °C en utilisant ces mêmes lignées cancéreuses ainsi que de la lignée non tumorigénique HMEC. À nouveau, les cellules contrôles HMEC présentaient un GP plus élevé que l'ensemble des lignées cancéreuses, traduisant leur plus faible fluidité membranaire. Les lignées cancéreuses possédaient quant à elles aussi des différences de GP avec notamment un GP plus élevé chez les Claudin-low (MDA-MB-231 et HS578T) que chez les Luminal (MCF7 et ZR75-1), ainsi qu'un GP des cellules luminales plus levées que celui des Basal-Like (Figure 1-C). Ces résultats sont une nouvelle fois cohérents aux observations effectuées lors de l'induction de la ferroptose par inhibition des mécanismes suppresseurs de la peroxydation lipidique. D'autre part, ces résultats sont en accords aux données cliniques et moléculaires associés à ces différentes lignées puisqu'il est relativement évident que les lignées luminales dérivent de cellules largement engagées dans cette même voie de différenciation dont elles conservent la sensibilité aux hormones. À l'inverse, les lignées Basal-like sont généralement issues de cellules plus progénitrices dans lesquelles les processus de transformation néoplasique sont associés à une perte des caractères luminaux et une plus grande plasticité cellulaire. Concernant le sous-type Claudin-Low enfin, les données obtenues constituent un résultat particulièrement intéressant en raison des hypothèses effectuées sur l'origine de ces tumeurs et leur évolution. En effet, ces tumeurs de type métaplasiques peuvent provenir d'un processus de dédifférenciation extrême ou d'un progéniteur mammaire au sommet de la hiérarchie⁷. Sur ces critères, on s'attendrait donc à obtenir une très forte plasticité. Cependant,

ces tumeurs sont aussi associées à un réengagement des cellules cancéreuses dans des processus de différenciation aberrants de type mésenchymateux varié (osseuse, cartilagineuse, fibroblastique, etc.), aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ainsi, le processus de transformation néoplasique dans ce contexte n'est sans doute pas associé à l'obtention d'un état plastique métastable, mais plutôt à un état souche très transitoire suivi par une reprogrammation phénotypique forte et une perte de plasticité.

Afin de vérifier ces dernières hypothèses, nous avons voulu tester dans une des lignées Basal-like, si l'induction d'un de ces programmes de différenciation aberrante pouvait effectivement conduire à une perte de plasticité associée une rigidification des membranes cellulaires. Nous avons alors traité la lignée HCC1954 avec du TGF β , un puissant inducteur d'EMT, et laissé se dérouler le processus de façon terminale. L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux complet pouvait alors s'observer en suggérant que les cellules étaient sorties de leur état métastable et Basal-like (Figure 1-D). Cette lignée, nommée HCC1954mes, a été ensuite comme les autres lignées adaptées au milieu MEM complémenté avec 5% de SVF. Comme attendu, cette modification phénotypique était accompagnée d'une diminution de la fluidité membranaire en comparaison de la lignée d'origine HCC1954 (Figure 1-E). Ces résultats mettent en relief la complexité des processus d'EMT pour l'acquisition de ces états métastables de grande plasticité, en suggérant que le niveau d'engagement, partiel ou complet, module la finalité phénotypique du processus. Ce niveau d'engagement générerait ainsi alternativement des cellules hybrides présentant une grande plasticité ou au contraire des cellules ayant acquis une nouvelle identité mésenchymateuse sans conservation de cette plus grande plasticité^{20,21}.

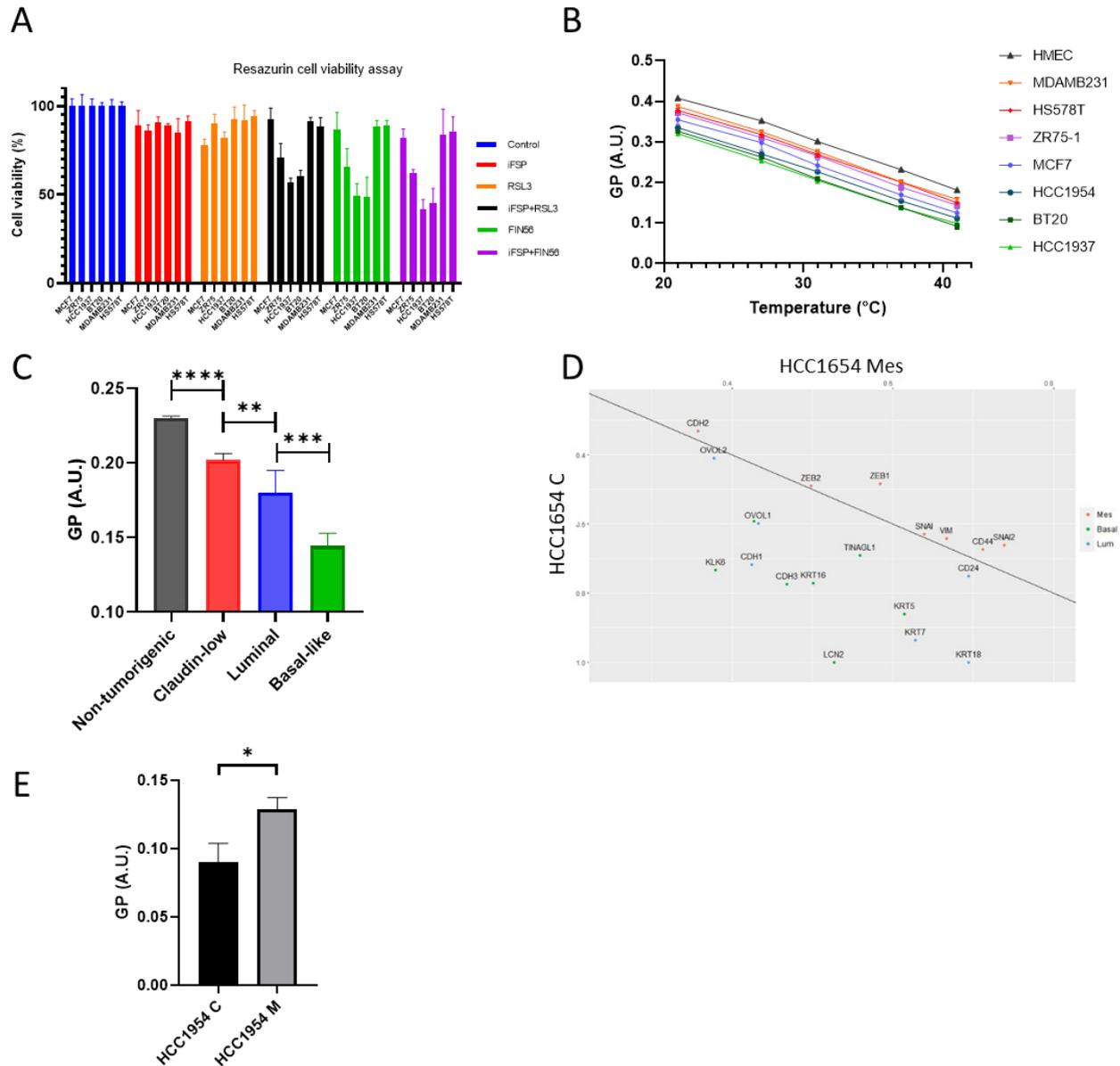


Figure 1 : Fluidité membranaire des lignées cancéreuses mammaires corrélée à leur sensibilité à l'inhibition des mécanismes antiferroptose. **A)** Intensité de fluorescence du test de viabilité cellulaire à la résazurine normalisé et représenté en pourcentage de viabilité des lignées indiquées après traitements de molécules pro-ferroptose (iFSP 5 μ M, RSL3 0.5 μ M et FIN56 1 μ M). **B)** Mesure du paramètre GP représentative des lignées cellulaires indiquées après incubation avec 2 μ M de Dioll pendant 24h à différentes températures (21, 27, 31, 37 et 41°C). **C)** Mesure du paramètre GP des sous-groupes tumoraux mammaires indiqués après incubation avec 2 μ M de Dioll pendant 24h, la mesure est effectuée à 37°C. Les données sont moyenné \pm s.d.; $n > 3$ expériences indépendantes par lignées cellulaires. Student's t-test, ns=non-significative $*$ = $P < 0.05$, $**$ = $P < 0.01$, $***$ = $P < 0.001$. **D)** Dot plot représentatif de l'expression d'ARNm des lignées HCC1954 contrôle vs HCC1954 mésenchymateuse. La ligne noire représente un niveau d'expression identique entre les deux échantillons. **E)** Mesure du paramètre GP des lignées HCC1954 contrôle et mésenchymateuse indiquées après incubation avec 2 μ M de Dioll pendant 24h, la mesure est effectuée à 39°C. Les données sont moyennées \pm s.d.; $n = 3$ expériences indépendantes. Student's t-test, $*$ = $P < 0.05$.

Modulation de l'identité cellulaire dans un modèle isogénique par induction partielle du processus de l'EMT :

Les résultats précédents suggéraient un lien fort entre la perte d'identité cellulaire, la plus grande plasticité qui en résulte et le niveau de fluidité membranaire. Cependant, l'utilisation de lignées non isogéniques, possédant chacune un set d'altérations génétiques spécifiques et provenant de patients différents, pourrait fortement influencer les résultats que nous avons obtenus. Ainsi pour valider les corrélations mises en évidence précédemment, nous nous sommes tournés vers un nouveau modèle où seule l'identité cellulaire était perturbée de façon ectopique, dans un fond génétique dépourvu d'altérations, notamment oncogéniques. Pour cela nous avons utilisé un modèle cellulaire de type HMEC dans lequel l'expression de l'EMT-TF ZEB1 peut être augmentée par ajout de doxycycline dans le milieu de culture l'induction de cet EMT-TF active un processus d'EMT faisant alors sortir les cellules HMEC de leur identité épithéliale et permettant l'acquisition d'un phénotype plus plastique^{22,23}. De plus, l'induction contrôlée de l'expression de ZEB1 permet à l'inverse d'une expression constitutive un contrôle cinétique du programme évitant l'acquisition définitive d'une identité mésenchymateuse. Après induction de l'EMT-TF ZEB1 pendant une période de 10 jours à la doxycycline, nous avons pu obtenir un changement phénotypique caractéristique de la mise en place du programme de l'EMT visible en microscopie optique, notamment par la perte des jonctions cellulaires. La perte au moins partielle de l'identité épithéliale pouvait également être confirmée au niveau moléculaire par la plus faible expression d'un panel de gènes associé à cette identité (EpCAM, CDH1, OVOL1, FOXA1) et une augmentation d'expression de gènes mésenchymateux (CDH2, CD44, VIM, ZEB1 humain, ZEB2) (Figure 2-A).

Nous avons alors dans un second temps mesuré par spectrofluorimétrie la fluidité membranaire de ces cellules en comparaison des cellules d'origines. Les cellules HMEC d'origines arborent un GP plus élevé que celui des cellules HMEC dans lesquelles ZEB1 a été exprimé, avec respectivement un GP de 0,195 et 0,142 (Figure 2-B). En vue de ces résultats, nous avons cherché à savoir si des modifications de compositions lipidiques, notamment au niveau des chaînes acyles, étaient associées à l'acquisition d'un phénotype plus plastique. L'analyse lipidomique des cellules a mis en lumière une diminution des sphingolipides et à l'inverse une augmentation des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylsérines (Figure 2-C). Les sphingolipides étant fortement associés à la rigidification de la membrane plasmique jouant notamment un rôle sur la stabilisation des radeaux lipidiques, leur diminution peut contribuer à l'augmentation de la fluidité membranaire lors du processus de dédifférenciation. Quant à l'analyse des chaînes acyles, elle a permis de mettre en lumière une augmentation des lipides mono-insaturés au sein des cellules de contrôle tandis que chez les cellules ayant subi un processus de dédifférenciation, les lipides polyinsaturés de type $\omega 6$, acide linoléique et acide arachidonique, étaient enrichis (Figure 2-D).

En lumière de ces résultats et des rôles joués par les PUFA $\omega 6$ dans les cellules les plus tumorigéniques et dédifférenciées, et présentés dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, nous nous sommes demandé si un milieu enrichi en PUFA $\omega 6$ permettrait une meilleure mise

en place du processus de dédifférenciation associé au programme d'EMT. Pour cela, nous avons lancé une cinétique d'induction de l'expression de ZEB1 par traitement à la doxycycline sur 10 jours, en comparant un milieu de culture complété avec du Sérum de vœux fœtal (SVF) ou avec du Serum de cheval (Horse serum : HS), ce dernier étant enrichi en PUFA $\omega 3$ et $\omega 6$ ²⁴. L'analyse comparative d'expression de gènes dans les deux conditions montre une différence de cinétique de l'EMT. En effet, jusqu'à 5 jours l'évolution de l'expression des gènes liés au programme de l'EMT (■) est identique entre les deux conditions. Cependant sur des temps plus longs, après 10 jours d'induction, l'expression des gènes associés au processus de l'EMT était plus importante dans la condition riche en PUFA $\omega 6$ (HS) que dans la condition normale (SVF) (Figure 2-E). Il était d'autre part intéressant de constater qu'en plus des gènes associés au programme de l'EMT (■ : ZEB1 humain, ZEB2, CD44, SNAI1), ceux induits par des mécanismes de stress associé à la physiologie du réticulum (● : ATF3, ATF4, DDIT3, TRIB3) étaient aussi surexprimés durant le processus de dédifférenciation et de façon plus importante chez les cellules maintenues dans le milieu HS. La majorité des membranes cellulaires correspondent à ce réticulum suggérant que la perte d'identité épithéliale s'inscrit dans le remodelage de ces membranes dont les réponses de stress précitées seraient le témoin. Enfin, un dernier point intéressant a pu être observé au niveau du gène ACSL4. Son expression augmentait au cours du processus d'EMT et plus fortement en présence de horse sérum, indiquant que l'incorporation des PUFA dans le pool des phospholipides était vraisemblablement activée. En effet, ce gène encode une enzyme de type acyl-CoA transférase, capable d'activer spécifiquement les acides gras polyinsaturés en vue de leur incorporation dans les phospholipides membranaires.

Au cours de ces expériences, nous avons aussi pu constater que l'évolution de l'expression de ces gènes était majoritairement pulsative. Après avoir fait ce constat, nous avons alors relancé des cinétiques de l'induction de l'EMT par induction à la doxycycline dans le milieu classique contenant du SVF. Après avoir normalisé l'expression des gènes associés au caractère épithélial et ceux au caractère mésenchymateux (Tableau 1), nous avons pu vérifier que l'expression des gènes épithéliaux était bien pulsative lors de l'induction de l'EMT, tandis que ceux du caractère mésenchymateux après 3 jours de variation tendaient à se stabiliser (Figure 2-F). La mesure du GP durant la cinétique de l'induction de l'EMT permettait aussi d'observer tout comme l'évolution de l'expression des gènes, une évolution pulsatile tout en tendant vers une diminution du GP à 0,146 (Figure 2-G). L'explication sous-jacente à cette évolution pulsatile pourrait venir de l'induction de ZEB1 à la doxycycline. En effet, le changement de milieu étant fait tous les deux jours, et la doxycycline ayant un temps de demi-vie à 37°C de 24h, l'activité de ZEB1 induisant la répression des gènes liée à l'identité cellulaire n'est donc pas constante dans le temps. Cependant dans ce type d'induction de l'EMT, nous avons pu noter que les cellules tendaient vers un phénotype plus plastique atteignant beaucoup moins efficacement un phénotype complètement mésenchymateux comme observé avec une induction constitutive de l'EMT-TF. Nous nous sommes alors demandé s'il était possible de se servir de ce modèle pour générer de façon contrôlée un véritable état métastable tel qu'observé a priori dans les lignées Basal-like pouvant par la suite être utilisé pour valider la relation entre plasticité cellulaire et fluidité des membranes.

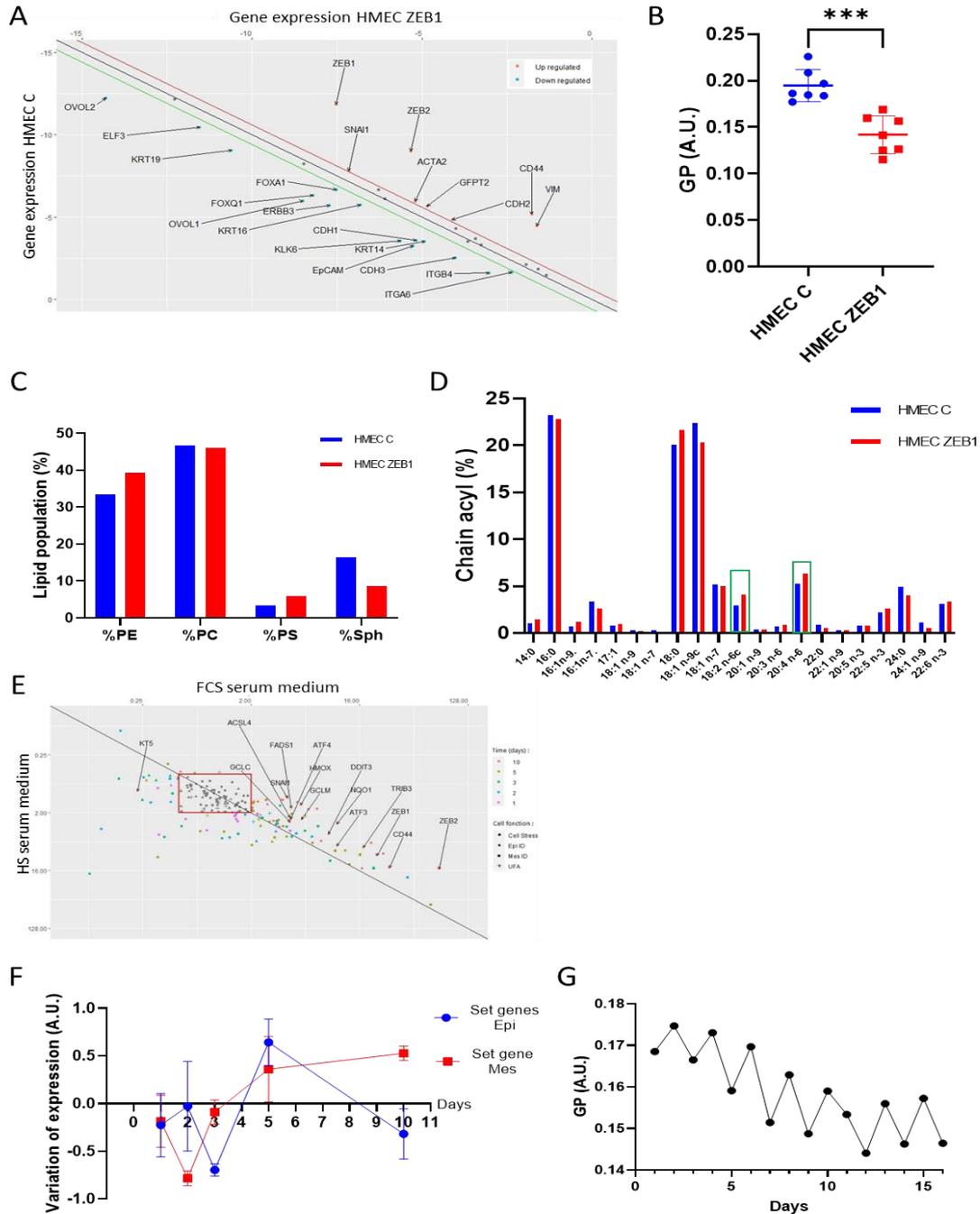


Figure 2 : Suivi de la fluidité membranaire lors de l'induction d'un programme de l'EMT chez les HMEC. **A)** Dot plot représentatif de l'expression d'ARNm des lignées HMEC contrôle vs HMEC ZEB1 induit. La ligne noire, rouge et verte correspondent respectivement, au niveau d'expression identique entre les deux échantillons, une augmentation d'expression d'un fold change de 2 pour les HMEC ZEB1 induit et une augmentation d'expression d'un fold change de 2 pour les HMEC contrôle. **B)** Mesure du paramètre GP par spectrofluorimétrie des cellules indiquées après incubation avec 2 μ M de Dioll pendant 24h, la mesure est effectuée à 37°C. Les données sont moyennées \pm s.d.; n=7 expériences indépendantes par lignées cellulaires. Student's t-test, ***=P < 0.001. **C)** Graphique représentatif de 3 expériences indépendantes de la quantification en % des classes lipidiques indiquées chez les cellules HMEC C et ZEB1 induit. **D)** Graphique représentatif de 3 expériences indépendantes de la quantification en % des chaînes acyles indiquées chez les cellules HMEC C et ZEB1 induit. **E)** Dot plot représentatif de l'expression d'ARNm de l'induction de ZEB1 dans un milieu complétement en SVF ou en HS. La ligne noire correspond au niveau d'expression identique. La couleur des points représente la durée de l'induction et leur forme, la fonction cellulaire du gène. **F)** Variation d'expression d'ARNm de set de gènes correspondant au caractère épithélial (Bleu) ou mésenchymateux (Rouge) pendant la cinétique d'induction. **G)** Mesure du GP des cellules par spectrofluorimétrie tous les 24h durant l'induction de ZEB1. Les cellules sont incubées avec 2 μ M de Dioll pendant 24h avant lecture.

Création d'un modèle métastable mammaire phénotypiquement très plastique permettant l'acquisition de l'ensemble de la hiérarchie mammaire

Même si l'induction de ZEB1 dans le modèle précédent permettait d'engager les cellules HMEC dans un processus d'EMT plus contrôlé, il était évident que sur le long terme, ces cellules faisaient quand même l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux plus proche de ce qui peut s'observer par exemple dans les lignées Claudin-Low, engagées dans des processus de différenciation aberrants, que dans les lignées Basal-like qui maintiennent un statut hybride et conserve en partie leur identité épithéliale. Nous avons alors formulé une hypothèse à partir de nos précédents résultats et de la littérature que le remodelage membranaire et le maintien d'un fort taux de lipides polyinsaturés pouvaient être une des clefs permettant de maintenir les cellules dans un état métastable de grande plasticité. Sur cette base et en utilisant un milieu enrichi en horse sérum, nous avons donc effectué un criblage croisé de plusieurs paramètres hormono-nutritifs dans le but de bloquer les cellules dans un état métastable au cours de leur transition épithélio-mésenchymateuse. Nous avons aussi bien sûr tiré profit du système ZEB1-inductible comme expliqué précédemment. Ce criblage se basait enfin sur des données du laboratoire ayant montré que la réponse aux glucocorticoïdes et un profil plus oxydatif que glycolytique étaient sans doute un autre paramètre biochimique important de ce statut métastable, au moins dans les cellules mammaires. À la suite de ce criblage, nous avons donc optimisé un premier milieu dit « métastable » dans lequel les cellules HMEC pouvaient être maintenues pendant plusieurs semaines dans un état hybride suite à l'induction de ZEB1 par la doxycycline (Figure 3-A). Ce milieu contenait bien sûr du horse sérum, mais aussi des concentrations contrôlées de glucose, glutamine et pyruvate renforçant le métabolisme oxydatif des cellules et de la dexaméthasone pour maintenir une forte activité de la réponse aux glucocorticoïdes. Un aspect très important de cette méthode fut la démonstration que l'ajout de doxycycline n'était plus nécessaire après cinq semaines passées dans ce milieu pour le maintien de cet état métastable. Comme nous le verrons par la suite, une expression endogène de ZEB1 prenait notamment le relais de l'expression du transgène. Plus globalement, en termes d'expression du génome, ces cellules se caractérisaient par une expression différentielle de nombreuses familles de gènes par rapport aux cellules dont elles étaient issues (Figure 3-B) (Tableau 2). En particulier, elles exprimaient notamment de façon simultanée des facteurs de transcriptions et des marqueurs spécifiques des deux lignages luminaux (GATA3, OVOL2 ainsi que MUC1) et basaux (SNAI2 ou FOXC1). Les facteurs de transcription impliqués dans les phases précoces du programme de l'EMT étaient aussi surexprimés dans ces cellules (ZEB1, ZEB2, TWIST1) tandis que certains marqueurs épithéliaux restaient fortement exprimés (EPCAM), malgré l'engagement de la cellule dans un processus de transdifférenciation mésenchymateuse (CDH2, VIM). Finalement, élément déterminant de la nature très plastique de ces cellules, des gènes codant les facteurs normalement associés aux cellules totipotentes embryonnaires étaient fortement réactivés dans ces cellules métastables, notamment NANOG, OCT4, TCF4, et TOPO2A²⁵⁻²⁷.

En terme métabolique et biochimique ensuite, ces cellules présentaient une plus forte expression des gènes impliqués dans le contrôle de l'incorporation des lipides extracellulaire avec notamment une augmentation de l'activité des gènes PPARG, PPARA, LDLR et aussi

FABP4, ce dernier codant une protéine importante pour la protection des acides gras polyinsaturés libres contre le stress oxydant. De manière moins prononcée, ces cellules exprimaient aussi plus fortement le gène ACSL4. Ainsi, les systèmes de transport, de protection et d'incorporation des acides gras polyinsaturés semblaient tous activés dans ces cellules HMEC rendues métastables. Un autre aspect transcriptomique intéressant était lié au métabolisme du fer et aux réponses antioxydantes. La ferroptose, comme son nom l'indique, est non seulement sensible à la quantité intracellulaire de lipides polyinsaturés, mais aussi au métabolisme du fer et aux protections antioxydantes contre la réaction de Fenton. Il était alors tout à fait remarquable de noter que le programme antioxydant (NQO1, SOD1, SOD2) contrôlé par le facteur de transcription NRF2 (encodé par NFE2L2) était fortement activé dans ces cellules métastables, tout comme les gènes associés à l'homéostasie du fer et à la protection contre la ferroptose (AIFM2, GCH1, SLC2A3, FTH1 et FTL). Ces deux mécanismes, en plus de protéger la cellule contre la ferroptose lorsque celle-ci contient des niveaux importants de PUFA, ont été en parallèle associés au phénotype des progéniteurs mammaires multipotents²⁸. Aussi les gènes de contrôle de l'homéostasie du réticulum endoplasmique (ATF4, ATF3, PDIA4, PDIA6) étaient plus fortement activés dans ces cellules en lien potentiellement avec les modifications biophysiques des membranes le constituant. Finalement, le contrôle du métabolisme du cholestérol semblait aussi modifié. L'expression du principal facteur contrôlant ce métabolisme était augmentée (SREBF2), tout comme de nombreuses enzymes clefs de sa synthèse (HMGCR, FDFT1, SQLE) ou de son export (ABCA1) ouvrant la possibilité que dans ces conditions, une activité de cette voie soit nécessaire par exemple en vue de produire suffisamment de CoQ¹⁰ ou de précurseurs de prénylation, tout en limitant l'incorporation de cholestérol dans les membranes grâce à son export.

Ces données transcriptomiques pointaient clairement le positionnement de ces cellules dans un état métastable. Cependant, des confirmations fonctionnelles étaient nécessaires pour valider ce statut. En particulier, cet état métastable est par essence un équilibre précaire où la cellule peut facilement être réorientée dans une nouvelle direction phénotypique. Allant dans ce sens, nous avons pu mettre en évidence des phénomènes de reprogrammation phénotypique aléatoires quand ces cellules étaient replacées dans un milieu conventionnel. L'analyse par immunomarquage a mis en évidence l'acquisition de phénotypes aléatoirement plus lumineux (Faible et forte expression des kératines 5 et 7), ou plus basaux (Forte et faible expression des kératines 5 et 7), voire même des traits mésenchymateux accentués (kératine 5 faible, et N-cadhérine élevée (CDH2)) (Figure 3-C). Fort de ces premières observations, nous avons ensuite essayé de montrer que ces cellules répondaient mieux à l'induction des mécanismes de différenciation contrôlant normalement la hiérarchie mammaire. Pour cela, nous avons notamment mesuré l'expression de marqueur de surface spécifique des différentes populations différenciées, mais aussi des cellules mammaires plus primitives bipotentes. Tandis que les cellules HMEC initiales sont caractérisées par un profil de marqueurs de surfaces EpCAM⁺/CD44⁻/CD49f⁺, les cellules métastables sont EpCAM⁻/CD44⁺/CD49f⁺ (Figure 3-D 1 et 2). La double positivité des marqueurs CD44 et CD49f est intéressante, car elle est justement associée au statut hybride des cellules métastables, telle que retrouvée *in vivo* dans les cellules mammaires bipotentes²⁹. Lors de leur sortie du milieu métastable, ces cellules

dérivent spontanément en trois populations. L'une correspondant à cette même lignée métastable $\text{EpCAM}^-/\text{CD44}^+/\text{CD49f}^+$, l'une à des HMEC contrôles au statut de progéniteurs luminaux $\text{EpCAM}^+/\text{CD44}^-/\text{CD49f}^+$, et enfin une troisième population perdant le CD49f, $\text{EpCAM}^-/\text{CD44}^+/\text{CD49f}^-$ (Figure 3-D 3) caractéristique des cellules effectuant une EMT complète et adoptant un phénotype de fibroblaste. Grâce au suivi de ces marqueurs, nous avons pu ensuite optimiser deux protocoles de différenciation, l'un luminal, l'autre myoépithéliale pour valider la nouvelle bipotence de ces cellules rendues métastables. Concernant la différenciation luminal, nous avons tout d'abord pu montrer que la privation de réponse aux glucocorticoïdes favorisait l'émergence de ces cellules lors de leur remise en culture en milieu conventionnel (Figure 3-D 4). Le protocole pour la différenciation myoépithéliale reposait quant à lui sur une primo-induction de la composante mésenchymateuse par traitement au TGF β (10 ng.mL⁻¹) et à l'Oncostatin M (OSM) (50 ng.mL⁻¹) pendant 3 jours suivi d'un traitement à l'All Trans Retinoic Acid (ATRA) (1 μM) plus du Ribitol (10 mM). Le TGF β par son augmentation de l'expression de SNAIL permet de conduire les cellules métastables sur la voie d'une différenciation mésenchymateuse^{30,31} tandis que l'OSM permet quant à lui de diminuer la mise en place de la différenciation épithéliale³². Concernant ensuite l'ATRA et le Ribitol, ils ont pour but d'agir respectivement comme des agents pro-différenciant^{33,34} et d'attachement à la lame basale soutenant normalement les cellules myoépithéliales par l'augmentation d'expression des matriglycanes³⁵. Suite à cette combinaison de traitement, des cellules présentant les caractéristiques des cellules myoépithéliales sont obtenues, notamment des marqueurs de surface de type $\text{EpCAM}_{\text{medium}}/\text{CD44}^+/\text{CD49f}^-$ (Figure 3-D 5). Dernier élément concernant ces protocoles, nous avons pu vérifier que seules les cellules métastables étaient capables d'y répondre positivement, le phénotype des cellules HMEC d'origine étant complètement insensible à ces signaux de remodelage phénotypique confirmant leur absence de plasticité.

Suite à cette première validation fonctionnelle de ces modèles, nous avons réalisé de nouvelles analyses transcriptomiques visant à vérifier l'induction des programmes génétiques spécifiques de chaque type de différenciation, tout en analysant le maintien ou non des réponses précédemment observé dans les cellules maintenues dans un état métastable (Tableau 3 et 4). Nous avons tout d'abord validé l'activation du programme luminal avec le premier protocole de différenciation en observant notamment l'activation du gène codant le récepteur aux œstrogènes (ESR1), complètement réprimé dans les cellules métastables, mais aussi les cellules HMEC d'origine (Figure 3-E et F). Cette identité luminale était d'autre part clairement confirmée par l'activation des principaux régulateurs et marqueurs de ce statut (OVOL1, FOXA1, ELF3, ERBB3, KRT19, KRT8). De la même façon, des gènes spécifiquement associés au statut myoépithélial et moins activés lors d'un phénotype purement mésenchymateux étaient fortement induits au cours de la différenciation myoépithéliale (OXTR, CNN1, ACTA2, CD10, KRT17) (Figure 3-G). OXTR codant le récepteur à l'ocytocine est notamment très spécifique des cellules myoépithéliales. À l'inverse ensuite, les gènes caractérisant le statut métastable et sa composante mésenchymateuse étaient tous diminués (CD44, TWIST1, ZEB1 et ZEB2) indépendamment du protocole de différenciation utilisé, alors que des facteurs associés au statut partiellement mésenchymateux

des cellules myoépithéliales (SNAI1, SNAI2) voyaient leur expression augmenter spécifiquement avec le protocole dédié à faire émerger ces cellules.

En terme métabolique ensuite, les caractéristiques génétiques de cellules métastables observées dans les analyses précédentes étaient fortement atténuées après la mise en place de ces programmes de différenciation, en particulier pour le gène ACSL4. Les réponses de stress du réticulum endoplasmique étaient-elles aussi diminuées tout particulièrement au niveau de l'induction des gènes ATF4 et PDIA6. De façon similaire, les réponses antiferroptose et antioxydante étaient elles aussi moins activées, au moins en terme transcriptomique (AIFM2, SLC7A11, GCH1 et NFE2L2 et NQO1). Enfin l'ensemble des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol était diminué, en particulier le transporteur ABCA1. En conclusion, il était donc frappant de noter que l'ensemble des mécanismes favorisant une plus grande fluidité membranaire et une homéostasie associée à cette caractéristique semblait bien diminués lors de la mise en place d'une différenciation faisant sortir la cellule de son état métastable tout en réduisant a priori sa plasticité.

De façon intuitive, nous sommes donc demandés si la fluidité des membranes de notre modèle métastable et de ses différents dérivés s'accordait bien avec leur statut tel que défini dans nos expériences précédentes. Les cellules métastables présentaient un GP très diminué en comparaison des cellules HMEC contrôles et possédaient donc une fluidité membranaire plus importante que les cellules contrôles. À l'inverse, la réacquisition d'une identité cellulaire se traduisait de façon systématique par une augmentation du GP, donc d'une diminution de la fluidité membranaire que ce soit pour les progéniteurs myoépithéliaux ou luminaux (Figure 3-H). Ces résultats confirmaient donc que la modulation de l'identité cellulaire et donc de la plasticité cellulaire s'accompagnait d'une modification de la fluidité membranaire globale des cellules. D'autre part, l'analyse par microscopie confocale des cellules HMEC contrôles et de métastables a mis en évidence une augmentation spécifique de la fluidité membranaire au niveau de la membrane plasmique (Figure 3-I) et une accumulation de membrane endoplasmique, celle-ci étant globalement plus fluides de façon générale que les membranes plasmiques. Les HMEC présentaient ainsi un GP médian au niveau de leur membrane plasmique de 0,1218 A.U, alors que les cellules métastables avaient quant à elles un GP médian de -0,1674 A.U. Ces résultats renforçaient les mesures effectuées par spectrofluorimétrie décomposant les différences observées en une plus forte fluidité intrinsèque de la membrane plasmique dans les cellules métastables, mais aussi en une augmentation du ratio endomembrane/membrane plasmique, conférant là aussi une fluidité globale plus importante à l'échelle de la cellule. Finalement, le résultat associé à la membrane plasmique pouvait être corrélé à l'expression du transporteur ABCA1 au sein des cellules métastables, son augmentation se traduisant par une augmentation de l'efflux du cholestérol l'empêchant alors d'augmenter la rigidité de la membrane.

Finalement, afin d'évaluer la pertinence de ces résultats pour la susceptibilité de ces cellules aux processus de transformation néoplasique et à l'agressivité des tumeurs qui pourraient être induites à partir de ces différents modèles, nous avons vérifié par un test fonctionnel si la perte ou l'acquisition d'une identité cellulaire modulait la résistance au stress oncogénique. Il est notamment décrit que la plasticité cellulaire favorise le processus de transformation

néoplasique en limitant les stress homéostatiques induits par l'activité de l'oncogène³⁶. Pour réaliser ces expériences, nous avons profité d'un autre transgène inductible par le 4-hydroxytamoxifène (OHT), lui aussi présent dans ces modèles et codant l'oncogène H-RAS mutée en G12V. Suite à l'induction de l'expression d'H-RAS^{G12V}, la prolifération des cellules HMEC originelles était fortement altérée par le stress oncogénique (Figure 3-J). À l'inverse, la prolifération des cellules métastables était plus importante après expression de l'oncogène, indiquant que ces cellules s'adaptaient parfaitement à cette nouvelle condition homéostatique nécessitant normalement une plus forte activation des mécanismes biosynthétiques. Finalement, la réacquisition d'une identité cellulaire, indépendamment de la nature de cette identité, était corrélée à une diminution de la résistance au stress oncogénique, se traduisant par une prolifération diminuée, un effet particulièrement fort après une différenciation luminale. Ces résultats suggéraient donc qu'en accord avec nos hypothèses introduites au début de ce manuscrit de thèse, l'absence de cadre métabolique rigide, caractéristique des cellules les plus plastiques et associées à un état métastable, favorise les processus de transformation néoplasique et la future plus grande agressivité des tumeurs obtenues par un tel procédé.

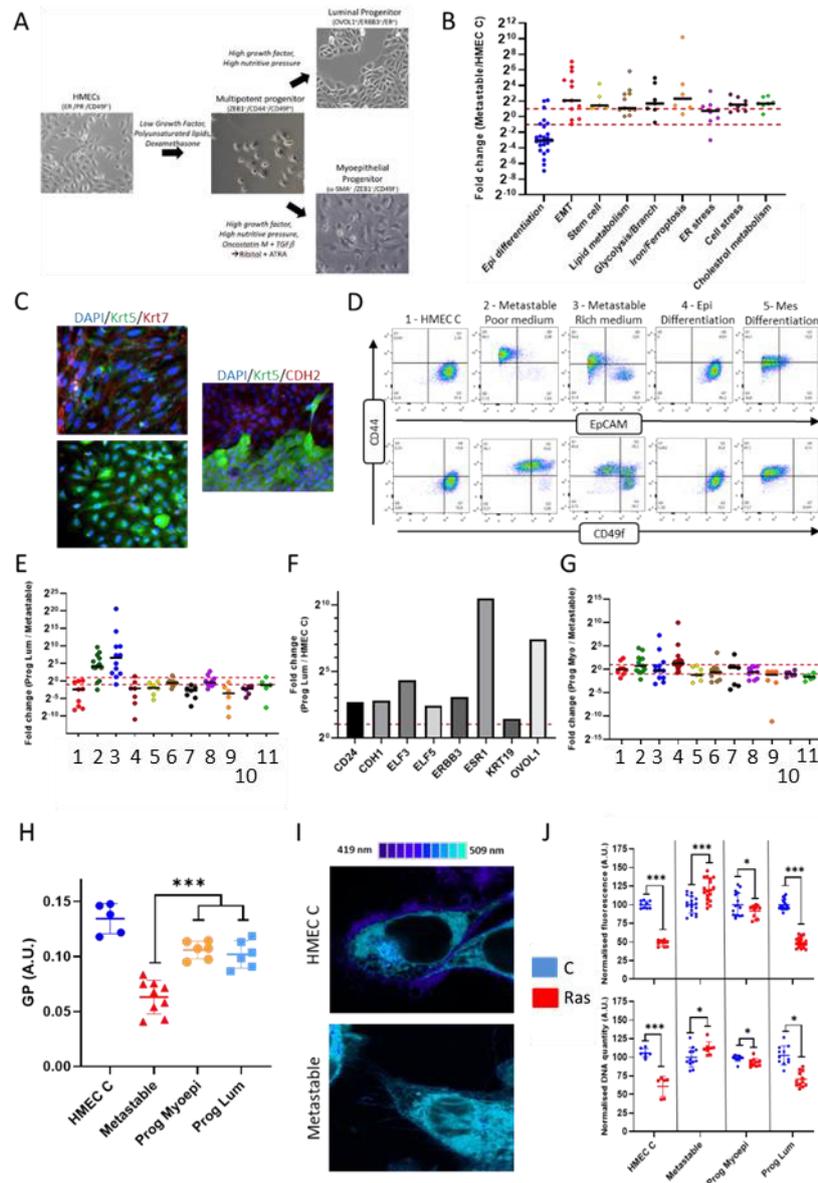


Figure 3 : Caractérisation de la lignée métastable et la reconstitution de la hiérarchie mammaire. **A)** Schéma récapitulatif de notre modèle de cellules métastables. **B)** Fold change d'expression d'ARNm des métastables versus les HMEC contrôle. Les groupes de gènes sont regroupés en lien avec leur fonction cellulaire. La médiane des fold change d'un groupe fonctionnel est calculée et représentée en noir. Les lignes en pointillées représente un fold change de 2^1 et de 2^{-1} . **C)** Immunofluorescence des marqueurs indiqués des métastables après différenciation spontanée. **D)** Dot plots représentatifs d'analyse en cytométrie en flux du modèle après marquage par des anticorps anti CD44, CD24 et CD49f. **E)** Fold change d'expression d'ARNm des Prog Lum versus Métastable. Les groupes de gènes sont regroupés en lien avec leur fonction cellulaire (1=EMT, 2=Différenciation, 3=Luminale, 4=Myoépithéliale, 5=Stem, 6=Métabo des lipides, 7=Glycolyse, 8=Stress de RE, 9=Métabo du fer, 10=Stress cellulaire et 11=Métabo du cholestérol). La médiane des fold change d'un groupe fonctionnel est calculée et représentée en noir. Les lignes en pointillées représente un fold change de 2^1 et de 2^{-1} . **F)** Fold change d'expression d'ARNm des gènes indiqués des Prog Lum versus HMEC C. **G)** Fold change d'expression d'ARNm des Prog Myoépi versus Métastable. Les groupes de gènes sont regroupés en lien avec leur fonction cellulaire. La médiane des fold change d'un groupe fonctionnelle est calculée et représentée en noir. Les lignes en pointillées représente un fold change de 2^1 et de 2^{-1} . **H)** Mesure du paramètre GP au ClarioStar® des cellules indiquées après incubation avec $2 \mu\text{M}$ de Dioll pendant 24h, la mesure est effectuée à 37°C . Les données sont moyennées \pm s.d.; $n=7$ expériences indépendantes par lignées cellulaires. Student's t-test, $***=P < 0.001$. **I)** Images représentatives des cellules indiquées après incubation avec $2 \mu\text{M}$ de Dioll pendant 24h, la mesure est effectuée à 37°C , permettant la mesure du GP de la membrane plasmique. **J)** Mesure de la prolifération cellulaire par un test résazurine (haut) ou par un dosage d'ADN (bas), l'intensité et la quantité mesurée sont ensuite normalisées en fonction du contrôle de chaque lignée. Les données sont moyennées \pm s.d.; $n>6$ expériences indépendantes. Student's t-test, $*=P<0.05$, $**=P<0.01$, $***=P < 0.001$.

Discussion :

La plasticité cellulaire est un mécanisme extrêmement important pour le renouvellement et la régénération de nos tissus. Au niveau mammaire, elle permet notamment de répondre aux contraintes de l'allaitement à chaque nouvelle grossesse en engageant le tissu dans un remodelage très profond. Cette plasticité est normalement finement contrôlée et son altération constitue un moteur très puissant soutenant les processus tumorigéniques, en particulier dans les tumeurs les plus agressives. Nous avons vérifié dans cette étude que les lignées cellulaires Basal-like représentant un sous-type de cellules cancéreuses particulièrement agressives, à l'identité profondément altérée, présentaient des caractéristiques fonctionnelles souvent associées à une plus grande plasticité cellulaire comme une sensibilité au mécanisme de ferroptose. Sur cette base, et des travaux issus de la littérature ayant mis en évidence une plus grande proportion de PUFA dans les cellules les plus tumorigéniques, nous avons émis l'hypothèse que la fluidité membranaire de ces lignées soit particulièrement augmentée en comparaison de celle de lignées luminales ayant mieux conservé leur identité initiale. D'autre part, les lignées cellulaires de sous-type Claudin-low avaient elles aussi une fluidité membranaire moins importante même par rapport à des lignées luminales. En lumière des données de la littérature ayant démontré que ces tumeurs pouvaient provenir d'un progéniteur mammaire extrêmement précoce et bipotent, ces résultats pouvaient sembler être en contradiction avec un concept reliant la plasticité cellulaire à une plus grande fluidité membranaire. Cependant, il faut noter que ces tumeurs sont couramment métaplasiques et constituées d'une juxtaposition de cellules cancéreuses engagées dans des processus de différenciation aberrante (fibroblastiques, cartilagineux, osseux, etc.). Ainsi, à la différence des tumeurs Basal-like, l'état plastique de la cellule d'origine à ces tumeurs serait un phénomène très transitoire suivi d'un processus de différenciation conduisant la cellule à acquérir une nouvelle identité expliquant la rigidification de ses membranes. Ce modèle est notamment conforté par une autre étude basée sur l'analyse *in vitro* de la fluidité membranaire de la membrane plasmique, par le Laurdan en microscopie confocale, montrant notamment que les cellules MCF7 (Luminal) possèdent un GP plus faible que celui des MDA-MB-231 (Claudin-low). D'autre part, la mise en culture de ces lignées cancéreuses avec les « Cancer associated fibroblast : CAF » se traduit par une augmentation de la plasticité cellulaire à laquelle est associée une élévation de la fluidité membranaire de la membrane plasmique dans les deux types cellulaires³⁷. Ces résultats confortent ainsi nos propres observations aussi bien dans les lignées cancéreuses que dans notre modèle métastable où une augmentation de la fluidité de la membrane plasmique est observée lors du gain de plasticité de ces cellules. Un autre élément intéressant de discussion sur ces aspects concerne la méthodologie utilisée pour maintenir les cellules en culture et les comparer entre-elles. Nos lignées sont maintenues dans un milieu relativement physiologique appauvri en nutriment en comparaison des milieux extrêmement riches utilisés classiquement *in vitro*. Il est possible que ces milieux favorisent le mécanisme de différenciation des lignées Claudin-low augmentant d'autant la rigidité de leurs membranes. Ce type de mécanisme s'est déjà observé dans les lignées mammaires où des modulations nutritives influent sur l'identité cellulaire³⁸. Les mesures de résistance à la ferroptose soutiennent aussi le caractère différencié des lignées Claudn-Low en démontrant leur très forte capacité à survivre à ce processus de mort cellulaire programmée^{39,40}. Enfin,

nous avons pu noter l'existence d'une phase d'adaptation des lignées Claudin-low aux nouvelles conditions nutritives induisant une forme de sélection. Cette sélection pourrait favoriser l'émergence de cellules plus différenciées, aux caractères mésenchymateux plus affirmés en accord avec le modèle précédent. Enfin, ces premiers résultats ouvrent la porte à une analyse plus globale visant à mieux caractériser les liens entre plasticité cellulaire, sensibilité à la ferroptose et potentiel tumorigénique en lien avec une forte fluidité membranaire. Parmi les pistes à suivre, il serait notamment intéressant d'analyser la sensibilité à la ferroptose, non par des inhibiteurs des mécanismes de protection contre cette mort cellulaire, mais par des inducteurs plus directs activant la peroxydation des lipides. Aussi, afin de renforcer les liens précités, il serait intéressant de quantifier plus directement les mécanismes biochimiques témoins du processus de ferroptose et de la plus grande fluidité des membranes comme le dosage du malondialdéhyde issu de la peroxydation des lipides⁴¹ ou encore mesurer la quantité de lipides polyinsaturés par spectrométrie de masse dans ces différents sous-types de lignées cancéreuses. Enfin, un test fonctionnel du pouvoir tumorigénique des différentes lignées permettrait de confirmer le lien entre plasticité, fluidité membranaire et potentiel tumorigénique. En effet, l'une des caractéristiques admises des cellules cancéreuses les plus plastiques est leur capacité à initier une tumeur. Il serait donc envisageable de mesurer le pouvoir tumorigénique de nos lignées par des tests *in vitro* de type « colony forming assay » et par des tests *in vivo* via des injections de ces cellules cancéreuses au niveau du coussinet graisseux de la glande mammaire de souris immunodéprimées de type « nude ».

La seconde partie de nos travaux se proposaient ensuite de valider dans un modèle reconstitué de hiérarchie mammaire le concept reliant la plasticité cellulaire à une plus grande fluidité des membranes. Points majeurs de ce modèle, nous avons pu générer pour la première fois en 2D par des manipulations purement effectuées *in vitro* une cellule présentant toutes les caractéristiques d'un progéniteur bipotent maintenu pendant plusieurs mois dans un état métastable. Nous avons pu valider une nouvelle fois dans ce modèle non oncogénique le lien entre plasticité cellulaire et fluidité membranaire tout en montrant que les processus de différenciation mammaire s'accompagnaient systématiquement d'une rigidification des membranes. Concernant cette différenciation, nous avons présenté ici les résultats associés uniquement à l'engagement des cellules métastable dans les branches luminales ou myoépithéliales. Cependant, des stratégies de modulation du milieu hormono-nutritif sont en cours d'analyse et d'optimisation au sein de l'équipe dans le but de pousser cette différenciation vers des stades terminaux. La différenciation luminale ductale est notamment basée sur l'utilisation d'un milieu enrichi en acides aminés et en FGF, couplé à un cocktail hormonal proluminal à base d'œstradiol et d'hydrocortisone⁴². Concernant la différenciation, l'allongement du temps de traitement au ribitol et à l'ATRA semble favoriser une augmentation des caractères myoépithéliaux, mesurés notamment par la capacité de la cellule à répondre à une stimulation à l'ocytocine, cette même hormone renforçant le caractère myoépithélial de ces cellules⁴³. L'intérêt de ces stratégies serait leur capacité à démontrer que le lien entre plasticité et fluidité membranaire pourrait être conçu comme un continuum mesurable et quantifiable. Finalement, il est important concernant ce modèle de se pencher sur les résultats associés à la résistance au stress oncogénique. Ce test constitue un des marqueurs

de plasticité cellulaire dans un cadre oncogénique. Cependant, un test *in vivo* permettrait de renforcer ces résultats, en mesurant la capacité de ces cellules à induire une tumeur suite à l'apparition d'une lésion oncogénique, mais aussi en analysant les composantes phénotypiques et les sous-types moléculaires associés à ces tumeurs. Plusieurs éléments pourraient être plus particulièrement analysés. Le premier vérifierait tout d'abord qu'un seul hit oncogénique est suffisant à l'obtention d'une tumeur dans le modèle métastable alors que plusieurs seraient nécessaires dans les progéniteurs issus de ces métastables comme ce qu'il s'observe dans les cellules HMEC⁴⁴. Des analyses, du PAM50 permettant de classifier les tumeurs, pourraient être effectuées afin d'observer possiblement une plus grande variété de sous-types moléculaire dans les tumeurs formées à partir de la lignée métastable. Enfin, en lien avec leur plasticité, il serait intéressant de vérifier si ces cellules métastables auraient une capacité d'adaptation à des environnements tissulaires variés leur permettant de former des tumeurs en dehors de la glande mammaire.

Pour conclure cette discussion, il est intéressant d'analyser et de mettre en perspective les résultats obtenus en termes de profil transcriptomique, notamment ceux expliquant vraisemblablement la plus grande fluidité des membranes des cellules les plus plastiques. Le gène ACSL4 est notamment augmenté tout comme le gène SCD au sein des métastables qui sont au contraire diminués lors de la mise en place d'un programme génétique de différenciation qu'il soit luminal ou myoépithélial. En conséquence, il est vraisemblable que les niveaux d'acide gras mono- et poly- insaturés soient directement affectés par la plasticité cellulaire et la mise en place des identités cellulaires. Les gènes impliqués dans la voie de synthèse du mévalonate et la synthèse du cholestérol sont d'autre part aussi augmentés dans les cellules métastables. Ce résultat pouvait sembler surprenant puisque le cholestérol tend à rigidifier les membranes, cependant l'augmentation parallèle de l'expression du gène codant le transporteur à efflux du cholestérol ABCA1 peut permettre d'apporter un début d'explication à ce paradoxe. L'activation de la voie de synthèse du cholestérol ne serait pas associée à une plus grande incorporation de ce dernier dans les membranes, mais permettrait de maintenir des processus biochimiques déterminant pour le maintien de la plasticité cellulaire, processus prenant leur source dans cette voie métabolique de synthèse du cholestérol. Parmi les métabolites produits à partir de cette voie de synthèse du mévalonate, géranylgeranyl-PP est particulièrement intéressant puisqu'il permet de maintenir l'activité des facteurs YAP/TAZ, des régulateurs clefs de la plasticité cellulaire et des processus régénératifs associés aux épithéliums^{45,46}. De façon similaire, la synthèse du CoQ10 prend sa source dans celle du mévalonate, ce coenzyme permettant secondairement de protéger la cellule contre la peroxydation des lipides grâce à la protéine FSP1 (AIFM2)^{47,48}. Les hypothèses formulées ici à propos de ces régulations sont d'autre part complémentaires à des concepts émergents de la littérature récente, notamment celle associée au processus d'EMT. La répression de la voie de synthèse du cholestérol par CtBP/ZEB1 permettant le maintien de l'activité de TGFβ serait ainsi un autre exemple du lien entre diminution de l'incorporation membranaire du cholestérol et engagement d'un processus de plasticité cellulaire¹⁶. Des travaux allant dans ce sens ont aussi été rapportés à partir de modèle pancréatique où là aussi, une diminution de la synthèse du cholestérol associée à une augmentation de l'activité des facteurs SREBP1 favorise l'activation du TGFβ, une EMT partielle et l'obtention d'un

phénotype plus agressif. Point intéressant, l'analyse de coupe histologique de patients traités par des statines, des inhibiteurs de la voie du mévalonate, a mis en évidence une augmentation de cellules ayant subi un processus d'EMT partiel⁴⁹. Concernant le transporteur ABCA1 ensuite, d'autres études ont aussi rapporté sa plus grande expression dans les tumeurs du sein triples négatives, tumeurs associées au phénotype Basal-like⁵⁰. À l'inverse, l'inhibition du transporteur ABCA1 a pu être associée à une diminution de la plasticité cellulaire, une inhibition des processus d'EMT et un plus faible potentiel métastatique¹⁵. Le dernier point maintenant concernant le métabolisme lipidique concerne le manque d'information relative sur les gènes et le métabolisme associé aux sphingolipides bien que ceux-ci jouent un rôle important sur la fluidité membranaire, notamment celle de la membrane plasmique. Nous avons cependant quelques éléments de réponse comme la diminution de la quantité de sphingolipides mesurée par l'analyse de type lipidomique des cellules induite en EMT par expression ectopique de ZEB1. Des données de la littérature sont en accord avec ces résultats montrant notamment la diminution de l'expression de la ceramide synthase 6 (CERS6) lors de la mise en place de ce même programme d'EMT auquel est associée une diminution de la fluidité membranaire de la membrane plasmique⁵¹. Une analyse lipidomique complète de nos modèles, centrée uniquement sur les lipides membranaires et excluant les gouttelettes lipidiques⁵², serait ainsi tout à fait pertinente pour valider le rôle joué par les différentes espèces de lipides dans ces mécanismes de modulation de la fluidité membranaire en lien avec les niveaux de plasticité cellulaire ou le statut métastable

Matériels et Méthodes :

Culture cellulaire :

Les lignées cancéreuses mammaires (MCF7, ZR75-1, HCC1954, HCC1937, BT20, MDA-MB-231 et HS578T) et les cellules épithéliales mammaires humaines (HMEC) proviennent de chez ATCC et Lonza. Les cellules sont mises en culture à 37°C et 5% CO₂. Les lignées cancéreuses ont été adaptées et maintenues dans du Minimum essential medium (MEM) (Gibco) complété avec 5% SVF (Gibco), 91 U.mL⁻¹ pénicilline-streptomycine (P/S) (Gibco), 10 ng.mL⁻¹ human epidermal growth factor (EGF) (Promocell) et 262 mU.mL⁻¹ insuline (NovoRapid). Les HMEC sont maintenues dans du 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/HAMF12 medium (Gibco) complété avec 10% SVF (Gibco), 91 U.mL⁻¹ pénicilline-streptomycine (P/S) (Gibco), 10 ng.mL⁻¹ human epidermal growth factor (EGF) (Promocell), 262 mU.mL⁻¹ insuline (NovoRapid) et 0,5 µg.ml⁻¹ hydrocortisone (Sigma). Les cellules progénitrices luminales et myoépithéliales sont maintenues dans le même milieu que les cellules HMEC.

L'induction de l'EMT dans la lignée HCC1954 est effectuée par un traitement au TGFβ (10 ng.mL⁻¹) (Preprotech)

Induction du programme de l'EMT et induction d'un phénotype métastable :

L'induction de l'expression de ZEB1 chez les HMEC est effectuée par un traitement de 10 µM de doxycycline (Sigma). Pour l'obtention d'un phénotype métastable, l'expression de

ZEB1 est induite pendant 2 semaines dans le milieu DMEM/F12 des HMEC, puis 5 semaines dans du milieu métastable : DMEM no glucose, no glutamine, no pyruvate complétement avec 5% HS (Gibco), 6 mM de glucose (Sigma), 0.25 mM GlutaMAX™ (Gibco), 2 mM pyruvate (Gibco), 91 U.mL⁻¹ pénicilline-streptomycine (P/S) (Gibco), 10 ng.mL⁻¹ human epidermal growth factor (EGF) (Promocell), 262 mU.mL⁻¹ insuline (NovoRapid), 0,5 µg.mL⁻¹ hydrocortisone (Sigma) et 200 nM dexaméthasone (Sigma). Après ces 7 semaines d'induction, les cellules sont maintenues dans du milieu métastable.

Analyse de la sensibilité à l'inhibition des mécanismes anti-ferroptose :

Les cellules sont mises en culture dans une plaque 6 puits (100 000 cellules/puits). Le lendemain les cellules sont traitées avec les différents inhibiteurs des mécanismes anti-ferroptoses ou avec le solvant des composants comme contrôle : DMSO (Sigma), 0.5 µM RSL3 (MedChemExpress), 5 µM iFSP (MedChemExpress), et 1 µM FIN56 (MedChemExpress) pendant 24h. La viabilité cellulaire est ensuite mesurée par un test à la résazurine.

Analyse de la prolifération cellulaire :

La viabilité cellulaire est effectuée par un test à la résazurine. Le milieu des cellules est retiré, suivi d'un lavage au PBS préchauffé à 37°C des cellules. Les cellules sont ensuite incubées avec 2 mL de 120 µM de résazurine (Sigma), stérile, dilué dans du Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco) complétement avec 6 mM de glucose et 5% de SVF et préchauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C et 5% CO₂ pendant 40min dans le noir. Trois fois 200 µL sont ensuite récupérés par conditions, déposés dans une plaque 96 puits noire, et lu par détection de la fluorescence de la résazurine par lecteur de plaque ClarioStar® (BMGlabtech) Ex = 540/20 et Em = 590/20.

La quantification cellulaire est effectuée par quantification de l'ADN. Les cellules sont lysées grâce à un tampon RIPA contenant 0.5% de dodécylsulfate de sodium. Le lysa cellulaire est ensuite chauffé à 95°C pendant 10min et la quantité d'ADN présent est mesurée par fluorescence au lecteur de plaque ClarioStar® à l'aide du kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega).

Mesure de la fluidité membranaire par spectrofluorimétrie :

Les cellules sont mises en culture à la même confluence et incubées avec 2 µM de DiIol pendant 24h. A la fin du temps d'incubation, les cellules sont récupérées et dissociées par traitement à la trypsine, qui est ensuite enlevée par centrifugation (300 g, 4 min à 4°C). Les cellules ont été analysées soit par spectrofluorimétrie (Jasco FP-8500™, ex=390nm/em=400-600nm), soit les cellules sont resuspendues dans leur milieu et déposées dans une plaque noire 96 puits et analysées par le lecteur de plaque ClarioStar® (BMGlabtech) en spectral scan mode (ex=380-400nm/em=400-600nm). Le calcul du GP est effectué sous le logiciel Excel :

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

Puis représenté graphiquement avec le logiciel GraphPad Prism.

Quantification d'expression de l'ARNm :

L'ARNm est extrait à partir d'un million de cellules grâce au kit (Qiagen™ RNeasy Kits), puis 1 µg d'ARNm est utilisé pour effectuer une transcription inverse (SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit). «Real-time PCR intron-spanning assays» est réalisé avec le SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad). La quantification relative de l'expression des gènes est réalisée par la méthode de comparaison des Ct, grâce à une normalisation des gènes cibles avec le gène ménagé endogène *36B4* (RPLP0 – Ribosomal protein large P0). L'analyse comparative des gènes avec le contrôle s'effectue de la manière suivante : le deltaCt obtenue par normalisation du contrôle est soustrait par le deltaCt d'une des conditions permettant l'obtention d'un fold change d'expression du gène. L'ensemble des valeurs obtenues pour chaque gène sont moyennées, puis transformées en Log2. L'ensemble des calculs sont effectués sous le logiciel Excel puis les résultats sont mis en forme graphiquement avec le logiciel GraphPad Prism ou par R-software ((v3.2.2), package ggplot2, ggrepel et grid.

La variation d'ensemble de gènes au cours du temps est calculée de la manière suivante : le deltaCt de chaque gène est calculé pour chaque temps. L'expression de chaque gène est ensuite normalisée avec le minimum et le maximum d'expression sur l'ensemble de la cinétique attribuant une valeur d'expression entre -1 (expression minimum) et +1 (expression maximum). L'ensemble des variations des gènes d'un groupe sont ensuite moyennées pour chaque temps.

Analyse lipidomique :

Les lipides sont extraits à partir de culot cellulaire grâce à la méthode de Folch (FOLCH et al., 1951). Les différentes classes lipidiques sont séparées par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice (Merck 5721, Germany). La révélation s'est effectuée par pulvérisation de bleu de bromophénol et les bandes de chaque espèce sont grattées de la plaque. Les lipides sont ensuite saponifiés et transméthylés avec du sodium methylate. Les méthyl esters sont extraits grâce à de l'hexane et analysés par chromatographie en phase liquide et en phase gazeuse. La chromatographie en phase gazeuse Trace/ULTRA GC (Thermo Separation Products) équipé avec une colonne capillaire en silice fondue CP-SIL (25 m x 0.25 mm internal diameter) « coaté » avec 100% de cyanopropyl siloxane. L'identification individuelle des composants méthyl ester sont effectuées par comparaison avec le temps de rétention des standards. Les résultats sont donnés en abondance relative des acides gras individuels (en %).

Immunofluorescence :

Les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde (Sigma), puis après lavage, traitées avec du tampon PBS (Gibco), 0.3% de Triton X100 (Sigma). Suite à un second lavage, les sites non spécifiques sont saturés avec du tampon PBS, 5% de BSA (Sigma). Après lavage, le marquage par les anticorps primaires s'effectue pendant une nuit à 4°C dans le noir, l'Ac de souris anti-KRT7 et l'Ac de rat anti-KRT5 (SantaCruz) ont été dilués au 1/100 et l'Ac de souris anti-CDH2 (Abcam) a été dilué au 1/500 dans un tampon PBS, 0.5 % BSA et 0.1% Triton X100. Après lavage, le marquage par les anticorps secondaires s'effectue pendant 1h à 37°C, l'Ac de chèvre anti-rat couplé à l'AlexaFluor 488 et l'Ac de chèvre anti-souris couplée à l'AlexaFluor 555 ont été dilués au 1/1000 dans un tampon PBS, 0.5% BSA, 0.1% Triton X100 et DAPI au 1/10000. Les cellules sont ensuite lavées puis lues par microscopie à épifluorescence (Zeiss Axio Vert.A) avec un objectif Zeiss LD A-Plan 20x/0.35 Ph1. L'excitation pour l'AlexaFluor 488 et l'AlexaFluor 555 s'effectue respectivement à 475 et 555 nm par le système LED Zeiss Colibri 5. La capture d'image s'effectue à l'aide d'une caméra Zeiss Axiome color 5 et le logiciel Zen. L'analyse des images est quant à elle effectuée avec le logiciel ImageJ.

Analyse par cytométrie en flux :

Les cellules sont détachées grâce à la trypsine, qui est ensuite neutralisée par ajout de milieu complété en sérum. 1 000 000 de cellules sont centrifugées à 300g pendant 4min à 4°C. Le surnageant est jeté et les cellules sont resuspendues dans 100 µL de solution de marquage : Ac anti-CD44/FITC (Biolegend) dilué au 1/400, Ac anti-EpCAM/PE (Biolegend) dilué au 1/200 et Ac anti-CD49f (Biolegend) dilué au 1/100 dans du tampon PBS, 10% de SVF, pendant 30min à 4°C dans le noir. Les cellules sont ensuite lavées 2x, puis resuspendues dans 400µL de tampon PBS, 10% PBS et mesurées au cytomètre en flux (BD LSRFortessa™). L'analyse est effectuée via le logiciel FlowJo.

Induction de l'oncogène H-RAS^{G12V} par traitement au 4-Hydroxytamoxifen

Les cellules sont mises en culture en plaque 6 puits la veille de l'induction de H-RAS^{G12V} dans un milieu DMEM no glucose, no glutamine, no pyruvate complété avec 5% SVF (Gibco), 6 mM de glucose (Sigma), 0.25 mM GlutaMAX™ (Gibco), 0.1 mM pyruvate (Gibco), 91 U.mL⁻¹ pénicilline-streptomycine (P/S) (Gibco), 10 ng.mL⁻¹ human epidermal growth factor (EGF) (Promocell), 262 mU.mL⁻¹ insuline (NovoRapid) et 0,5 µg.mL⁻¹ hydrocortisone (Sigma). 24h après le milieu est changé contenant 500 nM de 4-Hydroxytamoxifen (OHT) (Sigma). L'induction de H-RAS^{G12V} par l'OHT s'effectue pendant 6 jours, une trypsine est effectuée à 3 jours avec un facteur de dilution identique entre chaque condition et le milieu est changé toutes les 48h.

Microscopie confocale :

Les cellules ont été maintenues en culture dans des chambres de 8-well Lab-TEK® µslides et marquées avec 2 µM de Dioll. Les images des échantillons ont été capturées par microscopie confocale (Zeiss LSM 880 AxioObserver inversé, avec environnement contrôlé : température, CO₂ et hygrométrie) avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27. Le Dioll est excité avec laser diode 405 nm, d'énergie = 1.0 %_{max} et l'acquisition s'effectue en mode spectral avec un gain = 759 A.U, le spectre d'émission est subdivisé en canaux de 8/9 nm de 424 à 513 nm avec une échelle de couleur reflétant les différentes longueurs d'onde du violet au vert.

Analyse du paramètre GP des images de la microscopie confocale :

Une image composite est créée à partir des tranches spectrales obtenues avec le Dioll. Après application d'un seuil pour garder les pixels positifs, ceux correspondant à la membrane plasmique sont sélectionnés manuellement à l'aide du logiciel ImageJ. À l'aide du logiciel R-software ((v3.2.2), l'intensité d'émission de chaque pixel des canaux à 440 nm et 490 nm sont utilisées pour le calcul du GP en chaque point par la formule décrite dans la section spectrofluorimétrie. La médiane du GP de l'ensemble des pixels d'une image est calculée. Le GP médian de 3 images est ensuite moyenné.

Analyse statistique et représentation graphique :

Un test de Student bilatéral est utilisé pour l'analyse comparative des échantillons. La significativité statistique est indiquée sur la légende des figures. Le logiciel GraphPad Prism est utilisé pour générer les graphiques et effectuer les analyses statistiques. Si l'analyse statistique n'est pas indiquée dans la légende cela signifie que la figure est représentative d'une n=3 répliqua biologique indépendant.

Bibliographie :

1. Centonze, A. *et al.* Heterotypic cell–cell communication regulates glandular stem cell multipotency. *Nat.* 2020 5847822 **584**, 608–613 (2020).
2. T, S. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
3. JS, P. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
4. BT, H. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* **69**, 4116–4124 (2009).
5. Ricardo, S. *et al.* Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.* **64**, 937–946 (2011).

6. DP, C. & BC, V. Context specificity of the EMT transcriptional response. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
7. Pommier, R. M. *et al.* Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
8. C, K. *et al.* Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 7353–7362 (2019).
9. M, S. & RA, S. Epigenetic Signatures and Plasticity of Intestinal and Other Stem Cells. *Annu. Rev. Physiol.* **83**, 405–427 (2021).
10. S, D. *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 91–98 (2017).
11. J, C. *et al.* ACSL4 promotes hepatocellular carcinoma progression via c-Myc stability mediated by ERK/FBW7/c-Myc axis. *Oncogenesis* **9**, (2020).
12. J, L., JH, Y., MS, K. & JL, R. Epigenetic reprogramming of epithelial-mesenchymal transition promotes ferroptosis of head and neck cancer. *Redox Biol.* **37**, (2020).
13. JY, L. *et al.* Polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway determines ferroptosis sensitivity in gastric cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 32433–32442 (2020).
14. X, W. *et al.* ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. *Oncotarget* **6**, 44849–44863 (2015).
15. W, Z. *et al.* Candidate Antimetastasis Drugs Suppress the Metastatic Capacity of Breast Cancer Cells by Reducing Membrane Fluidity. *Cancer Res.* **76**, 2037–2049 (2016).
16. Z, Z. *et al.* CtBP promotes metastasis of breast cancer through repressing cholesterol and activating TGF- β signaling. *Oncogene* **38**, 2076–2091 (2019).
17. D, S., EH, K., J, L. & JL, R. Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **129**, 454–462 (2018).
18. S, D. *et al.* FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* **575**, 693–698 (2019).
19. K, S. *et al.* Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 497–503 (2016).
20. Pastushenko, I. *et al.* Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* **556**, 463–468 (2018).
21. Kröger, C. *et al.* Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 7353–7362 (2019).
22. CL, C. *et al.* Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* **154**, 61 (2013).
23. SA, M. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
24. LL, S. & AA, S. Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines. *In Vitro* **20**, 732–738 (1984).
25. YH, L. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **38**, 431–440 (2006).

26. X, Z. *et al.* FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1092–1101 (2011).
27. S, T. *et al.* Gene regulation and priming by topoisomerase II α in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
28. Luo, M. *et al.* Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling. *Cell Metab.* **28**, 69–86.e6 (2018).
29. E, L. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* **15**, 907–913 (2009).
30. J, X., S, L. & R, D. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–172 (2009).
31. R, L. *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **7**, 51–63 (2010).
32. PG, T. *et al.* A dual role for oncostatin M signaling in the differentiation and death of mammary epithelial cells in vivo. *Mol. Endocrinol.* **22**, 2677–2688 (2008).
33. Y, Y. *et al.* All-trans retinoic acids induce differentiation and sensitize a radioresistant breast cancer cells to chemotherapy. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, (2016).
34. MF, A., RA, S., S, A., Y, H. & SV, F. All trans-retinoic acid (ATRA) induces re-differentiation of early transformed breast epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **44**, 1831–1842 (2014).
35. PJ, L. *et al.* Ribitol enhances matriglycan of α -dystroglycan in breast cancer cells without affecting cell growth. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
36. AP, M. *et al.* A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability. *Nat. Med.* **23**, 568–578 (2017).
37. C, A. *et al.* Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. *PLoS One* **7**, (2012).
38. V, P. *et al.* An Effect of Culture Media on Epithelial Differentiation Markers in Breast Cancer Cell Lines MCF7, MDA-MB-436 and SkBr3. *Medicina (Kaunas).* **54**, (2018).
39. S, R., E, G. & G, C. Dysregulation of iron metabolism in cancer stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 216–220 (2019).
40. Doll, S. *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat. Chem. Biol.* **2016 131 13**, 91–98 (2016).
41. YJ, G., AJ, R.-M. & N, P. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J. Neurosci. Methods* **144**, 127–135 (2005).
42. C, B. & B, O. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, (2010).
43. A, S., L, M., L, T. & G, B. Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland. *Endocrinology* **133**, 838–842 (1993).
44. Morel, A. P. *et al.* EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.* **8**, e1002723 (2012).
45. Sorrentino, G. *et al.* Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat. Cell*

- Biol.* **16**, 357–366 (2014).
46. M, C. *et al.* The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **147**, 759–772 (2011).
 47. Bersuker, K. *et al.* The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature* **575**, 688–692 (2019).
 48. Doll, S. *et al.* FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* **575**, 693–698 (2019).
 49. L, G.-C. *et al.* Cholesterol Pathway Inhibition Induces TGF- β Signaling to Promote Basal Differentiation in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **38**, 567-583.e11 (2020).
 50. H, P. *et al.* Expression of LXR- β , ABCA1 and ABCG1 in human triple-negative breast cancer tissues. *Oncol. Rep.* **42**, 1869–1877 (2019).
 51. V, E. *et al.* Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene* **34**, 996–1005 (2015).
 52. DL, B. & NE, W. Isolation of Lipid Droplets from Cells by Density Gradient Centrifugation. *Curr. Protoc. cell Biol.* **72**, 3.15.1-3.15.13. (2016).

Tableau 1 : Fluctuation des gènes lors de l'induction du programme de l'EMT par activation de ZEB1

Tableau 1 :

	Gene	Day 1	Day 2	Day 3	Day 5	Day 10	Signature
Test n°1	CD24	0,6859481	-0,688342	-0,862124	1	-1	Epi
	CDH1	1	-0,252555	-1	0,2800606	-0,016528	Epi
	CDH3	0,3513245	-0,167427	-1	1	0,2609948	Epi
	EPCAM	-0,410692	-1	-0,571216	1	-0,733182	Epi
	GATA3	-0,970228	-1	-0,750147	1	0,3379556	Epi
	KT19	-1	-0,256031	-0,758959	-0,640133	1	Epi
	OVOL1	-0,993506	-1	-0,956667	1	-0,761359	Epi
	CD44	-1	-0,701106	0,5071957	0,1259576	1	Mes
	CDH2	-0,167535	-1	-0,301917	-0,269751	1	Mes
	ITGB4	0,0746494	-0,875977	-0,998594	-1	1	Mes
	SNAI1	-1	-0,969851	-0,477386	1	-0,832553	Mes
	SNAI2	1	0,2454411	-0,964506	-1	0,8399127	Mes
	VIM	0,5315942	-0,91196	-0,083612	-1	1	Mes
	ZEB1	-0,763096	-1	-0,473355	-0,534573	1	Mes
	ZEB2	-1	-0,677416	-0,755001	1	-0,366172	Mes
	Test n°2	CD24	1	0,8011238	-1	0,2528229	
CDH1		0,253905	1	-1	0,1465776		Epi
CDH3		-0,210857	0,9081061	-1	1		Epi
EPCAM		-0,891185	-1	-0,542599	1		Epi
GATA3		-1	0,2248475	-0,976352	1		Epi
KT19		-0,892082	1	-1	0,1482727		Epi
OVOL1		-1	-0,549704	0,2358814	1		Epi
CD44		-1	-0,969511	0,7800776	1		Mes
CDH2		0,0720256	-1	-0,355858	1		Mes
ITGB4		0,0027278	-1	0,6714252	1		Mes
SNAI1		-1	-0,634681	-0,255491	1		Mes
SNAI2		-0,695309	-1	0,2863115	1		Mes
VIM		1	-1	-0,536141	-0,944751		Mes
ZEB1		-0,426735	-1	-0,403655	1		Mes
ZEB2		-1	-0,299752	-0,383709	1		Mes
Test n°3		CD24	0,8185674	1	-0,684432	0,9671128	-1
	CDH1	-0,711253	0,2461964	-1	1	-0,986735	Epi
	CDH3	-0,49182	-0,556856	-1	1	-0,718915	Epi
	GATA3	-0,906335	0,970657	-1	1	-0,987014	Epi
	KT19	-0,418145	1	-0,258752	0,5421227	-1	Epi
	EPCAM	-0,379819	-1	-0,572511	1	0,1671832	Epi
	OVOL1	-1	-0,710334	-0,404018	0,6748198	1	Epi
	CD44	-1	-0,838715	0,4985483	-0,201896	1	Mes
	CDH2	1	-1	-0,115198	1,1026333	0,5952718	Mes
	ITGB4	0,2944901	-1	-0,171145	-0,650852	1	Mes
	SNAI1	-0,7414	-0,218049	-0,458014	1	-1	Mes
	SNAI2	-0,616165	-1	-0,231236	-0,323034	1	Mes
	VIM	1	-0,890351	-0,424241	-1	0,2404753	Mes
	ZEB1	-0,649605	-1	-0,245552	-0,089024	1	Mes
	ZEB2	-1	-0,332646	-0,557238	1	-0,569787	Mes

	Gene Set	Day 1	Day 2	Day 3	Day 5	Day 10
Test n°1	Epi	-0,441258	0,1356662	-0,702816	0,8834365	-0,50364
	Mes	-0,301409	-0,776677	-0,234233	0,1680718	0,4739956
Test n°2	Epi	-0,39146	0,3406248	-0,754724	0,6496676	
	Mes	-0,380911	-0,862993	-0,02463	0,7569061	
Test n°3	Epi	-0,191022	-0,623479	-0,842731	0,6628468	-0,130303
	Mes	-0,290548	-0,736359	-0,443397	-0,209796	0,5801485

Tableau 2, 3 et 4 : Fold change d'expressions des gènes indiqués et leur classification.

Tableau 2 : Metastable vs HMEC C

Gene	Fold change Metastable	Category
ALDH1A1	0.021876286	Autre
KYNU	492.9524964	Autre
CDKN1A	1.63786086	Cell Stress
DDIT4	1.527850107	Cell Stress
MDM2	7.192619777	Cell Stress
NFE2L2	2.429505265	Cell Stress
NQO1	5.803248273	Cell Stress
SOD1	1.717837097	Cell Stress
SOD2	2.920536399	Cell Stress
TP53	4.039779377	Cell Stress
WIG1	2.935078898	Cell Stress
ABCA1	6.418744775	Cholesterol Metabolism
ABCG1	1.248294099	Cholesterol Metabolism
FDFIT1	5.884906289	Cholesterol Metabolism
HMGCR	3.194280066	Cholesterol Metabolism
SOLE	3.517656378	Cholesterol Metabolism
SOSTM	3.179694302	Cholesterol Metabolism
SREBF2	2.79069042	Cholesterol Metabolism
ACTA2	4.209748489	EMT
CD10	0.742347139	EMT
CD44	82.21206533	EMT
CDH2	2.562189114	EMT
FOXO1	0.820280539	EMT
ITGA5	4.168699529	EMT
SNAI1	0.518646604	EMT
SNAI2	1.985754587	EMT
Twist1	26.00064428	EMT
VIM	14.52890244	EMT
ZEB1	132.8184459	EMT
ZEB2	56.94235915	EMT
DNER	22.95085091	EMT
CD24	0.021438895	Epi differentiation
CDH1	0.008166578	Epi differentiation
CDH3	0.08560562	Epi differentiation
CLDN1	0.114934149	Epi differentiation
CLDN3	0.160227258	Epi differentiation
CLDN4	0.048724194	Epi differentiation
CLDN7	0.037796162	Epi differentiation
EpCam	0.213455382	Epi differentiation
ERBB3	0.049690847	Epi differentiation
FOXA1	0.112613963	Epi differentiation
GATA3	2.313038714	Epi differentiation
ITGA6	0.738002166	Epi differentiation
ITGB4	0.417741087	Epi differentiation
KLK6	0.01429376	Epi differentiation
KRT14	0.119062976	Epi differentiation
KRT16	0.163296207	Epi differentiation
KRT17	0.096519177	Epi differentiation
KRT19	0.079592921	Epi differentiation
KRT5	0.531766629	Epi differentiation
KRT6a	0.146928474	Epi differentiation
KRT7	0.549943866	Epi differentiation
KRT8	0.123678749	Epi differentiation
MUC1	4.295588901	Epi differentiation
OVOL1	0.174414565	Epi differentiation
OVOL2	4.049738039	Epi differentiation
ATF4	2.458034094	ER Stress
CHAC1	0.68960937	ER Stress
HERPUD	0.124349294	ER Stress
HSPA5	1.509358724	ER Stress
HYOU1	0.896481433	ER Stress
PDI A4	2.846827687	ER Stress
PDI A6	9.755772926	ER Stress
TRIB3	1.859944956	ER Stress
GFP T2	3.219881994	Glycolysis Branch
HK1	31.44797748	Glycolysis Branch
HK2	4.468345337	Glycolysis Branch
LDHA	1.894111836	Glycolysis Branch
LDHB	0.598032818	Glycolysis Branch
PDK4	20.37392578	Glycolysis Branch
SLC2A3	2.083693724	Glycolysis Branch
AIFM2	7.23761665	Iron/Ferroptosis
FTH1	2.31032436	Iron/Ferroptosis
FTL	2.742545509	Iron/Ferroptosis
GCH1	11.54920597	Iron/Ferroptosis
HMOX	1.252028943	Iron/Ferroptosis
LCN2	0.024804014	Iron/Ferroptosis
SLC7A11	17.96393616	Iron/Ferroptosis
ACSL1	7.340638471	Lipid Metabolism
ACSL4	1.87394351	Lipid Metabolism
AGPAT4	1.124335262	Lipid Metabolism
FABP4	56.92861934	Lipid Metabolism
FASN	10.6327899	Lipid Metabolism
LDLR	1.842336366	Lipid Metabolism
PPARA	4.71025425	Lipid Metabolism
PPARG	7.71720848	Lipid Metabolism
SCD	1.860086279	Lipid Metabolism
SCD5	2.103320041	Lipid Metabolism
SREBF1	1.036091212	Lipid Metabolism
FOXO1	18.2075049	Stem cell
NANOG	2.157462946	Stem cell
OCT4	2.345793341	Stem cell
TCF4	2.718058413	Stem cell
TOPO2A	5.940755491	Stem cell

Tableau 3 : Prog Lum vs Metastable

Gene	Fold Change Prog Myo	Category
ALDH1A1	3.495883696	Autre
ALDH1A3	0.684511731	Autre
KYNU	1.815145394	Autre
LCN2	1.815145394	Autre
CDKN1A	0.409910066	Cell stress
MDM2	0.428116177	Cell stress
NFE2L2	0.636284512	Cell stress
NQO1	0.314753831	Cell stress
SOD1	0.903488452	Cell stress
SOD2	0.62221376	Cell stress
ABCA1	0.607847234	Cholesterol Metabolism
FDFIT1	0.242188439	Cholesterol Metabolism
HMGCR	0.398501618	Cholesterol Metabolism
SOLE	0.372587659	Cholesterol Metabolism
SOSTM	0.294410922	Cholesterol Metabolism
SREBF2	0.16210689	Cholesterol Metabolism
CD24	23.8536103	Differentiated
CD55	1.702418698	Differentiated
CDH1	4.884510716	Differentiated
CDH3	2.669872129	Differentiated
CLDN1	0.715349	Differentiated
CLDN3	5.483006127	Differentiated
GATA3	0.859494761	Differentiated
KLK6	0.626418773	Differentiated
KRT14	17.91570531	Differentiated
KRT16	1.021092002	Differentiated
KRT5	4.60832473	Differentiated
KRT6a	0.736448745	Differentiated
OVOL2	0.229478751	Differentiated
CD44	0.696791226	EMT
DNER	1.154153973	EMT
FOXC1	1.174935135	EMT
SNAI1	5.387793159	EMT
SNAI2	3.826258784	EMT
Twist1	0.882625776	EMT
ZEB1	0.50282498	EMT
ZEB2	0.27671374	EMT
ATF4	0.501342488	ER Stress
CHAC	0.253447447	ER Stress
DDIT3	1.560583413	ER Stress
DDIT4	1.5018785	ER Stress
HERPUD	0.194694534	ER Stress
HSPA5	1.143784109	ER Stress
HYOU1	0.687453521	ER Stress
PDI A4	0.660292823	ER Stress
PDI A6	1.48915507	ER Stress
TRIB3	0.721457395	ER Stress
GFP T2	0.085482581	Glycolysis Branch
HK1	9.456166635	Glycolysis Branch
HK2	0.106289195	Glycolysis Branch
LDHA	1.539029102	Glycolysis Branch
LDHB	1.51804671	Glycolysis Branch
PDK4	0.050593655	Glycolysis Branch
SLC2A3	1.260683385	Glycolysis Branch
AIFM2	0.69790466	Iron/Ferroptosis
FTH1	0.698782286	Iron/Ferroptosis
FTL	0.197903953	Iron/Ferroptosis
GCH1	0.000446981	Iron/Ferroptosis
HMOX	0.692615885	Iron/Ferroptosis
SLC7A11	0.140504448	Iron/Ferroptosis
ACSL1	0.211762258	Lipid metabolism
ACSL4	0.68392749	Lipid metabolism
AGPAT4	1.3382977	Lipid metabolism
FA SN	11.9232595	Lipid metabolism
LDLR	0.73993545	Lipid metabolism
PPARA	1.63880663	Lipid metabolism
PPARG	0.948971408	Lipid metabolism
SCD	0.148879816	Lipid metabolism
SCD5	0.618603758	Lipid metabolism
SREBF1	1.110166457	Lipid metabolism
ELF3	1.709224427	Lum differentiation
ELF5	1.60280508	Lum differentiation
EpCam	0.822271342	Lum differentiation
ERBB3	0.289858187	Lum differentiation
ESR1	19.76717214	Lum differentiation
FOXA1	0.822861614	Lum differentiation
KRT19	2.939783914	Lum differentiation
KRT7	1.58987118	Lum differentiation
KRT8	0.886445488	Lum differentiation
MUC1	0.114684235	Lum differentiation
OVOL1	0.145958286	Lum differentiation
PRLR	0.291509523	Lum differentiation
ACTA2	2.731505691	Myoepi differentiation
BGN	0.603907838	Myoepi differentiation
CALD1	1.578030519	Myoepi differentiation
CALR	1.634832425	Myoepi differentiation
CD10	2.142689504	Myoepi differentiation
CDH3	3.040309292	Myoepi differentiation
CNN1	1040.053436	Myoepi differentiation
COL1A1	39.32399843	Myoepi differentiation
COL4A1	3.104859369	Myoepi differentiation
COL4A2	3.518052835	Myoepi differentiation
COL5A1	2.811892652	Myoepi differentiation
DCN	1.683089683	Myoepi differentiation
DNp63	1.094034842	Myoepi differentiation
FABP5	2.25165573	Myoepi differentiation
FN1	0.72471754	Myoepi differentiation
ITGA5	2.03672661	Myoepi differentiation
KRT15	2.699976018	Myoepi differentiation
KRT17	2.966587862	Myoepi differentiation
OXTR	7.463769267	Myoepi differentiation
PCOLCE2	3.80788564	Myoepi differentiation
SERP DN B5	3.92284573	Myoepi differentiation
TAGLN	1.66687383	Myoepi differentiation
TAE63	2.101223138	Myoepi differentiation
Vim	2.253980245	Myoepi differentiation
BME	0.437409207	Stem cell
FOXP1	0.183267385	Stem cell
KL F4	0.441654833	Stem cell
NANOG	0.138282904	Stem cell
Oc4	0.967818375	Stem cell
TCF4	1.73401065	Stem cell
TOPO2A	1.485623278	Stem cell

Tableau 4 : Prog Myo vs Metastable

Gene	Fold Change Prog Myo	Category
ALDH1A1	3.495883696	Autre
ALDH1A3	0.684511731	Autre
KYNU	1.815145394	Autre
LCN2	1.815145394	Autre
CDKN1A	0.409910066	Cell stress
MDM2	0.428116177	Cell stress
NFE2L2	0.636284512	Cell stress
NQO1	0.314753831	Cell stress
SOD1	0.903488452	Cell stress
SOD2	0.62221376	Cell stress
ABCA1	0.607847234	Cholesterol Metabolism
FDFIT1	0.242188439	Cholesterol Metabolism
HMGCR	0.398501618	Cholesterol Metabolism
SOLE	0.372587659	Cholesterol Metabolism
SOSTM	0.294410922	Cholesterol Metabolism
SREBF2	0.16210689	Cholesterol Metabolism
CD24	23.8536103	Differentiated
CD55	1.702418698	Differentiated
CDH1	4.884510716	Differentiated
CDH3	2.669872129	Differentiated
CLDN1	0.715349	Differentiated
CLDN3	5.483006127	Differentiated
GATA3	0.859494761	Differentiated
KLK6	0.626418773	Differentiated
KRT14	17.91570531	Differentiated
KRT16	1.021092002	Differentiated
KRT5	4.60832473	Differentiated
KRT6a	0.736448745	Differentiated
OVOL2	0.229478751	Differentiated
CD44	0.696791226	EMT
DNER	1.154153973	EMT
FOXC1	1.174935135	EMT
SNAI1	5.387793159	EMT
SNAI2	3.826258784	EMT
Twist1	0.882625776	EMT
ZEB1	0.50282498	EMT
ZEB2	0.27671374	EMT
ATF4	0.501342488	ER Stress
CHAC	0.253447447	ER Stress
DDIT3	1.560583413	ER Stress
DDIT4	1.5018785	ER Stress
HERPUD	0.194694534	ER Stress
HSPA5	1.143784109	ER Stress
HYOU1	0.687453521	ER Stress
PDI A4	0.660292823	ER Stress
PDI A6	1.48915507	ER Stress
TRIB3	0.721457395	ER Stress
GFP T2	0.085482581	Glycolysis Branch
HK1	9.456166635	Glycolysis Branch
HK2	0.106289195	Glycolysis Branch
LDHA	1.539029102	Glycolysis Branch
LDHB	1.51804671	Glycolysis Branch
PDK4	0.050593655	Glycolysis Branch
SLC2A3	1.260683385	Glycolysis Branch
AIFM2	0.69790466	Iron/Ferroptosis
FTH1	0.698782286	Iron/Ferroptosis
FTL	0.197903953	Iron/Ferroptosis
GCH1	0.000446981	Iron/Ferroptosis
HMOX	0.692615885	Iron/Ferroptosis
SLC7A11	0.140504448	Iron/Ferroptosis
ACSL1	0.211762258	Lipid metabolism
ACSL4	0.68392749	Lipid metabolism
AGPAT4	1.3382977	Lipid metabolism
FA SN	11.9232595	Lipid metabolism
LDLR	0.73993545	Lipid metabolism
PPARA	1.63880663	Lipid metabolism
PPARG	0.948971408	Lipid metabolism
SCD	0.148879816	Lipid metabolism
SCD5	0.618603758	Lipid metabolism
SREBF1	1.110166457	Lipid metabolism
ELF3	1.709224427	Lum differentiation
ELF5	1.60280508	Lum differentiation
EpCam	0.822271342	Lum differentiation
ERBB3	0.289858187	Lum differentiation
ESR1	19.76717214	Lum differentiation
FOXA1	0.822861614	Lum differentiation
KRT19	2.939783914	Lum differentiation
KRT7	1.58987118	Lum differentiation
KRT8	0.886445488	Lum differentiation
MUC1	0.114684235	Lum differentiation
OVOL1	0.145958286	Lum differentiation
PRLR	0.291509523	Lum differentiation
ACTA2	2.731505691	Myoepi differentiation
BGN	0.603907838	Myoepi differentiation
CALD1	1.578030519	Myoepi differentiation
CALR	1.634832425	Myoepi differentiation
CD10	2.142689504	Myoepi differentiation
CDH3	3.040309292	Myoepi differentiation
CNN1	1040.053436	Myoepi differentiation
COL1A1	39.32399843	Myoepi differentiation
COL4A1	3.104859369	Myoepi differentiation
COL4A2	3.518052835	Myoepi differentiation
COL5A1	2.811892652	Myoepi differentiation
DCN	1.683089683	Myoepi differentiation
DNp63	1.094034842	Myoepi differentiation
FABP5	2.25165573	Myoepi differentiation
FN1	0.72471754	Myoepi differentiation
ITGA5	2.03672661	Myoepi differentiation
KRT15	2.699976018	Myoepi differentiation
KRT17	2.966587862	Myoepi differentiation
OXTR	7.463769267	Myoepi differentiation
PCOLCE2	3.80788564	Myoepi differentiation
SERP DN B5	3.92284573	Myoepi differentiation
TAGLN	1.66687383	Myoepi differentiation
TAE63	2.101223138	Myoepi differentiation
Vim	2.253980245	Myoepi differentiation
BME	0.437409207	Stem cell
FOXP1	0.183267385	Stem cell
KL F4	0.441654833	Stem cell
NANOG	0.138282904	Stem cell
Oc4	0.967818375	Stem cell
TCF4	1.73401065	Stem cell
TOPO2A	1.485623278	Stem cell

Résultat Contributeur n°1



DiPhenyl Phosphate (DPP) modulateur du
métabolisme lipidique

Lors de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler sur d'autres projets en lien avec le métabolisme lipidique et l'identité cellulaire. Ce projet se centre sur l'étude d'un perturbateur métabolique, le Diphénylphosphate (DPP) et a permis de publier un article dans *Environmental Health Perspectives*. Le DPP provient principalement de la dégradation de molécules utilisées comme retardateur de flamme. De ce fait on retrouve cette molécule de façon ubiquitaire dans l'environnement (l'atmosphère, l'eau, l'intérieur des maisons ...). Alors que l'ensemble des travaux sur la cytotoxicité des retardateurs de flamme sont basés sur les molécules primaires, il était donc intéressant de regarder l'effet de ces molécules après leur biodégradation, notamment le DPP. S. Selmi-Ruby, J. Marín-Sáez et A. Fildier ont donc analysé l'effet du DPP et de son principal précurseur, le Triphénylphosphate (TPP) lors d'exposition aiguë ou chronique sur un modèle animal. Ils ont par la suite effectué des analyses multi-omiques, des foies des souris traités au DPP. C'est lors de ces analyses que j'ai pu apporter une contribution dans ces travaux. Les conclusions apportées ont permis de mettre en évidence des modifications des métabolites contenant des noyaux aromatiques, notamment ceux contenant la fonction chimique de type indole associé au métabolisme du tryptophane. Ce résultat mettait en lumière une perturbation du récepteur AHR. En parallèle, des modifications métaboliques des lipides ont pu être observées, notamment une augmentation des lipides polyinsaturés. Alors qu'AHR est notamment connu pour son activité de détoxification d'agents toxiques pour la cellule, il a été démontré qu'il jouait aussi un rôle dans des processus embryonnaires. En effet, son activation par son ligand endogène, la Kynurénine, un métabolite dérivé du tryptophane permet un maintien du phénotype indifférencié des cellules souches ectodermiques²⁶⁰. Ainsi l'identité cellulaire peut être modulée par la régulation d'AHR. On retrouve ces modulations par AHR lors du développement tumoral sur les mécanismes d'autorenouvellement et de motilité cellulaire, qui comme je l'ai démontré dans l'introduction semblent être en lien avec la perturbation de l'identité cellulaire²⁶¹. Il a aussi été démontré que l'activation d'AHR est importante pour le développement du caractère souche des cellules cancéreuses mammaires²⁶². Dans les mécanismes retrouvés dans ce contexte tumorigénique, il est intéressant de constater l'existence d'une boucle d'activation entre les fibroblastes associés aux cellules cancéreuses (CAF) productrices de l'activateur endogène d'AHR, la kynurénine, et les cellules cancéreuses productrices d'eicosanoïdes²⁶³. En effet, une augmentation de l'activité de COX2 au sein des cellules cancéreuses, l'enzyme métabolisant l'acide arachidonique en prostaglandine E2, entraîne par sa sécrétion une augmentation du métabolisme du tryptophane et notamment la synthèse et la sécrétion de la kynurénine chez les CAF. Lorsqu'elle est présente dans le milieu, la kynurénine va alors pouvoir activer l'AHR des cellules cancéreuses modulant ainsi l'identité cellulaire. En lien avec nos travaux sur la corrélation entre fluidité membranaire et plasticité cellulaire, il est intéressant de constater qu'un enrichissement du métabolisme en PUFA ω 6 permettrait le support d'un tel mécanisme moléculaire de communication cellulaire au niveau de la tumeur et qui serait lié à la mise en place d'un phénotype CCDD. Ceci permettrait de renforcer le rôle de la modulation du métabolisme lipidique pour l'acquisition du phénotype CCDD, se traduisant par une augmentation de la fluidité membranaire.

De plus, des travaux supplémentaires effectués au sein de l'équipe du CRCL ont permis de mettre en évidence que le DPP permettait de potentialiser plusieurs mécanismes lors de la mise en place d'un processus tumoral par traitement par un agent chimique le 3-méthylcholenthrène.

Ces travaux préliminaires mettent en évidence que la combinaison DPP et 3-méthylcholenthène permettent d'augmenter le nombre d'hyperplasies atypique et sont associés au développement de régions métaplasiques. Ces résultats suggèrent la mise en place d'une perturbation de l'identité cellulaire par le DPP, probablement dû à une régulation d'AHR. En prenant en considération l'ensemble de ces résultats, il est intéressant d'émettre l'hypothèse que la modulation d'AHR par le DPP, augmenterait le métabolisme des lipides particulièrement celui des PUFA jouant notamment un rôle sur la mise en place d'une communication intercellulaire au niveau de la tumeur. Finalement, ce changement métabolique permettrait dans cette hypothèse de soutenir les mécanismes liés à la perturbation de l'identité cellulaire et par conséquent potentialiser le processus tumoral, de l'initiation jusqu'au processus métastatique. Cette hypothèse mettrait une nouvelle fois en lien la perte de l'identité cellulaire et l'augmentation de la fluidité membranaire.

In Vivo Characterization of the Toxicological Properties of DPhP, One of the Main Degradation Products of Aryl Phosphate Esters

Samia Selmi-Ruby,^{1*} Jesús Marín-Sáez,^{2*} Aurélie Fildier,^{3*} Audrey Buleté,³ Myriam Abdallah,¹ Jessica Garcia,⁴ Julie Deverchère,¹ Loïc Spinner,³ Barbara Giroud,³ Sébastien Ibanez,⁵ Thierry Granjon,⁵ Claire Bardel,^{6,7} Alain Puisieux,¹ Béatrice Fervers,¹ Emmanuelle Vulliet,³ Léa Payen,^{1,4} and Arnaud M. Vigneron¹

¹INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

²Department of Chemistry and Physics, Analytical Chemistry Area, University of Almería, Research Centre for Agricultural and Food Biotechnology (BITAL), Agrifood Campus of International Excellence, Almería, Spain

³CNRS, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

⁴Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon–Sud, Biochemistry, Pharmacotoxicology, and Molecular Biology Department, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Pierre Bénite, France

⁵CNRS, Molecular and Supramolecular Chemistry and Biochemistry Institute ICBMS UMR 5246, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁶Department of Biostatistics, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁷CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR 5558, Université de Lyon, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

BACKGROUND: Aryl phosphate esters (APEs) are widely used and commonly present in the environment. Health hazards associated with these compounds remain largely unknown and the effects of diphenyl phosphate (DPhP), one of their most frequent derivatives, are poorly characterized.

OBJECTIVE: Our aim was to investigate whether DPhP per se may represent a more relevant marker of exposure to APEs than direct assessment of their concentration and determine its potential deleterious biological effects in chronically exposed mice.

METHODS: Conventional animals (FVB mice) were acutely or chronically exposed to relevant doses of DPhP or to triphenyl phosphate (TPhP), one of its main precursors. Both molecules were measured in blood and other tissues by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). Effects of chronic DPhP exposure were addressed through liver multi-omics analysis to determine the corresponding metabolic profile. Deep statistical exploration was performed to extract correlated information, guiding further physiological analyses.

RESULTS: Multi-omics analysis confirmed the existence of biological effects of DPhP, even at a very low dose of 0.1mg/mL in drinking water. Chemical structural homology and pathway mapping demonstrated a clear reduction of the fatty acid catabolic processes centered on acylcarnitine and mitochondrial β -oxidation in mice exposed to DPhP in comparison with those treated with vehicle. An interesting finding was that in mice exposed to DPhP, mRNA, expression of genes involved in lipid catabolic processes and regulated by peroxisome proliferator–activated receptor alpha (PPAR α) was lower than that in vehicle-treated mice. Immunohistochemistry analysis showed a specific down-regulation of HMGCS2, a kernel target gene of PPAR α . Overall, DPhP absorption disrupted body weight–gain processes.

CONCLUSIONS: Our results suggest that in mice, the effects of chronic exposure to DPhP, even at a low dose, are not negligible. Fatty acid metabolism in the liver is essential for controlling fast and feast periods, with adverse consequences on the overall physiology. Therefore, the impact of DPhP on circulating fat, cardiovascular pathologies and metabolic disease incidence deserves, in light of our results, further investigations. <https://doi.org/10.1289/EHP6826>

Introduction

Diphenyl phosphate (DPhP) has been used as a main biomarker for assessing exposure to aryl phosphate esters (APEs), especially triphenyl phosphate (TPhP), a molecule suspected of presenting human health hazards. However, DPhP can be produced from degradation of several APEs, including ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPHP) or the resorcinol bis(diphenyl phosphate) (RDP) (Ballesteros-Gómez et al. 2015a, 2015b) and tert-butylphenyl diphenyl phosphate (BPDP) (Heitkamp et al. 1985). Moreover, DPhP itself is largely present in the environment worldwide

(Björnsdotter et al. 2018; Fu et al. 2017; Li et al. 2019b; Wang and Kannan 2018; Wang et al. 2019), either owing to its spontaneous/microorganism production from known APEs (Fu et al. 2017; Su et al. 2016), or to its direct use in industry (Mitchell et al. 2019). Most APEs are used as flame retardants. They are added to consumer products and raw materials to delay combustion and meet flammability standards (e.g., Fire initiation and growth, Fire containment, and Non-combustibility test standards), such as the ISO/TC92 Fire Safety code, and the TC89 Fire Hazard Testing code existing in Europe. Moreover, unlike other flame retardants, TPhP and EHDPHP are also largely used as plasticizers and lubricants in hydraulic fluids, rubber, paints, textile coatings, food packaging, and PVC, drastically increasing their presence in the environment. These compounds are not usually covalently linked to plastic materials and can easily leach into the environment (Jamarani et al. 2018).

High vapor pressure of TPhP is also likely to facilitate its release in the air once it is freed from its original material (Meeker et al. 2013). It is not surprising that TPhP and EHDPHP have thus been shown to be ubiquitous components of the human indoor environment where their sources and exposure pathways are quite diverse and heterogeneous with regard to other flame retardants. Indeed, TPhP and EHDPHP quantification in food (Li et al. 2019b; Wang and Kannan 2018), house dust (Björnsdotter et al. 2018; Meeker and Stapleton 2010; Meeker et al. 2013), water (Li et al. 2019a), or air (Wei et al. 2015) has systematically demonstrated their presence in these different matrices, raising awareness on the safety of these compounds. A study characterizing the direct

*These authors contribute equally to this work.

Address correspondence to Léa Payen, Centre Léon Bérard, Bat Cheney D, 28 rue Laënnec, 69373 Lyon CEDEX 08, France. Telephone: 04 69 85 60 85. Email: lea.payen@univ-lyon1.fr; or Arnaud M. Vigneron, Centre Léon Bérard, Bat Cheney D, 28 rue Laënnec, 69373 Lyon CEDEX 08, France. Telephone: 04 69 85 60 85. Email: arnaud.vigneron@lyon.unicancer.fr

Supplemental Material is available online (<https://doi.org/10.1289/EHP6826>).

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Received 24 January 2020; Revised 17 November 2020; Accepted 18 November 2020; Published 9 December 2020.

Note to readers with disabilities: *EHP* strives to ensure that all journal content is accessible to all readers. However, some figures and Supplemental Material published in *EHP* articles may not conform to 508 standards due to the complexity of the information being presented. If you need assistance accessing journal content, please contact ehponline@niehs.nih.gov. Our staff will work with you to assess and meet your accessibility needs within 3 working days.

biological effects of DPhP and their relationship to TPhP exposure thus appeared to be of particular relevance to better define the effects and mechanisms of action associated with exposure to APEs in a more comprehensive way.

Historically, DPhP was believed to be produced from TPhP in the liver by oxidase and aryl esterase (Sasaki et al. 1984). However, recent analyses obtained from *in vitro* cultured hepatocytes revealed that the main metabolites derived from TPhP were hydroxylated and glucuronated forms of TPhP (Su et al. 2014). An important finding is that these metabolites and their equivalents for EHDPhP have recently been detected in human urine samples (Zhao et al. 2019), although DPhP remained the most abundant metabolite in these samples. This finding may indicate either that degradation of APEs does not primarily occur in the human liver or that APEs are rapidly degraded and absorbed as DPhP by the environment. Finally, the presence of DPhP in the environment could be directly due to its importance as a catalyst in polymerization processes.

In line with these hypotheses, a recent study showed that serum hydrolase significantly contributed to TPhP and EHDPhP clearance and production of DPhP (Van den Eede et al. 2016). Bacteria present in the environment and the microbiota may participate in this type of transformation because bacterial metabolism has been shown to fully degrade TPhP, with DPhP initially being the main metabolite released into the biofilm (Hou et al. 2019). Similarly, microsomal preparation of human skin demonstrated the ability of carboxylesterases to efficiently generate DPhP from TPhP (Abdallah et al. 2019), indicating that the likelihood of TPhP reaching subcutaneous fat and blood through this route of exposure is very low. Rapid detection of DPhP in urine samples of women exposed to TPhP through nail polish tends to confirm this hypothesis (Mendelsohn et al. 2016). Finally, DPhP concentrations in the environment were reported to be strongly correlated with TPhP levels present in the same environment (Björnsdotter et al. 2018), hence raising concerns about these potentially hazardous molecules for human health.

The complexity of the routes of exposure described above can cast doubts as to the relevance of *in vitro* and *in vivo* studies describing the toxicities associated with APEs such as TPhP. For instance, very high doses of TPhP administered via oral gavage (300 mg/kg/d) in adult mice (Chen et al. 2015) or through direct subcutaneous injection (~200 µg/kg/d) in embryos/pups (Wang et al. 2018) may artificially expose the organism to an irrelevant dose of TPhP and its hydroxylated forms, thus misrepresenting the most common route of DPhP exposure, i.e., through the environment. These types of protocols have mainly led to the conclusion that TPhP has an obesogenic endocrine-disrupting activity. These findings were reinforced *in vitro* by studies showing that high doses (10–100 µM) of TPhP disturb the activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) (Belcher et al. 2014; Tung et al. 2017), or by the ability of TPhP to enhance the lipogenic activity of the thyroid hormone on isolated chicken embryo hepatocytes (Su et al. 2014). Of note, these doses were highly toxic for mammalian cells, casting doubts on the relevance of these results for human physiology. In addition, cell-based transactivation assays somehow failed to confirm agonistic or antagonistic activities of TPhP on either PPAR or TR nuclear receptors (Kojima et al. 2013). Moreover, a treatment combining four APEs administered at lower individual doses of 1 mg/kg/d decreased the body weight (BW) gain of these animals instead of increasing it. Similarly, recent reports indicated that exposure to DPhP and TPhP could disrupt the metabolism in opposite manners (Wang et al. 2018).

Based on these controversial findings, we herein present a large study conducted in mice, in which the routes and doses of exposure

to DPhP could mimic those found in humans. Environmentally- and human-relevant doses of DPhP were established from an extensive review of the literature estimating the human mean exposure doses from the environment (Li et al. 2019b; Wei et al. 2015) and the known correlation between environmental measurements and biological fluid concentrations (Björnsdotter et al. 2018; Meeker et al. 2013; Pouech et al. 2015; Wei et al. 2015; Zhao et al. 2019). To validate our choice of using DPhP rather than TPhP or another APE in our toxicity study, we first analyzed DPhP concentrations in blood of mice treated with various doses of both molecules via different routes of exposure. We hypothesized that humans are more likely to be continuously/chronically exposed to TPhP and DPhP owing to the presence of TPhP in the air and dust, rather than temporarily/acutely exposed through nutrition. We have thus analyzed the effects of continuous absorption of these two molecules through drinking water via kinetic measurement of their transformation in mice (bioaccumulation and tissue distribution), in comparison with other acute modes of administration such as oral gavage or tail-vein injection. We then present the data reporting the bioaccumulation and distribution of these molecules in mice. Finally, because our aim was to analyze the biological consequences of a relevant DPhP exposure, we have conducted dual-omics analyses combining metabolomics and transcriptomic measurement on tissue extracts obtained from independent experiments, as well as a histological validation.

Methods

Reagents and Chemicals

Diphenyl phosphate, triphenyl phosphate, diphenyl phosphate-D₁₀ and triphenyl phosphate-D₁₅ were purchased from Merck with a purity higher than 98%. The confirmation standards of carnitine, acetylcarnitine, palmitoylcarnitine, lauroylcarnitine, decanoylcarnitine, hexanoylcarnitine, stearic acid, oleic acid and linoleic acid, 7-ketocholesterol, 3 β -hydroxy-5-cholestene-7-one, Hypoxanthine, Ethyl oleate, *cis*-11-Eicosenoic acid, *cis*-11,14-Eicosadienoic acid, (*R*)-3-hydroxybutyric acid, Taurocholic acid, Taurodeoxycholate, Taurochenodeoxycholate, Tauroursodeoxycholic acid were obtained from Merck, all of them with a purity higher than 97%. Corn oil for DPhP and TPhP resuspension and animal exposure was also obtained from Merck.

Acetonitrile and heptane of LC-MS quality grade and ammonium formate were purchased from BioSolve. Water and formic acid quality grade optima LC-MS were purchased from Fisher Scientific.

Animal Experiments and Animal Care

Female FVB mice (5 wk old; 15.2–18.7 g) from Charles River Laboratories were used for all experiments. Animals were housed (from 4 wk) in the ANICAN (Center de Recherche en Cancérologie de Lyon) animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture. Food and water were provided *ad libitum* (lights on: between 8 pm and 8 am; temperature: 22°C \pm 1°C; humidity: 55% \pm 10%). Food was obtained from Safe (150-SP-25) and contained low levels of phytoestrogens and isoflavones (no soybean and alfalfa).

Four procedures were used to treat animals with DPhP and TPhP. Minimal and maximal relevant dose were estimated as indicated in the introduction and from preliminary analyses measuring the quantity of TPhP and DPhP found in mouse biological fluids from a wide range of tested concentrations (0.01 µg to 100 µg). Our aim here was to obtain, from environmentally relevant dose, blood DPhP concentrations close to those found in humans. Three procedures mimicked acute exposure either

through vein-tail injection (TPhP=0.1, 1, 10, or 100 μg and DPhP=0.1 or 1 μg), oral gavage (TPhP=0.1, 1, 10, or 100 μg , and DPhP=0.1 or 1 μg), or drinking water [TPhP and DPhP=0.1 mg/L (C1), 1 mg/L (C2), and 10 mg/L (C3)]. Experiments were stopped 1 h after treatment, except for that involving drinking water, where mice were euthanized after an overnight exposure. The amount of DPhP ingested through drinking water was higher than the amount ingested through the other routes, though it was spread over a longer period of time. The administered concentrations via drinking water were retained because they provided results that were similar to the acute oral gavage or vein-tail injection. Finally, one procedure mimicked chronic exposure, because mice were continuously treated from 5 to 17 wk through drinking water (DPhP=C1, C2, C3). Here, drinking water containing DPhP or the vehicle was changed twice a week until the end of the treatment. The concentrations administered were not adapted to the weight gain nor to the amount of water ingested/d/mouse. During the course of the experiment, drinking water consumption was verified at the group level and fluctuated from 4–5 mL to 6–7 mL per mouse between the start and the end of the experiment. We thus calculated a mean consumption per day and per mouse of 0.4–0.7 μg , 4–7 μg , and 40–70 μg of DPhP with the three different concentrations of DPhP used in drinking water along the duration of the experiments. As reported in the results section, BW gain was slightly different between the treated groups; therefore exposure by weight during the experiment increased by an average of 13% with C3 and was reduced by 4% and 7% in C2 and C1, respectively.

At least four animals were used in each group for acute exposure for each series of experiments described (five for oral gavage). For chronic exposure, 2 independent experiments were carried out with 10 animals per group. Metabolomics and transcriptomic analyses were performed on these separate and independent experiments, reinforcing the strength of the correlations observed. Between groups, animals were randomized according to their weight at the time of reception measured with an electronic balance and acclimated during 1 wk before the start of experiments.

For all exposures, DPhP and TPhP were first solubilized in an emulsion containing water and corn oil (Merck) (1:1 v/v) at 10 mg/L. These molecules were then diluted in water to obtain the indicated quantity in 100 μL for oral gavage and vein-tail injection and the indicated concentration in drinking water. Control animals were always given the same amount of diluted corn oil in water (5 μL in 100 μL of water for acute exposure and 500 μL in 1 L of drinking water for chronic exposure).

For all conditions, blood was collected by cardiac puncture using a syringe prefilled with heparin (arterial blood collection syringe, BD Preset) after mice were anesthetized with a mix of lethal dose of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). All mice were finally euthanized by cervical dislocation. Blood was immediately frozen in liquid nitrogen and store at -80°C before metabolite extraction. Liver, mammary glands, and visceral fat were also harvested immediately after cervical dislocation. Gall bladder was first removed from the liver. All tissues were briefly rinsed twice in a bath of NaCl solution (0.9%) and once in distilled water to remove blood and bile. Organs were then immediately frozen in liquid nitrogen and store at -80°C before metabolite extraction.

Animal experiments were performed in compliance with French and European regulations on the protection of animals used for scientific purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decree 2013–118). They were approved by the Ethics Committee and authorized by the French Ministry of Research (APAFIS#3,680-2016010509529577v5).

Sample Preparation for Targeted Analysis and Metabolomics

Three different extraction methods were used for the four matrices, i.e., a solid–liquid extraction for the liver, a liquid–liquid microextraction for whole blood, and a derived-QuEChERS for visceral fat and mammary glands. For each extraction, an internal standard solution of DPP-d10 and TPP-d15 was used. The same liver extraction was performed for targeted APE measurement and metabolomics analyses.

A mass of 20 mg of liver was extracted with 1 mL of acetonitrile and 0.5 mL of heptane, assisted by three zirconium balls. After centrifugation, the heptane was discarded, 750 μL of acetonitrile were transferred to a vial, and a second extraction with 1 mL of acetonitrile was conducted. Finally, all the extracts (total of 1.5 mL of acetonitrile) were pooled, split into two portions of 750 μL , evaporated at 35°C during approximately 90 min, and stored at -20°C . The samples were reconstituted with 75 μL of water/acetonitrile 90:10 (v/v), prior to UHPLC-HRMS analysis reverse phase chromatography, with 75 μL of acetonitrile/water 95:5 (v/v) for UHPLC-HRMS analysis HILIC chromatography or with 150 μL MeOH for targeted UHPLC-MS/MS analysis. For metabolomics, the extraction was conducted from eight samples of each administered concentration to obtain suitable, reliable, and reproducible statistical results.

A volume of 250 μL of whole blood was extracted with 950 μL of ACN, assisted by six zirconium beads and microtube homogenization for cell lysis. After centrifugation, 500 μL of supernatant was recovered. This extraction was repeated twice with recovery volumes of 1 mL of supernatant. The combined extract was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40°C and reconstituted with 500 μL of distilled mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MeOH) for targeted UHPLC-MS/MS analysis.

A mass of 25 mg of visceral fat or mammary glands was introduced into a centrifugation tube containing three zirconium balls. For the QuEChERS extraction, 500 mL of water, 500 μL of ACN, 100 μL of heptane, 100 mg of sodium acetate, and 400 mg of magnesium sulfate were added into the tube. After a vigorous manual agitation and centrifugation, the heptane phase was removed, and 400 μL of supernatant ACN phase was recovered, evaporated to dryness under a stream of nitrogen at ambient, and reconstituted with 125 μL of distilled MeOH for targeted UHPLC-MS/MS analysis.

UHPLC-ESI-MS/MS Analysis

For targeted analysis, separation was carried out using a 1200 HPLC system from Agilent Technologies. The chosen column was a Kinetex XB C18 column (50 \times 2.1 mm ID, 1.7 μm porosity, 100 \AA) from Phenomenex. The mobile phase was composed of 0.01% formic acid (FA) and 0.1 mM AmAc in distilled pure water (solution A) and 1 mM AmAc in distilled MeOH (solution B) with a gradient from 5% to 100% (solution B) in 2 min. The columns were maintained at 60°C during the analysis. The chromatographic system was coupled to a triple-stage 5500 QTRAP[®] from ABSciex with electrospray ionization interface (ESI). The multiple reaction mode monitoring was used for the identification and quantification of DPhP and TPhP (limit of detection, $\text{LOD}_{\text{DPhP}}=0.3 \text{ ng/mL}$, $\text{LOQ}_{\text{DPhP}}=0.5 \text{ ng/mL}$, $\text{LOD}_{\text{TPhP}}=0.7 \text{ ng/mL}$, $\text{LOQ}_{\text{TPhP}}=1 \text{ ng/mL}$). The Analyst software (version 1.6.2) was used for instrument control, data acquisition, and data processing.

For metabolomics, separation was carried out using an UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific). The chosen column was a Luna Omega polar C₁₈ (100 \times 2.1 mm, 1.6 μm particle size) (Phenomenex), because it was reported to have a greater affinity for

polar compounds, to detect and quantify a larger number of metabolites. A nucleodur HILIC column (100 × 2.1 mm, 3 μm particle size) (Macherey Nagel) was also used to confirm the identified compounds or to detect other compounds that the C₁₈ column did not highlight due to their different polar affinities. The columns were maintained at 30°C during the analysis.

With the C₁₈ column the mobile phase was water/acetonitrile 90/10 (v/v) 5 mM ammonium formate and 0.01% formic acid (solution A) and acetonitrile 5 mM ammonium formate and 0.01% formic acid (solution B). The gradient elution had a flow rate of 0.3 mL/min, and it started at 100% of solution A and was maintained for 1 min. The percentage of solution A then decreased until reaching 0% within 10 min. The gradient was held at this percentage for 4 min prior to finally returning to 100% of A and held for 3 min to condition the column for the next injection. The total running time was 18 min. The injection volume was 5 μL.

For the HILIC column, the mobile phase was water 5 mM ammonium formate and 0.01% formic acid (solution A) and acetonitrile:water 95/5 (v/v) 5 mM ammonium formate and 0.01% formic acid (solution B). The elution gradient had a flow rate of 0.4 mL/min and started with 95% of B and was held for 2 min. It was then decreased to 70% in 7 min and 50% in another 2 min. The percentage was held for 4 min to return to the initial percentage in 0.1 min and equilibrated during 10 min. The total running time was 25 min. The injection volume was 5 μL.

The chromatographic system was coupled to a QTOF mass spectrometer (Maxis Plus, Bruker Daltonics[®]) with electrospray ionization interface (ESI) operating in positive and negative mode. The following settings were used: capillary voltage of 3600 V, end plate offset of 500 V, nebulizer pressure of 3 bar (N₂), drying gas of 9 L/min (N₂), and drying temperature of 200°C. A solution of sodium formate and acetate (10 mM) clusters was used for external calibration at the beginning of each run. The analysis was performed in a full scan over the mass range of 50–1,000 daltons (Da) with a scan rate of 1 Hz. Moreover, the analysis was carried out in profile mode with the following transfer parameters: funnel 1 RF of 200 Vpp, multipole RF of 50 Vpp, quadrupole energy of 5 eV, collision energy of 7 eV, stepping basic, and a pre-pulse storage of 5 ms. The instrument resolution was estimated at 21,244 (full width at half maximum, FWHM) at $m/z = 415.211$.

All samples and quality controls (QCs) were injected in the MS mode. QC was prepared by mixing 5 μL of each sample and was injected every 13 samples, so as to represent a ratio sample/QC of 10%. The data-dependent acquisition (DDA) mode was conducted twice on the QC to obtain MS/MS spectra. It was performed with a cycle time of 3 s and a spectral rate between 2 Hz and 16 Hz in order to record low and high intensity precursors. The samples were analyzed randomly to ensure the representativeness of the results.

The software used for instrument control and to acquire data in positive and negative mode for both chromatographic platforms were OTOF control 4.1, Hystar 4.1 (Bruker Daltonics[®]), and Data Analysis[®] 4.4. Preprocessing data (including bucketing, filtering, scaling, and data normalization) and alignment were performed with the algorithm Time aligned Region complete eXtraction 3D (T-Rex 3D) of Metaboscape 4.0 (Bruker Daltonics[®]). The principal parameters used to create the bucket tables were: Intensity threshold = 5,000 counts; minimum peak length = 7 spectra; perform MS/MS import, group by collision energy; retention time window (min) = 0.4–15; mass window (m/z) = 60–1,000; electron ion collider (EIC) = 0.8; Ions = H⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, –H₂O+H⁺ in positive mode and Ions = H⁻, 2H⁻, 2H⁻+Na⁺, Cl⁻, H⁻+HCOOH. The bucket tables contained information regarding retention time, ion m/z ratio, neutral mass, detected ions, MS/MS spectrum, and relative peak intensity of features in each sample.

Untargeted Analysis and Annotation Workflow

Multivariate procedure used data of four analyses for all samples and the QCs. Features present simultaneously in QCs and in at least two samples of each group of animals were conserved (7,744 out of 11,168). Data retrieved from each type of metabolomics analysis (HILIC and C₁₈ in both negative and positive mode) were combined and used to perform an unsupervised principal component analysis using the R package ade4 (R Development Core Team). The first four components were tested for sample discrimination and measuring the quality of our analytical procedure.

To determine relevant features for the analysis and sample discrimination, we calculated adjusted p -value (false discovery rate, FDR) with the Benjamini-Hochberg method. Fold change and p -value between groups were used to build volcano plot and represented which features were significantly different between group (FDR at least <0.05) using the R package EnhanceVolcano (Blighe 2018).

For compound annotations, we selected putative compounds based on a mass deviation inferior to 5 ppm. The discovered formulas were from different databases (analyte DB, ChEBI, ChemSpider, PubChem, HMDB, LIPID MAPS[®]). This process was done using the compound crawler tool, included in MetaboScape 4.0 and the search tools associated to HMDB and LipidMaps website. Priority was given to the compounds arising from biological databases and previously found and quantified in human blood, urine, and feces (Data obtained from HMDB, ChEBI, and LIPID MAPS[®]). All features with putative annotations and MS/MS spectra were then tested for confirmation (see next section). The selection of conserved features was initially carried out at this step. These features and all those putatively annotated where no MS/MS spectra were available were then manually curated through physical and chemical properties of annotated metabolites. XLogP3, LogD at pH = 3.0, Charge at pH = 3.0, Topological surface area and molar mass were taken into consideration. From these data, features with a putative metabolite annotation but a discordant retention time were excluded. When possible, this concordant retention time was verified and cross-validated with both ionization modes (retention time difference <0.01 for a specific chromatography) and eventually one of the feature was excluded from the analysis. Also, we performed the same type of comparison between C₁₈ and HILIC systems (same m/z with concordant RT specific to each chromatographic system) for putative metabolites annotated in both analyses. Moreover, metabolites from a same chemical series (e.g., acylcarnitine, fatty acid) were re-analyzed together to verify the right order of elution according to these properties by using those confirmed by MS/MS as beacons (Figure S1). Finally, when doubts remained between several potential annotations, chemical functions present on the molecules were also used to predict the preferential ionisation mode and exclude unlikely metabolites. Compounds with a carboxylic acid function were for example considered to be preferentially ionized in negative mode, whereas amine, alcohol, and ketone were more likely to be ionized in positive mode.

Metabolite Validation by MS/MS Spectra and Standard

Some of the annotated masses had MS/MS spectra. These experimental spectra were compared to theoretical compounds with the same masses (difference <5 ppm) *in silico* fragmented using MetFrag (MetaboScape) but also to a bank of experimental spectra available in MetFrag. Tested compounds were retrieved preferentially from HMDB, CHEBI, and LIPID MAPS[®] databases, or from PubChem when the number of potential candidates was inferior to

three with the other databases. All potential compounds tested were scored by comparing their *in silico*/bank spectrum to our experimental data and by measuring their internal coverage. An example of *in silico* fragmentation is presented in Figure S2. Annotation was considered validated when its corresponding compounds had the highest score or was in the set of compounds presenting one the highest scores not significantly different [Score > (1.85/2) with score computed from spectral similarity and percentage of internal coverage]. In this case, other parameters were used to finish the validation (presence in biological fluid, RT, preferred ionization mode). Annotations verified by MS/MS validation that were however not sufficient to firmly invalidate other possibilities have been indicated. Finally, to confirm these results, the analytical standards of some compounds with a logical retention time in both columns were purchased. Samples were spiked with these analytical standards and were injected in the same sequence as the unspiked samples in DDA mode with selection of the accurate mass (precursor ion) of the suspected compounds. Then, the extracted-ion chromatogram (EIC) and the MS/MS spectra of the suspected compounds for spiked and unspiked samples were compared. All standard validations (MS/MS and RT comparison) are reported in the Table S1.

ChemRICH, MetaMapp and Hierarchical Clustering Analysis

KEGG ID, PubChem ID, SMILE, and InchiKeys of annotated metabolites were retrieved from public databases (PubChem and KEGG) and used to run ChemRICH and MetaMapp algorithms as indicated in the former publication of these statistical tools (Barretina et al. 2012; Barupal and Fiehn 2017). Adjusted *p*-value and fold enrichment were obtained as indicated previously from the signal intensities associated with the multiple injections of each group of samples. When several features were associated with a same metabolite, we conserved the one with the lowest adjusted *p*-value. ChemRICH analyses were then obtained directly from the ChemRICH interface website, whereas MetaMapp results were loaded in the cytoscape software to represent the network with an organic layout. Presented enrichment plot used Chemical enrichment statistics calculated by the Kolmogorov–Smirnov test. Cluster names were retrieved in an unbiased way from ChemRICH results tables. A couple of clusters could not be directly named by ChemRICH and were in this case curated manually (named through chemical similarity and pathway mapping). All tables associated with these analyses are available in the Table S9–S11.

For hierarchical clustering, Spearman rank correlation and city-block distance were used, respectively, for metabolites and samples sorting. Cluster3 and Java Tree View software were used to generate the clustering and the heat map/tree associated to the result of this algorithm. A table listing the results is available in Table S12.

Sample Preparation for Transcriptomic Analyses and Next-Generation Sequencing (NGS)

RNA extraction for tissue. Total RNA was extracted and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen # 74106) from mouse liver. Furthermore, the RNeasy procedure enriches RNA species >200 nt and excludes 5S rRNA, tRNAs, or other low molecular weight RNAs. RNA was isolated on the silica membrane in trusted RNeasy spin columns, with binding capacities of 100 µg of RNA, according to the supplier's recommendations (Qiagen).

RNAseq library sequencing and analysis. For the preparation of the NGS RNA library, RNA concentration was measured using the GE NanoView Spectrophotometer (Biochrom US). The quality of RNA samples was analyzed using the RNA 6000 Pico

Kit running on the 2100 BioAnalyzer (Agilent). Total RNA was diluted in a final volume of 50 µL for a total input of 1 µg. Only the RNA pools with a RIN score higher than 7 were used in the NGS library preparation prior to sequencing.

mRNAs arising from the pooled livers of 10 animals tested in each group were isolated using the NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module from 1 µg of total RNA. Three analytical preparations were performed at this step. The isolation procedure was based on the selection of mRNA using oligo dT beads directed against polyA tails of intact mRNA. Second, the NGS libraries were created from mRNA isolated using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs). Final libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 on a high output flow cell with 2 × 75 bp paired-end read lengths.

The sequencing reads were obtained after demultiplexing the raw sequencing data using bcl2fastq v2.19.1.403 (version v2.15.0 for NextSeq™ 500 and HiSeq® X Systems; Illumina), after having validated the quality controls of each sample using the FastQC version 0.11.5 software (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The alignment files were generated with STAR version 2.5.2b (University of Birmingham) in the 2-pass mode. We used the GRCm38, version M16 (Ensembl 91) as reference. This mode is known to improve the detection of more reads mapping novel splice junctions.

Gene Ontology and Statistical Analyses of NGS

Genes were filtered through their obtained RPKM. Only genes sufficiently expressed in control conditions were conserved for further analyses (RPKM > 0.2). Principal component analysis (PCA) and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) were performed on the R platform, using ROPLS package and 3D plots for visualization of the results. Gene ontology analyses were performed by using the Eigen values associated with the most significant axis used to construct PCA and OPLS-DA. With these methods, all conditions, namely the three different DPhP concentrations and the vehicle, were thus taken into consideration and simultaneously compared. Threshold for retained Eigen values used to select genes in these analyses are indicated directly in the figures. Functional enrichment analysis (STRING© Consortium 2019) was then performed by sorting the selected genes according to their Eigen values. A volcano plot (R package EnhanceVolcano Plot) was used to represent the discriminating functions for the studied axis through the enrichment score and the false discovery rate generated by the STRINGv11 algorithm. Only significant functions were retrieved.

Alternatively, paired analyses were performed using each concentration of DPhP against the vehicle. In this case, retained genes were selected through the fold change between both conditions. Gene ontology analysis was then performed identically with Functional Enrichment Analysis (STRING© Consortium 2019).

Finally, in a complementary approach, density of the protein networks associated with discriminating functions and encoded by the genes selected with these different approaches were measured through protein-protein association networks (STRING© Consortium 2019). High number of nodes and edges indicate that large functional complexes are disturbed through multiple genetic regulations induced by DPhP exposure, reinforcing the probability of that function being disturbed by this condition. We used high-confidence settings to retain the experimentally validated interactions. A protein–protein interaction enrichment *p*-value was calculated against an identical number of random proteins [PPI enrichment *p*-value (Szklarczyk et al. 2019)].

Bipartite View of Enrichment Network

NetworkAnalysis server (Mc Gill University) was used through the List Enrichment function. Functions belonging to the KEGG database were used and only those with a p -value < 0.03 were conserved (Zhou et al. 2019). Metabolic pathways and carbon metabolism functions were removed due to their very high coverage of the genome. The bipartite view was then selected, and an auto-layout was applied. Clustering between functions was then enhanced through the Force Atlas tool. Clusters were then manually highlighted and default encoding of the functions through their p -value was converted into a continuous green-red scale.

Immunohistochemistry Analyses

For histological examination, liver samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. 4- μ m-thick tissue sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were prepared according to conventional procedures. Sections were then stained with hematoxylin and eosin.

Immunohistochemistry (IHC) was performed on an automated immunostainer (Ventana Discovery XT, Roche) using Omnimap DAB Kit according to the manufacturer's instructions. Sections were incubated for 60 min at 37°C with the following antibodies: Anti-Perilipin2 (AtlasAntibodies-HPA016607), Anti-Hmgcs2 (Santa Cruz-sc-376,092), Anti-PPARalpha (Abnova-MAB12349), Anti-Pck1 (AtlasAntibodies-HPA006507), Anti-FBP1 (Abcam-ab109020) (all diluted at 1:100). An antirabbit/mouse – HRP was applied on sections during 16 min at 37°C. Staining was visualized with DAB solution with 3,3-diaminobenzidine as a chromogenic substrate. Sections were counterstained with Gill's hematoxylin and finally scanned with panoramic scan II (3D Histech) at 20 \times . Scoring was performed by three independent investigators using a staining scale ranging from 0 to 10. The means were then calculated and encoded as follows. 0–2 = no staining to very low staining (–), 2–4 = low staining (+), 4–7 = intermediate staining (++) , 7–10 = high staining (+++).

Statistical Test and Accession Numbers

Statistical tests were performed as indicated in the caption of the figure. Briefly, for simple comparison between two experimental groups, Student's t -test was used. For more complex statistical procedures, test already integrated in the previously described algorithms were conserved without any modification.

Metabolomics data have been deposited to the EMBL-EBI MetaboLights database (doi: 10.1093/nar/gkz1019; PMID: 31691833) with the identifier MTBLS2038. The complete data set can be accessed at <https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS2038>.

Microarray analyses have been deposited in the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO accession number GSE158265.

Results

Correlation Analysis between TPhP/DPhP Exposure and Their Level in Blood and Liver

When 0.1 or 1 μ g DPhP was injected directly into vein-tail or administered by oral gavage, DPhP was readily quantified after 1 h in a dose-dependent manner in whole blood (Figure 1A and 1B). Conversely, in animals exposed to these same concentrations of TPhP, this molecule could not be detected in their blood ($LOD_{TPhP} = 0.7$ ng/mL). After administration of 10 μ g or 100 μ g TPhP, TPhP was only quantified above the LOD in the blood of

two animals at 2.33 ng/mL and 10.20 ng/mL, exposed to 100 μ g following intravenous injection and oral gavage, respectively. In all other animals (18 out of 20 animals), TPhP remained undetected. To determine whether TPhP transformation into DPhP was the reason for the lack of detection of TPhP in the bloodstream, we also quantified DPhP in these same experiments. DPhP could not be detected in the blood of animals treated with 0.1 or 1 μ g of TPhP ($LOD_{DPhP} = 0.3$ ng/mL, $LOQ_{DPhP} = 0.5$ ng/mL). At the highest doses of TPhP (10 and 100 μ g), we were able to quantify DPhP in the blood of animals, but in a level comparable to that obtained after exposure to DPhP a hundred times lower (Figure 1A, 1B). Therefore, the large majority of injected or force-fed TPhP seemed not to have been metabolized into DPhP in the animals.

We further compared these results to a more continuous exposure to both molecules present in the drinking water of animals to mimic their chronic ingestion from swallowed dust. We used 3 concentrations of 0.1 mg/L (C1), 1 mg.L⁻¹ (C2) and 10 mg/L (C3), equivalent to 0.5 μ g, 5 μ g, and 50 μ g of each molecule ingested overnight (active period for mice). These quantities were comparable to those used with other routes of exposure previously given through oral gavage or vein-tail injection. At the two highest concentrations, DPhP was still dose-dependently quantified in whole blood with lower concentrations measured than those obtained previously (Figure 1C). This finding was expected because the dose was now spread over a much longer period. Conversely, we did not record any measurable amount of TPhP in animals exposed to this same molecule through drinking water ([TPhP] $< LOD$). Most important, the amount of DPhP retrieved from the whole blood of animals exposed by this route to TPhP was not significantly different from those of animals treated with the vehicle (Figure 1D).

Because the liver is the first organ to process exogenous molecules absorbed from the digestive tract, we further determined whether these molecules were present in this organ using the same exposure doses via drinking water. DPhP was detected and quantified in a dose-dependent manner at all concentrations tested (Figure 1E). Conversely, neither TPhP nor DPhP were measured at a significant different amount in the liver of mice exposed to TPhP or the vehicle through drinking water ([TPhP] $< LOD$ for all animals and Figure 1F).

Bioaccumulation and Distribution of DPhP in Chronically Exposed Mice

Based on these analyses, we next focused on the consequences of chronic exposure to DPhP. Mice were exposed daily to similar doses (C1, C2, or C3) of DPhP in their drinking water over a 12-wk period. We analyzed four tissues, namely whole blood, the liver, visceral fat, and the mammary glands, potentially presenting a tropism for the molecule, either due to their chemical characteristics (presence of hydrophobic constituent for mammary gland and visceral fat) or to the route of exposure used for these experiments (whole blood and liver). In the blood, DPhP concentrations were significantly higher in all animals chronically exposed to DPhP in drinking water at 1 mg/mL and 10 mg/mL in comparison with control animals (Figure 2A). DPhP was also measured in the liver, visceral fat, and mammary glands at all tested concentrations in a dose-dependent manner (Figure 2B–D). These results confirmed the ability of chronically ingested DPhP to reach various tissues in mice.

Biological Effects of Exposure to DPhP through Metabolomics Analyses of the Liver

Because DPhP was abundant in the liver of all treated animals, we focused our subsequent experiments on this organ to measure the possible biological consequences of the presence of DPhP in

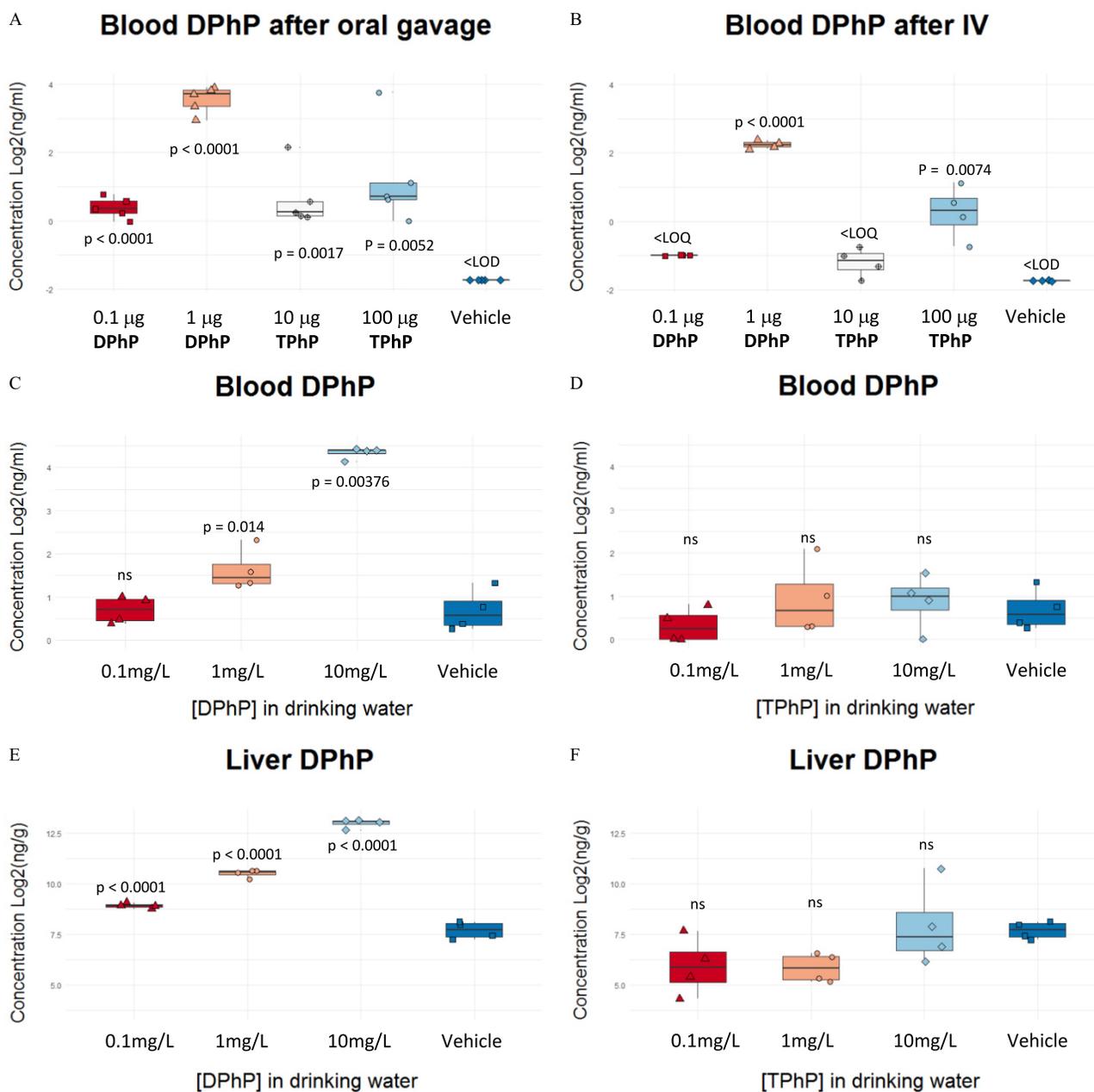


Figure 1. Acute exposure to DPhP and TPhP. (A–D) Four or 5 animals were exposed to the indicated doses of DPhP or TPhP via the indicated routes. After 1 h, DPhP was quantified from the whole blood of each animal. Concentrations obtained have been plotted on the box-and-whisker plot, indicating significant *p*-values between tested conditions and the vehicle (Student's *t*-test). (E–F) Identical experiment with DPhP quantification performed on liver extracts from each animal. (Midline = median, box limits = 1st and 3rd quartile, whiskers = largest, and smallest value within 1.5 × the interquartile range. Summary data in Table S25.) Note: LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; ns, nonsignificant.

this tissue. The metabolite profile of each group [untreated control (CTRL) or treated with three doses (C1, C2, or C3) of DPhP] was obtained with two chromatographic methods (C18 and HILIC) using two ionization modes for the mass spectrometry analyses of eluted metabolites.

Unsupervised PCA was first performed with features present simultaneously in QCs and samples (7,744 out of 11,168 by combining all acquisitions). The consistency of our analytical process was verified by confirming the spatial clustering of QCs on the first four principal components (PCs) (Figure 3A) and their intermediate position in comparison with real samples as expected from their preparation (see “Methods”). Acquired metabolic profiles discriminated the four groups of samples even for the lowest

concentration C1. An interesting finding was that samples corresponding to C2 and C3 were clearly not separated by the same PCs. PC1–2 strongly discriminated C2 from CTRL, whereas C3 was only separated from the CTRL using PC3–4. Therefore, two sets of metabolites were differently altered by DPhP according to concentration at which it was administered.

All features were further annotated at this stage through three procedures of validation (see methods). A total of 633 metabolites were conserved from this process (Tables S2–S8) with their level of validation and their co-occurrence in the different types of acquisitions indicated in Figure 3B,C and the Tables S2–S5. Volcano plot representations were then used to compare each treated group to control animals for each type of chromatography

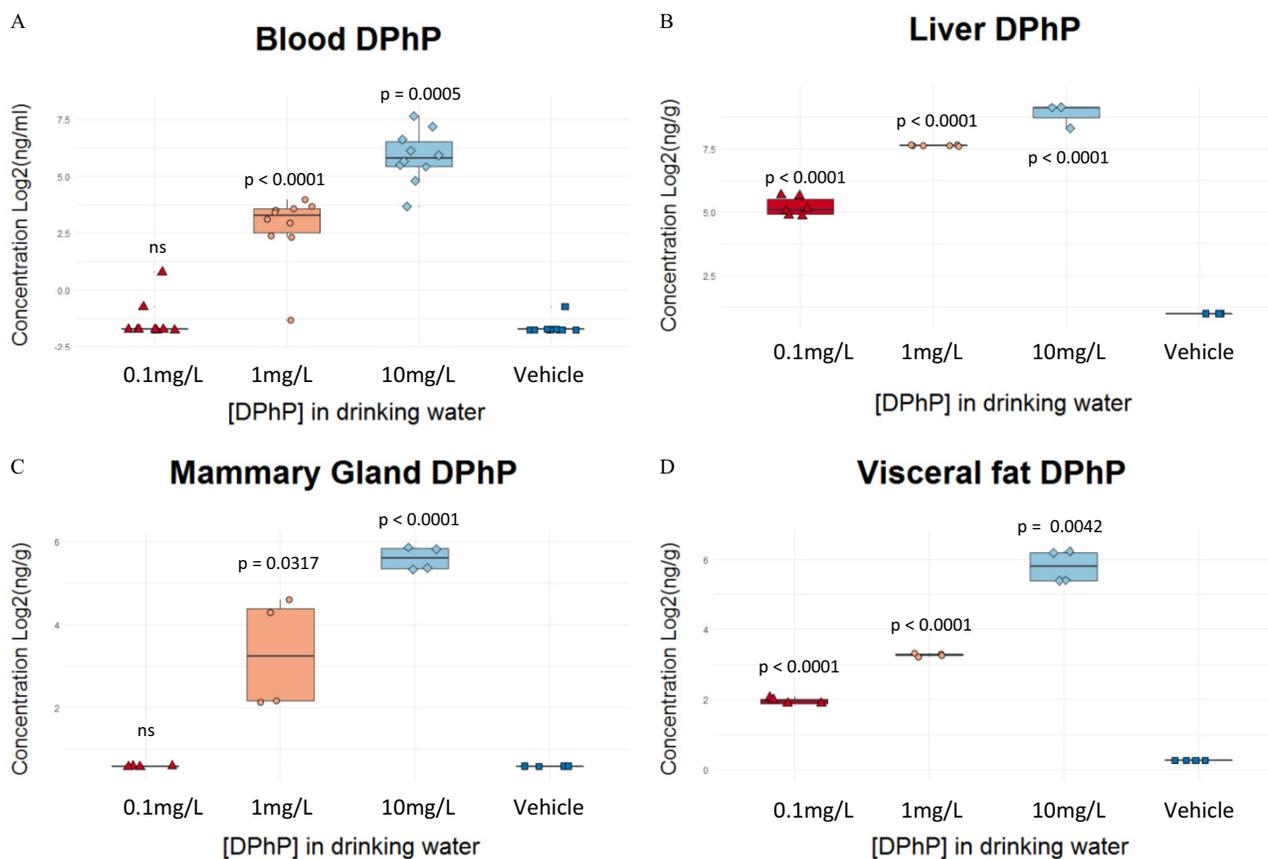


Figure 2. Chronic exposure to DPhP. (A–D) Ten animals were chronically exposed to the indicated concentrations of DPhP for 12 wk through drinking water. DPhP was then quantified in the indicated biological tissue. Blood of each animal was analyzed separately, whereas analytical replicates were performed from pooled tissue extracts. Concentrations obtained have been plotted on the box-and-whisker plot indicating significant *p*-values between tested conditions and the vehicle (Student's *t*-test). (Midline = median, box limits = 1st and 3rd quartile, whiskers = largest, and smallest value within $1.5 \times$ the interquartile range. Summary data in Table S26). Note: ns, nonsignificant.

and ionization to capture potential features and metabolites present in several analyses and thus highly relevant (Figure 3D–G and S3A–SD). From this first analysis, we noted that a subset of acylcarnitines, key metabolites of fatty acid degradation, were significantly depleted in exposed animals at all concentrations when compared to those in vehicle-exposed animals. An important observation was that this effect could be observed with both types of chromatography confirming the robustness of the identified modification. From these first hits, we decided to perform an in-depth analysis combining our 633 annotated metabolites. Due to the heterogeneity of these metabolites and, for some of them, their non-appurtenance to the endogenous metabolism, we performed an initial comparison based on their chemical ontology that can be represented through a circular tree plot of annotated compounds (Figure 4A and S4A and SB). This type of analysis was shown to eliminate bias due to incomplete mapping and network size heterogeneity (Barupal and Fiehn 2017). Moreover, it is weakly sensitive to isomer confusion belonging to a similar chemical series, providing some flexibility for the analysis of highly similar metabolites (e.g., phospholipids) with incomplete validation. From this statistical analysis, an enrichment plot could be built, displaying the significance of the observed change for structural homologies, the size of the cluster, and the homogeneity of their variation (Figure 4B, Figure S4C and S4D, and Table S9–S11). In line with the multivariate analysis, the intermediate concentration C2 induced the largest number of altered chemical clusters. Among the different disturbed clusters, acylcarnitines were the most affected in liver extracts at all DPhP doses. Lower levels of ethyl

and choline-esterified fatty acids were also highlighted using this analysis. An important finding was that clusters associated with ketone bodies usually produced from fatty acid degradation also showed a uniform lower level of these ketone bodies after exposure to DPhP. Finally, multiple metabolic pools without clear functional connection with acylcarnitines were also altered.

Stress markers, such as *N*-acylethanolamides were homogeneously more concentrated in extracts from exposed animals. Conversely, sulphated phenol group, 3-oxosteroid and bile acids were more specifically disturbed in the C2 group of samples, whereas groups of metabolites such as those containing a naphthalene or an indole ring showed perturbations with opposite directions between C2 and C3. Next, to determine how these different clusters were organized around endogenous metabolic networks, we combined chemical and biochemical mapping in a joint analysis using the MetaMapp algorithm (Barupal et al. 2012) (Figure 4C and S4E and S4F). Strong connections were observed among the reduced concentration of acylcarnitine, ketone bodies, and the esterified fatty acids in treated animals. An important finding was that metabolites highlighted by the previous analyses and related to other fatty acid derivatives were globally weakly altered (most phospholipids, unsaturated fatty acids), even if their concentration was statistically significantly different. However, some exceptions could be noted for instance for the main lysophosphatidic acid (16:0/0:0). Other clusters of metabolites were more scattered in the network and less well connected. Subnetworks were however present, such as the steroids, clearly less concentrated in exposed animals, especially in the C2 group.

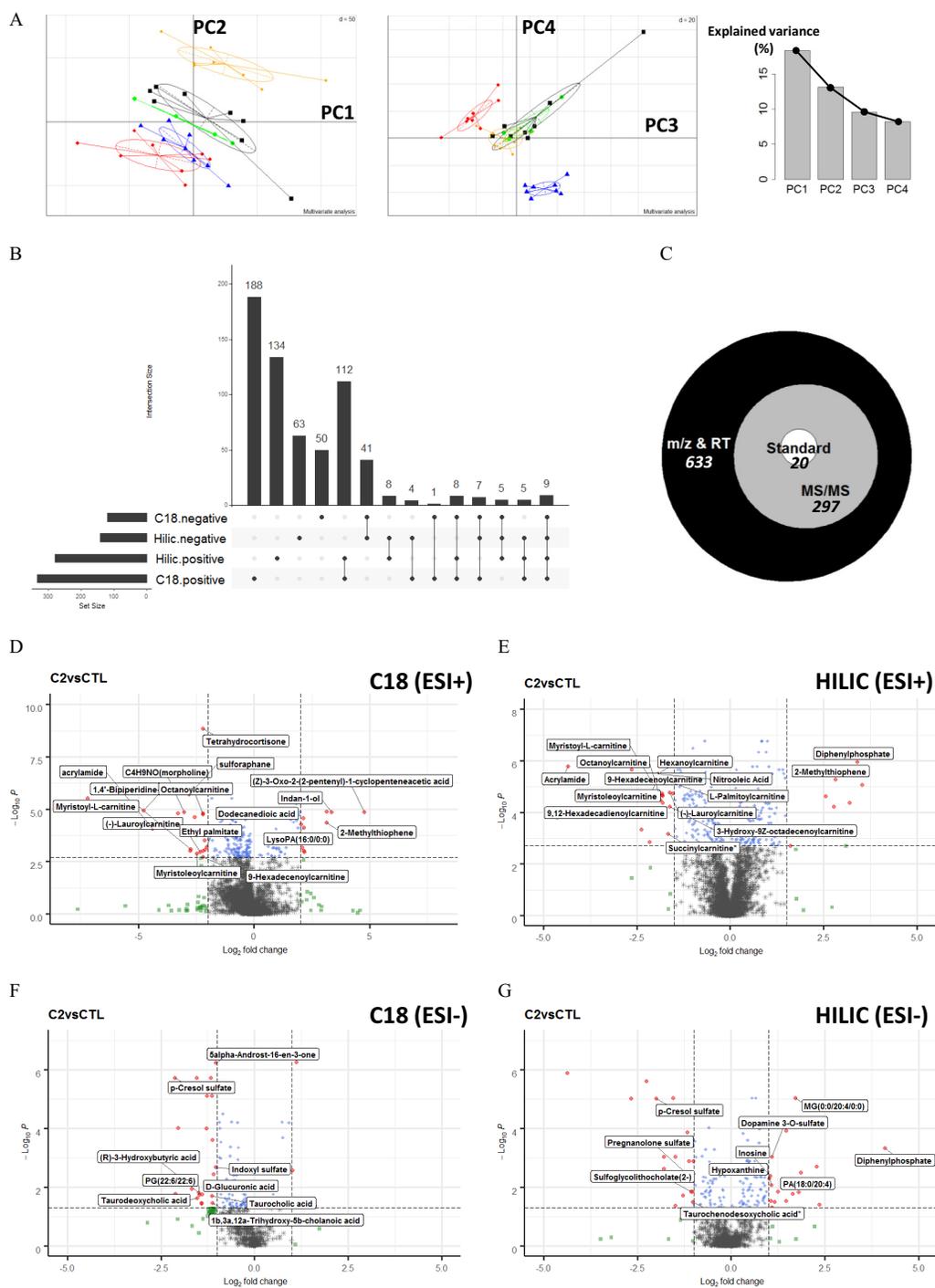


Figure 3. Hepatic metabolomics analysis of animals exposed to DPhP. (A) Principal Component Analysis (PCA) was performed to discriminate groups of samples based on the amount of retained ion m/z (see “Methods”). Explained variance with the four first axes has been indicated. Red diamond-shaped = CTRL, Black square = C1, orange small circle = C2, blue triangle = C3, green large circle = QC. (B) An UpSet plot was calculated reporting the number of metabolites annotated in each analytical procedure and the number of each type of co-occurrence between these procedures. (C) An Euler diagram was created reporting the number of annotated metabolites and their level of validation (expected RT and m/z , MS/MS, spiked chemical standard). (D–G) Volcano plots were created through observed median fold change and adjusted p -value algorithm, comparing the metabolite level for the C2 group used against control values for each type of indicated analytical platform. Most significant metabolites were annotated when possible and indicated directly on the plot. Cutoff for fold change/adjusted p -value = 4/0.002 for (D), 3/0.002 for (E), 2/0.05 for (F), and 2/0.05 for (G).

Similarly, disturbed pools of homocyclic aromatic compounds usually corresponding to xenometabolites were also spatially clustered. Moreover, perturbation of indole-related molecules normally connected to tryptophan and nicotinamide metabolism was confirmed through this analysis.

We performed a hierarchical clustering of our annotated metabolites associated with their measured level in each condition, the aim being to combine on the same graph the results obtained with the different concentrations of DPhP used. It is interesting to note that this analysis performed with only 633 features clearly

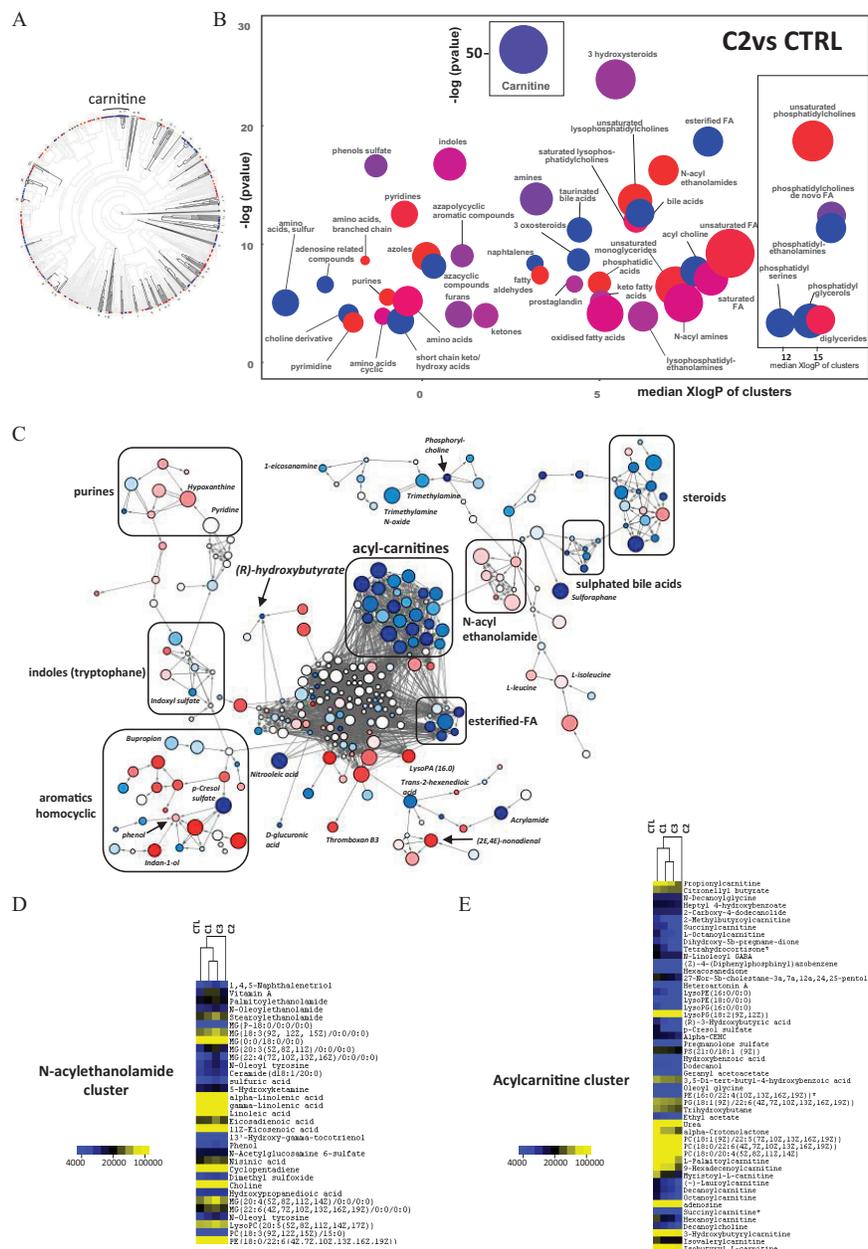


Figure 4. Metabolic network analysis through structural identity and pathway mapping. (A) Data associated with 635 annotated metabolites were used to perform a Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH). A Tanimoto chemical similarity mapping form a clustered circular similarity tree. Dark black lines indicate boundaries of clusters that were significantly different in exposed animals at the concentration C2 vs. control mice ($p < 0.05$). Higher metabolite levels in DPhP-exposed mice (compared with those exposed to vehicle) have been labeled as red nodes; lower levels have been marked in blue. Acylcarnitine Cluster label has also been indicated. (B) ChemRICH set enrichment statistics plot for the same metabolites as (A), extracted from exposed animals with the C2 concentration of DPhP vs. control. Each node reflects a significantly altered chemical cluster of metabolites. Enrichment p -values have been obtained using the Kolmogorov-Smirnov test, and median XlogP3 is calculated from individual value associated to each metabolite present in the cluster. Node sizes represent the total number of metabolites in each set of clusters. Continuous scale color for the nodes shows the proportion of fully increased (red) or fully decreased (blue) family of compounds in exposed mice compared to control mice. Nodes with an intermediate color (pink to purple) have both increased and decreased metabolites. (C) MetaMapp visualization of the same metabolomics data highlighting the differential metabolic regulation and the organization of metabolic clusters based on KEGG reactant pair information and Tanimoto chemical similarity matrix. Only metabolites significantly different (adjusted p -value < 0.05) are used to build the network. Metabolite levels that were higher in exposed mice have been labeled as red nodes; those with lower levels have been marked in blue (continuous scale with white intermediate). p -Values are encoded in node size (lowest p -value = highest size). Cluster label has been indicated. Metabolites previously clustered together based on their structural similarity could now be separated according to their different pathway mapping. (D–F) Identical data obtained for the same 633 metabolites and the 4 groups of exposed and control animals were clustered hierarchically through their relative level (centroid linkage with Spearman correlation (metabolites) and city-block distance (samples)). Features corresponding to a same metabolite present in different analytical procedure have been left separated, explaining why a metabolite can appear several times in the heat map. Yellow-blue encoding has been used to represent these metabolites according to their absolute amounts. Distance between levels of sample and metabolites have been shown as two tree plots. The complete heat map is presented in the Figure S5. Subclusters containing metabolites globally less present in exposed animal such as the acylcarnitines, (*R*)-3-hydroxybutyric acid have been highlighted and enlarged in the indicated left-hand panels. Similarly, a subcluster containing metabolites more present in the C1–3 groups such as *N*-acylethanolamide is presented in the right-hand panel.

discriminated the three exposure conditions from the control, C2 group being the most different as observed with the PCA that was based on the entire data set of detected mass (Figure S5 and Table S12). Careful inspection of the obtained clusters confirmed lower concentrations of the acylcarnitine pool and the ketone bodies in exposed animals, even with the lowest dose of DPhP and without a clear dose-dependent response (Figure 4D and S5). The ethyl-esterified form of the most common fatty acids (palmitate, linolenate, oleate) were also present in this cluster. Furthermore, we noted the same variation for trans-2-hexenedioic acid, a metabolite associated to the β -oxidation and the degradation of fatty acid. Conversely, a cluster highlighted a group of more concentrated metabolites in all treated animals (Figure 4E). As expected from previous analyses, *N*-acylethanolamides were present in this cluster as well as several polyunsaturated fatty acids (linolenic acid, linoleic acid, eicosadienoic acid). Also, several monoacylglycerols were more concentrated in liver extracts of exposed animals, most of them being polyunsaturated.

Finally, from the previous analysis, we looked for position of homocyclic aromatic compounds and indole-derivative. These compounds were more scattered in the hierarchical tree (Figure S5 and Table S12). However, sulphated derivatives were globally less concentrated in exposed animals (phenol sulfate, *p*-cresol sulfate, indoxyl sulfate). At the opposite, the picture for nonprocessed forms of homocyclic aromatic compounds and indole-related compounds was more complicated. Phenol and 1,4,5 naphthalenetriol displayed for example a classic dose-response relationship (Figure 4D). Several indole-related compounds behaved differently between low C1/C2 dose and high C3 dose where they were markedly less concentrated (indole-3-carbinol, indole-3-acetamide, indole-3-carboxaldehyde, quinolin-2-ol). At the opposite, 5-hydroxyindole and indole-3-ylacetaldoxime were homogeneously less concentrated in exposed animals in comparison of the control.

In a final experiment, the robustness of observed differences was assessed by comparing observed fold change between the different analytical chromatography techniques. This analysis focused on acylcarnitines because they were the most altered metabolites. A strong correlation was evident between both chromatographic systems, globally for all annotated metabolites and more specifically for acylcarnitine (Figure S6). An important finding is that the same results were observed for metabolites connected to acylcarnitines such as fatty acids and ketone bodies (Figure S7).

Biological Effects of DPhP Exposure through Transcriptomic Analyses of the Liver

The second part of the dual-omics analyses was performed on four distinct batches of 10 animals untreated or treated chronically with one of the three DPhP concentration C1, C2, or C3 during 12 wk. mRNAs were extracted from pooled liver of each group and analyzed by NGS using four analytical replicates. Genes were then filtered, and those displaying a mean RPKM > 0.2 in the control condition were conserved (Table S13). PCA was performed using the mean expression associated with the four experimental conditions. When the first axis was considered, the three treated conditions were significantly different from the control, the most discriminating treatment being associated with the intermediate C2 concentration of DPhP (Figure 5A, left panel). Interestingly, this pattern was correlated with the metabolic difference observed, because this concentration had the greatest effects. We noticed that 44% of the total variance was attributable to the first axis (Figure 5A, right panel), indicating that the genes with the highest Eigen values on this axis were the most relevant for the biological effects of DPhP. We consequently selected these most discriminating genes (Table

S14, Eigen value > 0.3) and performed a gene ontology analysis using the STRING software (version 11). For the analysis, genes were ranked according to their Eigen value for generating a functional enrichment score/false discovery rate, then used to construct a volcano plot (Figure 5B and Table S15). Among the highly depleted processes in the exposed vs. control conditions, those related to lipid metabolism and more specifically to fatty acid oxidation represented the largest part of altered functions. However, we also noticed a significant inhibition of genetic responses associated with xenobiotic metabolism. Moreover, when we retrieved the gene list associated with the fatty acid catabolic process, and selected the most discriminating genes in our dataset (Eigen value > 0.3), we confirmed that these genes encoded functional protein networks related to mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation with a very high confidence rate (Figure 5C). Since fatty acid oxidation is strongly regulated by the PPAR transcription factor, we verified that PPAR signaling was also among the significant terms associated with our ranked gene list (Figure 5D). The network reconstructed from this last term demonstrated that PPAR α target genes were at the heart of the dysregulation process.

Next, we verified for each treatment dose that the same trends were observed by comparing their RPKM values to those of the control. In this case, we directly used the calculated fold change of genes with an RPKM value > 0.2. Based on an identical approach combining a volcano plot and a protein network reconstruction for each analysis, we observed that genes related to fatty acid oxidation and lipid catabolism were expressed at lower levels in treated animals, independently of the doses used (Figure S8A–C and S9A–C, Tables S16–S18). The enrichment scores of the observed differences increased according to DPhP doses, whereas the density of the protein network encoded by genes altered and related to lipid catabolism was the highest with the intermediate concentration (edge and node numbers, see methods).

Finally, to exclude a possible artifact arising from poor analytical replicates, we performed a PCA and an OPLS-DA analysis with the individual RPKM values of the 16 analytical samples (instead of the mean expression for each group) and compared each treated group with control animals. Adequate separation between replicates was obtained by using the second, the fourth, and the fifth axis of the PCA (Figure 6A). For each principal component, we retrieved the Eigen values and performed a gene ontology analysis with these scores (Tables S19–S21). Using the second axis in which C2 is the most distant from the control, this analysis confirmed the lower expression of genes controlling fatty acid catabolism in samples arising from animals exposed to DPhP compared with those exposed to vehicle (Figure 6B). An interesting result is that, by analyzing the two other components, we noticed that the lowest DPhP concentration also led to the higher expression of genes related to tryptophan and xenobiotic metabolism (Figure 6C).

Finally, we observed that the highest concentrations of DPhP also induced a stronger expression of genes associated with the synthesis of sterol-derived metabolites, indicating a more complex alteration of lipid metabolism (Figure 6D). To improve sample clustering, we then tested by OPLS-DA all possible combinations able to discriminate our four groups of replicates, using the control replicates as negative controls. Four predictive components were determined (Table S22), three of which were plotted as indicated in the Figure 6E and confirmed the reliable separation of the different groups of replicates. The predictive component 3, classifying the samples in a dose-response manner was then used to build a bipartite view of the enrichment network associating the 2,000 most relevant genes to this component and the KEGG function related to these genes (Figure 6F and Tables S23, S24). The network highlighted two interconnected clusters

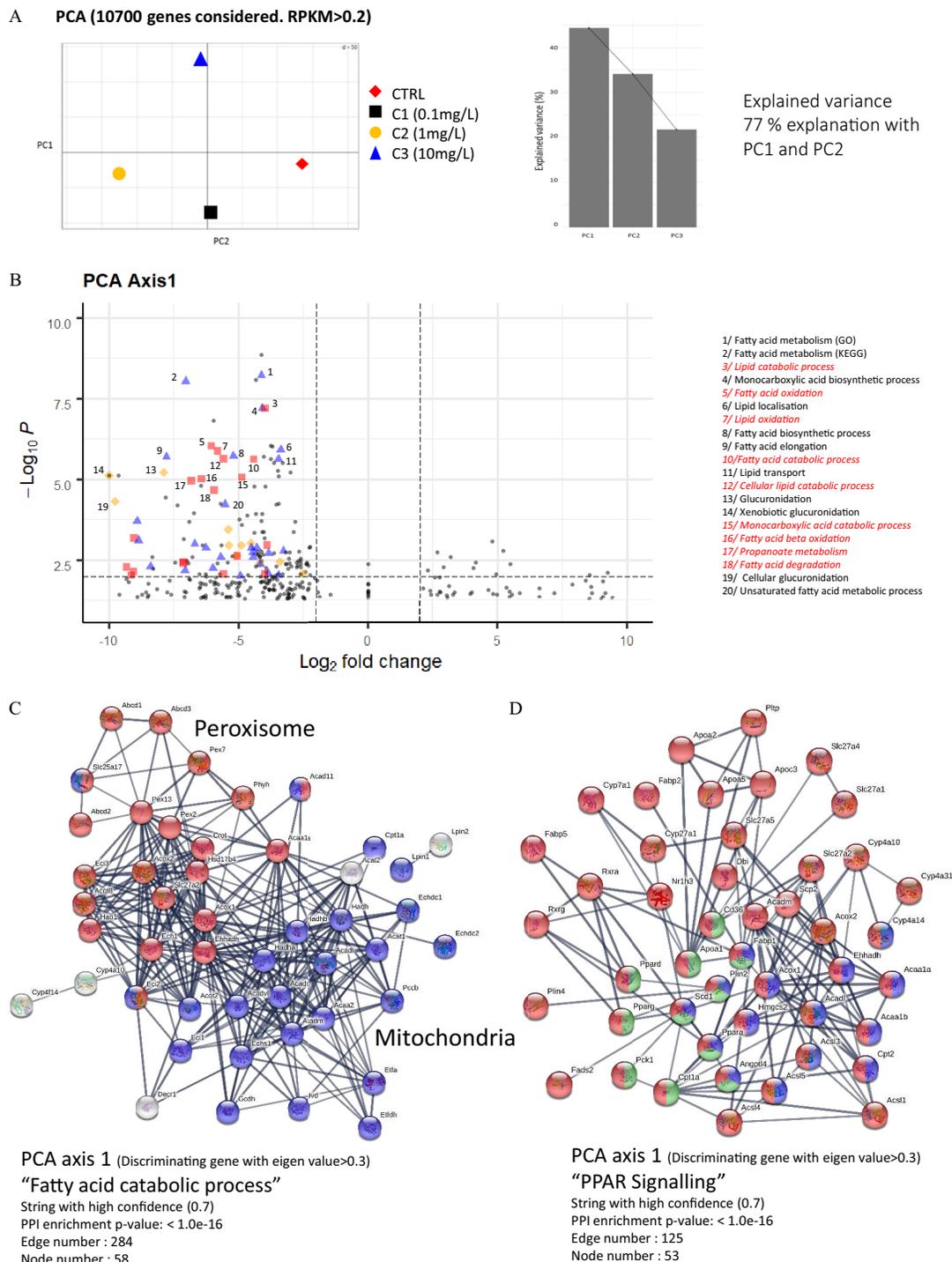


Figure 5. Transcriptomic analysis of livers belonging to animals exposed to DPhP. (A) Principal component analysis (PCA) was performed using pareto algorithm as an observatory method to discriminate group of sample replicates based on the amount of mRNA expression obtained from indicated animals, through reverse transcription and next generation sequencing (NGS). Considered genes and explained variance with the two first axes of the PCA have been indicated. (B) Gene ontology analysis of the most discriminant genes (Eigen value > 0.3) used to build the first axis of the previous PCA performed through functional enrichment analysis (STRING Consortium 2019). Results have been presented as a volcano plot of the significant discriminating functions associated with this principal component. Term related to lipid oxidation (red square), lipid metabolic processes (blue triangle), and xenobiotics metabolism (yellow diamond) have been highlighted as indicated. The highest significant functions belonging to these terms have been listed in the right-hand panel. (Cutoff for fold change/adjusted p -value = 4/0.01). (C) Identical genes with a significant Eigen value (>0.3) and overlapping the indicated GO term were used to build a protein–protein interaction network (STRING© Consortium 2019) with a high level of confidence setting. Genes belonging to a particular organelle network have been highlighted in blue (mitochondria) and red (peroxisome). Numbers of edges and nodes have been indicated, as well as Protein-Protein-Interaction (PPI) enrichment (see “Methods”). (D) Identical genes with a significant Eigen value (>0.3) and overlapping the indicated GO term were used to build a protein–protein interaction network (STRING© Consortium 2019) with a high level of confidence. Genes belonging to a particular network of organelles have been highlighted in blue (PPAR α specific target genes), green (PPAR γ specific target genes) and red (any PPAR target gene). Number of edges and node numbers have been indicated, as well as PPI enrichment (see “Methods”).

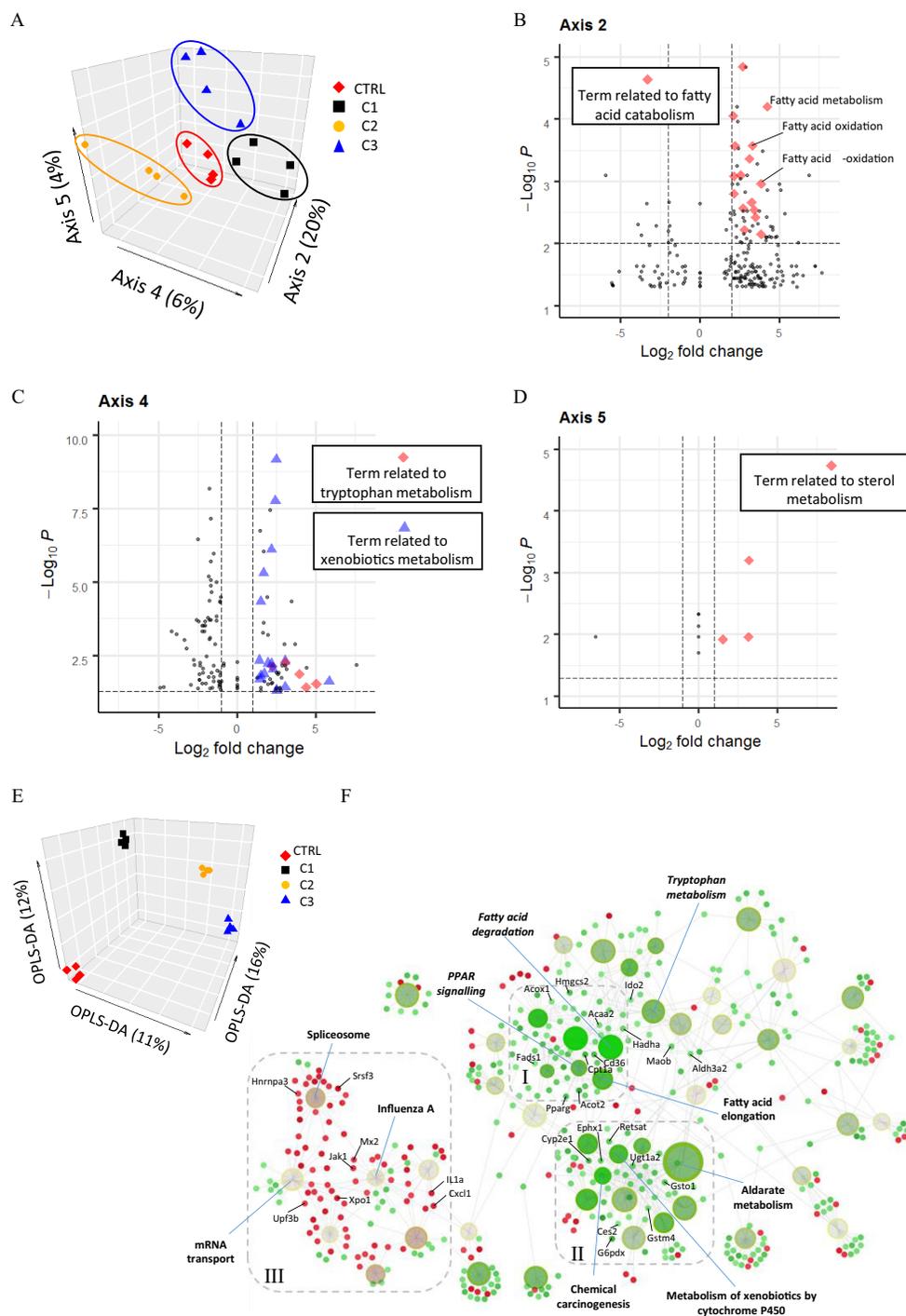


Figure 6. Transcriptomic functions significantly associated with each group of exposed animals. (A) principal component analysis (PCA) was performed using pareto algorithm as an observatory method to discriminate individual sample replicates based on the amount of mRNA expression obtained from indicated animals, through reverse transcription and Next-Generation-Sequencing. Individual replicates could be grouped efficiently through the indicated PCA axis. (B–D) Gene ontology analysis of the most discriminating genes (Eigen value > 0.3) used to build the indicated axis of the previous PCA performed with STRING. Results have been presented as a volcano plot of the significant discriminating function for the indicated axis. Note that axis 2, axis 4, and axis 5, respectively, correspond to this order of gene expression, $C2 < C3 < C1 < CTRL$, $CTL = C2 = C3 < C1$, and $CTL < C1 = C2 < C3$. Cutoff for fold change/ p -value = 4/0.01 for (B), 2/0.05 for (C), and 2/0.05 for (D). (E) Orthogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis (OPLS-DA) analysis was performed to discriminate individual sample replicates based on the amount of mRNA expression obtained from indicated animals, through reverse transcription and Next-Generation-Sequencing, and in a supervised manner. A 3D dot plot has been presented showing the efficient replicate clustering and the discriminating power attributed to the first three predictors. (F) Using the predictor (x axis) that classified the samples in a classical dose–response, a bipartite view of enrichment network based on the 2,000 most discriminating genes is represented. Small dots and large dots represent individual genes and enriched functions (KEGG based), respectively. Genes or functions have been encoded by a green-red continuous scale according to their fold change or their p -value, respectively, as well as the direction (repressed–activated) of the regulation. Dot size of the functions represents the percentage of genes used and matching the full list associated to this function in the KEGG database. Three clusters of functions are highlighted: I = Lipid metabolism, II = Xenobiotics responses, III = mRNA metabolism and acute phase response. Note: CTL, control.

of genetic programmes repressed in a dose-dependent manner by DPhP, namely fatty acid metabolism and the xenobiotic response. Conversely, one cluster was related to weakly activated functions belonging to the control of mRNA processes and the acute phase response. The fatty acid cluster encompassed highly significant programmes related to fatty acid oxidation, peroxisome, and PPAR transcriptional response (Figure 6F). Moreover, fatty acid biosynthetic processes such as fatty acid elongation also contributed to this large cluster, these latter functions being inhibited by DPhP treatment. Similarly, the xenobiotic cluster included several types of xenobiotic responses, such as those related to the cytochrome P450, the glucuronidation through the aldarate metabolism, or glutathione metabolism. Last, although not present directly in these clusters, we confirmed that the genetic program controlling the tryptophan metabolism was repressed by increasing doses of DPhP and established the existence of a genetic connection (*Maob*, *Hadh*, *Aldh3a2*, etc) between this response and the two previously mentioned repressed clusters.

Liver Protein Expression and Physiological Analysis in Mice Treated Chronically with DPhP

To further investigate the observed abnormalities in the processes related to lipid catabolism and PPAR α signaling, we performed a series of IHC analyses revolving around key enzymes of liver physiology, involved in fatty acid catabolism and ketone body formation. In addition, we stained the lipid droplets using Perilipin 2 staining, a protein surrounding these vesicles and correlated with their abundance (Straub et al. 2013). Furthermore, we analyzed enzymes controlling the gluconeogenesis to verify that an overall nonspecific dysregulation of liver metabolism did not appear following DPhP treatment (Figure 7A). Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase1 (PCK1), an important enzyme for gluconeogenesis was thus not lower and was even higher in some animals after DPhP exposure. Conversely, the expression of *Hmgcs2*, a kernel PPAR α target gene, controlling the ketone bodies synthesis from fatty acid oxidation was strongly inhibited compared with control, even at the lowest dose of DPhP (Figure 7A). Therefore, only specific enzymes were altered after DPhP exposure. This inhibition occurred more specifically in the peri-portal area, where *Hmgcs* is normally more strongly expressed and active (Figure 7B and S10A). At the highest dose, 100% of animals presented this physiological alteration. Interestingly, this weaker expression of HMGCS2 was highly correlated with a lower amount of lipid droplets in animals exposed to 10 mg/mL of DPhP (Figure 7A–C and S10B). However, this was not the case for the lowest doses where the amount of Perilipin 2 staining was more intense upon exposure to DPhP, demonstrating here that lower levels of acylcarnitine in these conditions was not the consequence of a general depletion in lipid stores. Counterintuitively, PPAR α staining was also uncorrelated with *Hmgcs2* expression because exposed animals displayed a stronger nuclear and cytosolic expression (Figure 7A).

Finally, because all of our results highlighted a disturbance in lipid metabolism, we collected the data obtained from animals used for the metabolomics and the transcriptomic analyses to construct the growth curve of these animals according to their overall weight gain. No significant difference was observed at the lowest doses, but a trend for weight loss was clearly evident in a dose-dependent manner (Figure 7D). Moreover, weight was significantly lowered in animals treated with the highest dose of DPhP.

Discussion

Only few studies have been conducted to directly test the effect of DPhP, the most common APE derivative in human samples. Our results showed that at least in mice, DPhP levels in

biological fluids are unlikely to represent a surrogate of direct APE ingestion. We demonstrated that even through direct and acute exposure by IV or oral gavage, only a minor fraction of a parent APE such as TPhP were converted *in vivo* into DPhP. Moreover, during an overnight exposure to low TPhP concentrations in drinking water, conversion of TPhP into DPhP could no longer be measured. *In vivo* DPhP may thus be a surrogate of spontaneous degradation of APEs in the environment, suggesting that experimental procedures revolving around DPhP are likely more relevant for assessing APE toxicity.

Using a dual-omics analyses approach based on this strategy, our results demonstrated that in mice, DPhP exposure, even at doses close to the lowest doses encountered in the environment, disturbed important parameters associated with the control of liver metabolism. A substantial body of evidence consistently pointed toward a dysregulation of lipid catabolism. As a key result, we observed an important perturbation, in terms of intensity and distribution, of the acylcarnitine pools, the main metabolites associated with the degradation of fatty acids by β -oxidation. Moreover, additional modifications could be connected to this perturbation, reinforcing the likelihood that DPhP induced alteration of lipid metabolism. The most important of them was the simultaneous reduction of ketone bodies, especially (*R*)-3-hydroxybutyric acid, the final product of this synthetic pathway. Indeed, ketone bodies are typically produced from fatty acid oxidation during fasting (Grabacka et al. 2016), their diminution supporting a lower activity of this pathway. In addition, small dicarboxylic acids such as the *trans*-2-hexenedioic acid, known for a long time to be excreted in correlation with fatty acid oxidation activity (Tserng and Jin 1991), were also less concentrated in liver extracts of exposed animals. Finally, even if we could not confirm a significant modification in the main endogenously produced free fatty acids, we noted that acylcholine and ethyl-fatty acids, two of their esterified forms produced nonenzymatically from available fatty acids, were significantly depleted in liver extracts of exposed animals. Similarly, in phosphatidylcholine, the occurrence of even fatty acid chains produced endogenously was reduced in favor of odd and polyunsaturated carbon chain. These observations suggested that fatty acid production was also likely to be altered.

Aside from metabolic evidence, our results demonstrated that the genetic programs associated with the oxidation of fatty acids were also significantly repressed, even at the lowest DPhP concentration. PPAR α target genes, such as *Hmgcs2* or *Cpt1a* were specifically less expressed in exposed animals. It is important to note that these genes are directly connected to the regulation of perturbed pool of metabolites, *Hmgcs2* controlling the synthesis of (*R*)-3-Hydroxybutyric acid (Grabacka et al. 2016), and *Cpt1a*, catalyzing acylcarnitine production and rate limiting for fatty acid oxidation (Foster 2012). Finally, reduced levels of fat in the liver and smaller BW could be observed in exposed animals, especially at the highest dose of DPhP. In line with this result, the transcriptional control of fatty acids synthesis/uptake was apparently also disturbed, especially at the highest dose of DPhP. Consistently, *Cd36*, *Scd1*, *Fads2*, all canonical target genes of PPAR α involved in fatty acid biosynthesis, were found to be less expressed in exposed animals. Taken together, these results strongly pointed toward a significant dysregulation of lipid homeostasis upon exposure to DPhP and suggested an important role for PPAR α activity in this perturbation.

PPAR α is considered to be a key coordinator of fast-fed transition at the hepatic level with paradoxical effects (Dubois et al. 2017). PPAR α is thus the main activator of fatty acid oxidation and ketogenesis during adaptation to long-term fasting (Janssen et al. 2015). However, it is now recognized that PPAR α also acts in normal conditions to adapt metabolism to circadian feeding

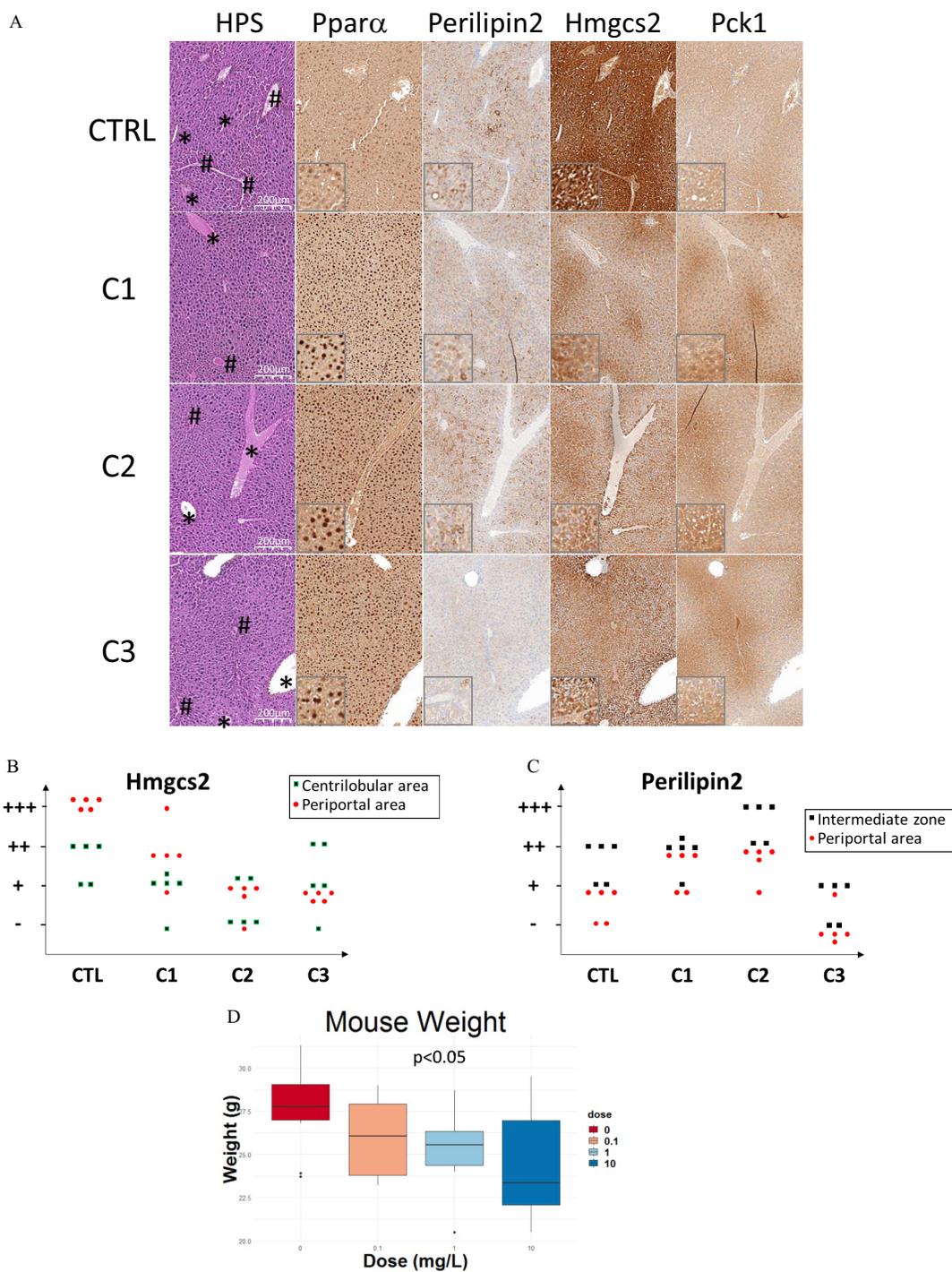


Figure 7. Histological and physiological alterations induced by exposure to DPhP. (A) Liver sections at the indicated scale of mice exposed to the indicated concentration of DPhP or a vehicle were immunostained with the indicated antibodies. Star and hash symbols denote the centrilobular and the portal area of the liver, respectively. Inset represents a 10 \times magnification of the original image. (B) Histogram quantifying immunohistochemistry (IHC) scores associated with *Hmgcs2* staining of five animals in each indicated group (representative of two independent experiments, 2 \times 5 animals). Score associated with the centrilobular and the portal area were dissociated as indicated. (–) = no to very low staining, (+) = low staining, (++) = intermediate staining, (+++) = intense staining (see “Methods”). (C) Histogram quantifying IHC scores associated with Perilipin 2 staining of five animals in each indicated group (representative of two independent experiments, 2 \times 5 animals). Score associated with the intermediate zone and the portal area were dissociated as indicated (no staining was present in the zone contiguous to the centrilobular vein). (–) = no to very low staining, (+) = low staining, (++) = intermediate staining, (+++) = intense staining (see methods). (D) Box-and-whisker plot quantifying the body weight of 10 animals representative of two independent experiments (2 \times 5 animals), after 8 wk of DPhP exposure at the indicated concentrations or with a vehicle. (Midline = median, box limits = 1st and 3rd quartile, whiskers = largest and smallest value within 1.5 \times the interquartile range; summary data in Table S27). Outliers and significant *p*-values have been indicated (Student’s *t*-test, *p* < 0.05 compared to vehicle).

(Gachon et al. 2011). Therefore, PPAR α controls on the one hand *de novo* lipid synthesis and fatty acid uptake during feeding periods, supplying store droplets, and on the other hand activates triglyceride and cholesteryl-ester lysis and oxidation of released lipids between meals (Chen and Yang 2014; Gachon et al. 2011). Accordingly, our results showing a double perturbation of both mechanisms, fatty acid synthesis and degradation, by DPhP exposure were consistent with this known role of PPAR α . In absence of any observed reduction of PPAR α expression, our results match a model of inhibition of PPAR α transcriptional activity upon exposure to DPhP. Conversely, our findings that lipid stores in the liver of animals exposed to low concentrations of DPhP are not depleted invalidated a model of low fatty acid oxidation by an overall lack of lipids and was consistent with a genetic perturbation of this metabolic pathway. Finally, the absence of a strong rise in lipid droplets in these same conditions was also coherent with an inhibition of PPAR α activity, because an equilibrium may be found between the lack of fatty acid storage and a lower use of these fatty acids.

Interestingly, our study highlighted the perturbation of several pools of metabolites and genetic controls susceptible to alter this equilibrium, directly in the liver or involving a more complex interaction with other organs. Among them, *N*-acylethanolamide, significantly more represented in extracts of animals exposed to DPhP, are known lipid stress markers enzymatically produced and controlling PPAR α activity (Piomelli 2013). Similarly, depletion of bile acids may participate in the control of lipid metabolism, either directly through a decrease in lipid absorption, or via the regulation of nuclear receptors such as FXR protein. Finally, we noticed the alteration of several metabolites, endogenous and exogenous, containing homocyclic aromatic rings and/or indole chemical functions associated with tryptophan metabolism. Several perturbed indole-containing compounds (indoxyl-sulfate, quinolin-2-ol) (Wikoff et al. 2009) and tryptophan derivatives (Venkateswaran et al. 2019; Yamamoto et al. 2019) were shown to be directly implicated in the regulation of AHR protein, an important xenobiotic receptor (Bock 2019b) involved in the elimination of aromatic xenobiotics. Moreover, even though DPhP does not contain the classical polycyclic structure associated with known ligands of these receptors, it possesses two aromatic rings susceptible of stacking with these structures and disturbing their interaction with AHR (Soshilov and Denison 2014). Importantly, we also noticed at the genetic level that exposure to DPhP disturbed xenobiotic response and tryptophan metabolism reinforcing the possibility that DPhP disturbed AHR activity in our experiments. Recent studies have suggested that AHR may be involved in fatty acid metabolism (Bock 2019a), independently of its role as a xenobiotic regulator but through the control of PPAR α activity (Wang et al. 2011).

Overall, these regulations linked to exposure to DPhP may be highly relevant to human health with regards to long-term exposure. Of note, our study used relatively young animals and did not analyze long-term consequences of chronic exposure to DPhP. Therefore, it is difficult to predict the exact consequences of PPAR α inhibition by DPhP on older animals. Moreover, it is likely that this type of perturbation intersects with other environmental constraints such as the type of diet susceptible to tilt the equilibrium controlled by PPAR α in one direction or the other. Finally, the dose of DPhP exposure may strongly impact the final outcome of PPAR α perturbation in an inverted U-shape type of dose-response, because we have seen in mice that the intermediate concentration had a stronger impact on liver metabolism than the highest. However, several data could support a role for PPAR α inhibition by DPhP in the development of lipid disorders. The lack of PPAR α activity leads for instance to a higher amount of plasma triglyceride and LDL (Schoonjans et al. 1996; Watts et al. 2003)

and is the target of fibrates, a therapeutic class of molecules extensively used to treat human metabolic syndromes. Moreover, transgenic mice with a liver-specific PPAR α knockout were more sensitive to high-fat diet, displaying specific inflammation and hyperlipidemia at the hepatic level (Stec et al. 2019). Therefore, PPAR α inhibition in individuals exposed to DPhP may contribute to the development of metabolic syndromes and their consequences, such as cardiovascular disease and even cancer.

Strengths and Limitations

As described in the “Methods” section, we used pooled samples of livers for the omics analyses. This approach was chosen due to technical reasons with the aim of obtaining sufficient material for each group/concentration to perform the multiple analytical experiments used for the metabolomics analyses. The robustness of our analytical procedure and our metabolic coverage were strongly improved by this decision. We assumed that a divergent metabolite profile of one animal could overlap those of others pooled in the same extraction procedure. However, to compensate this limitation, we performed our transcriptomic analyses on a distinct batch of animals. A strong correlation and integration could be observed and built between both types of omics analysis. Therefore, it was extremely unlikely that observed differences in both omics analyses were the consequences of some animals presenting highly divergent biological responses. Moreover, immunohistochemistry (IHC) analyses were performed on separate animals and confirmed the homogeneous response to the DPhP treatment.

Conclusion

Our results raised many questions on the use, the safety and the presence in the environment of APEs, most of which may expose humans to DPhP. We did not fully characterize the molecular mechanisms underlying the apparent alterations in lipid homeostasis and PPAR α activities by these compounds because this was beyond the scope of our study. However, the known function of these factors and their association with the metabolic syndromes should constitute a sufficiently strong risk factor to measure more precisely the health hazards associated with their presence in the environment, by taking into consideration diet in future epidemiological studies. Moreover, the potential interaction of these compounds with known activators of AHR should be investigated with the aim of determining the possible existence of synergistic effects and to characterize the mechanisms, directly or indirectly, inhibiting PPAR α activities.

Acknowledgments

The authors would like to thank N. Gadot for IHC analyses, I. Puisieux for its support to design animal experiments, and B. Manship for critical reading of the manuscript. This study was financially supported by the Plan Cancer et Environnement 2015–2019 (Project PLASTOC-Plastic additives: Study of the Potential Risk for Cancer Development Through the Evaluation of Pharmacodynamics, Accumulation and Mechanisms in Endocrine Tissues). Our team is also certified by the Ligue nationale contre le cancer. Additionally, this work was supported by the Ligue contre le cancer (Comité du Rhône), the Association pour la Recherche contre le Cancer (Project No. SFI20121205395, PJA20141201758, PJA 20171206303), and the Bonus Qualité Recherche (BQR) Accueil de Lyon University.

S.S.R., M.A., and J.D. performed experiments on cell lines and animal models. S.S.R. coordinated animal experimentation and IHC analysis. J.G., C.B., and L.P. performed NGS and their bioinformatics analysis. A.M.V. performed statistical retreatment of the data. J.M.S., A.F., A.B., and E.V. designed and supervised

metabolomics analyses and raw data retreatment. J.M.S. and A.M.V. performed then their statistical interpretation. L.S. and B.G. performed supervised quantification of APEs. E.V. supervised these analyses. B.F., S.I., and T.G. helped to interpret the data. L.P. and A.M.V. conceived the project, designed experiments, interpreted data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

- Abdallah MA, Nguyen KH, Moehring T, Harrad S. 2019. First insight into human extrahepatic metabolism of flame retardants: biotransformation of EH-TBB and Firemaster-550 components by human skin subcellular fractions. *Chemosphere* 227:1–8, PMID: 30981098, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.017>.
- Ballesteros-Gómez A, Erratico CA, Eede NV, Ionas AC, Leonards PE, Covaci A. 2015a. In vitro metabolism of 2-ethylhexyldiphenyl phosphate (EHDPHP) by human liver microsomes. *Toxicol Lett* 232(1):203–212, PMID: 25448284, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.007>.
- Ballesteros-Gómez A, Van den Eede N, Covaci A. 2015b. In vitro human metabolism of the flame retardant resorcinol bis(diphenylphosphate) (RDP). *Environ Sci Technol* 49:3897–3904, PMID: 25692932, <https://doi.org/10.1021/es505857e>.
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. 2012. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391):603–607, PMID: 22460905, <https://doi.org/10.1038/nature11003>.
- Barupal DK, Fiehn O. 2017. Chemical similarity enrichment analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Sci Rep* 7(1):14567, PMID: 29109515, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15231-w>.
- Barupal DK, Haldiya PK, Wohlgemuth G, Kind T, Kothari SL, Pinkerton KE, et al. 2012. MetaMapp: mapping and visualizing metabolomic data by integrating information from biochemical pathways and chemical and mass spectral similarity. *BMC Bioinformatics* 13:99, PMID: 22591066, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-99>.
- Belcher SM, Cookman CJ, Patisaul HB, Stapleton HM. 2014. In vitro assessment of human nuclear hormone receptor activity and cytotoxicity of the flame retardant mixture FM 550 and its triarylphosphate and brominated components. *Toxicol Lett* 228(2):93–102, PMID: 24786373, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.04.017>.
- Björnsdóttir MK, Romera-García E, Borrull J, de Boer J, Rubio S, Ballesteros-Gómez A. 2018. Presence of diphenyl phosphate and aryl-phosphate flame retardants in indoor dust from different microenvironments in Spain and the Netherlands and estimation of human exposure. *Environ Int* 112:59–67, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.028>.
- Blighe K. 2018. EnhancedVolcano: publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. <https://github.com/kevinblighe> [accessed 12 June 2020].
- Bock KW. 2019a. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) functions in NAD⁺ metabolism, myelopoiesis and obesity. *Biochem Pharmacol* 163:128–132, PMID: 30779909, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.021>.
- Bock KW. 2019b. Aryl hydrocarbon receptor (AHR): from selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions. *Biochem Pharmacol* 168:65–70, PMID: 31228464, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.015>.
- Chen G, Jin Y, Wu Y, Liu L, Fu Z. 2015. Exposure of male mice to two kinds of organophosphate flame retardants (OPFRs) induced oxidative stress and endocrine disruption. *Environ Toxicol Pharmacol* 40(1):310–318, PMID: 26183808, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.021>.
- Chen L, Yang G. 2014. PPARs integrate the mammalian clock and energy metabolism. *PPAR Res* 2014:653017, PMID: 24693278, <https://doi.org/10.1155/2014/653017>.
- Dubois V, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B. 2017. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J Clin Invest* 127(4):1202–1214, PMID: 28368286, <https://doi.org/10.1172/JCI88894>.
- Foster DW. 2012. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J Clin Invest* 122(6):1958–1959, PMID: 22833869, <https://doi.org/10.1172/jci63967>.
- Fu L, Du B, Wang F, Lam JCV, Zeng L, Zeng EY. 2017. Organophosphate triesters and diester degradation products in municipal sludge from wastewater treatment plants in China: spatial patterns and ecological implications. *Environ Sci Technol* 51(23):13614–13623, PMID: 29083881, <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04106>.
- Gachon F, Leuvenberger N, Claudel T, Gos P, Jouffe C, Fleury Olela F, et al. 2011. Proline- and acidic amino acid-rich basic leucine zipper proteins modulate peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(12):4794–4799, PMID: 21383142, <https://doi.org/10.1073/pnas.1002862108>.
- Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. 2016. Regulation of ketone body metabolism and the role of PPARα. *Int J Mol Sci* 17(12):2093, PMID: 27983603, <https://doi.org/10.3390/ijms17122093>.
- Heitkamp MA, Freeman JP, McMillan DC, Cerniglia CE. 1985. Fungal metabolism of tert-butylphenyl diphenyl phosphate. *Appl Environ Microbiol* 50(2):265–273, PMID: 4051482, <https://doi.org/10.1128/AEM.50.2.265-273.1985>.
- Hou R, Luo X, Liu C, Zhou L, Wen J, Yuan Y. 2019. Enhanced degradation of triphenyl phosphate (TPHP) in bioelectrochemical systems: kinetics, pathway and degradation mechanisms. *Environ Pollut* 254(Part A):113040, PMID: 31421579, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113040>.
- Jamarani R, Erythropel HC, Nicell JA, Leask RL, Marić M. 2018. How green is your plasticizer? *Polymers (Basel)* 10(8):834, <https://doi.org/10.3390/polym10080834>.
- Janssen AW, Betzel B, Stoopen G, Berends FJ, Janssen IM, Peijnenburg AA, et al. 2015. The impact of PPARα activation on whole genome gene expression in human precision cut liver slices. *BMC Genomics* 16(1):760, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1969-3>.
- Kojima H, Takeuchi S, Itoh T, Iida M, Kobayashi S, Yoshida T. 2013. In vitro endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors. *Toxicology* 314(1):76–83, PMID: 24051214, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.09.004>.
- Li Y, Chen R, He J, Ma H, Zhao F, Tao S, et al. 2019a. Triphenyl phosphate at environmental levels retarded ovary development and reduced egg production in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Sci Technol* 53(24):14709–14715, PMID: 31751126, <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05669>.
- Li J, Zhao L, Letcher RJ, Zhang Y, Jian K, Zhang J, et al. 2019b. A review on organophosphate ester (OPE) flame retardants and plasticizers in foodstuffs: levels, distribution, human dietary exposure, and future directions. *Environ Int* 127:35–51, PMID: 30901640, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.009>.
- Meeker JD, Cooper EM, Stapleton HM, Hauser R. 2013. Urinary metabolites of organophosphate flame retardants: temporal variability and correlations with house dust concentrations. *Environ Health Perspect* 121(5):580–585, PMID: 23461877, <https://doi.org/10.1289/ehp.1205907>.
- Meeker JD, Stapleton HM. 2010. House dust concentrations of organophosphate flame retardants in relation to hormone levels and semen quality parameters. *Environ Health Perspect* 118(3):318–323, PMID: 20194068, <https://doi.org/10.1289/ehp.0901332>.
- Mendelsohn E, Hagopian A, Hoffman K, Butt CM, Lorenzo A, Congleton J, et al. 2016. Nail polish as a source of exposure to triphenyl phosphate. *Environ Int* 86:45–51, PMID: 26485058, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.005>.
- Mitchell CA, Reddam A, Dasgupta S, Zhang S, Stapleton HM, Volz DC. 2019. Diphenyl phosphate-induced toxicity during embryonic development. *Environ Sci Technol* 53(7):3908–3916, PMID: 30864794, <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07238>.
- Piomelli D. 2013. A fatty gut feeling. *Trends Endocrinol Metab* 24(7):332–341, PMID: 23567058, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.03.001>.
- Pouech C, Kiss A, Lafay F, Léonard D, Wiest L, Cren-Olivé C, et al. 2015. Human exposure assessment to a large set of polymer additives through the analysis of urine by solid phase extraction followed by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1423:111–123, PMID: 26554294, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.091>.
- Sasaki K, Suzuki T, Takeda M, Uchiyama M. 1984. Metabolism of phosphoric acid triesters by rat liver homogenate. *Bull Environ Contam Toxicol* 33(3):281–288, PMID: 6478075, <https://doi.org/10.1007/BF01625544>.
- Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, et al. 1996. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15(19):5336–5348, PMID: 8895578, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00918.x>.
- Soshilov AA, Denison MS. 2014. Ligand promiscuity of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonists revealed by site-directed mutagenesis. *Mol Cell Biol* 34(9):1707–1719, PMID: 24591650, <https://doi.org/10.1128/MCB.01183-13>.
- Stec DE, Gordon DM, Hipp JA, Hong S, Mitchell ZL, Franco NR, et al. 2019. Loss of hepatic PPARα promotes inflammation and serum hyperlipidemia in diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 317(5):R733–R745, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00153.2019>.
- Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, et al. 2013. Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology* 62(4):617–631, PMID: 23347084, <https://doi.org/10.1111/his.12038>.
- Su G, Crump D, Letcher RJ, Kennedy SW. 2014. Rapid in vitro metabolism of the flame retardant triphenyl phosphate and effects on cytotoxicity and mRNA expression in chicken embryonic hepatocytes. *Environ Sci Technol* 48(22):13511–13519, PMID: 25350880, <https://doi.org/10.1021/es5039547>.
- Su G, Letcher RJ, Yu H. 2016. Organophosphate flame retardants and plasticizers in aqueous solution: pH-dependent hydrolysis, kinetics, and pathways. *Environ Sci Technol* 50(15):8103–8111, PMID: 27347783, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02187>.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D607–D613, PMID: 30476243, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- Tserng KY, Jin SJ. 1991. Metabolic origin of urinary 3-hydroxy dicarboxylic acids. *Biochemistry* 30(9):2508–2514, PMID: 2001377, <https://doi.org/10.1021/bi00223a030>.

- Tung EWY, Ahmed S, Peshdary V, Atlas E. 2017. Firemaster[®]550 and its components isopropylated triphenyl phosphate and triphenyl phosphate enhance adipogenesis and transcriptional activity of peroxisome proliferator activated receptor (Ppar γ) on the adipocyte protein 2 (aP2) promoter. *PLoS One* 12(4):e0175855, PMID: 28437481, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175855>.
- Van den Eede N, Ballesteros-Gómez A, Neels H, Covaci A. 2016. Does biotransformation of aryl phosphate flame retardants in blood cast a new perspective on their debated biomarkers? *Environ Sci Technol* 50(22):12439–12445, PMID: 27766855, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03214>.
- Venkateswaran N, Lafita-Navarro MC, Hao YH, Kilgore JA, Perez-Castro L, Braverman J, et al. 2019. Myc promotes tryptophan uptake and metabolism by the kynurenine pathway in colon cancer. *Genes Dev* 33(17–18):1236–1251, PMID: 31416966, <https://doi.org/10.1101/gad.327056.119>.
- Wang Y, Kannan K. 2018. Concentrations and dietary exposure to organophosphate esters in foodstuffs from Albany, New York, United States. *J Agric Food Chem* 66(51):13525–13532, PMID: 30525574, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06114>.
- Wang Y, Kannan P, Halden RU, Kannan K. 2019. A nationwide survey of 31 organophosphate esters in sewage sludge from the united states. *Sci Total Environ* 655:446–453, PMID: 30472646, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.224>.
- Wang C, Xu CX, Krager SL, Bottum KM, Liao DF, Tischkau SA. 2011. Aryl hydrocarbon receptor deficiency enhances insulin sensitivity and reduces PPAR- α pathway activity in mice. *Environ Health Perspect* 119(12):1739–1744, PMID: 21849270, <https://doi.org/10.1289/ehp.1103593>.
- Wang D, Zhu W, Chen L, Yan J, Teng M, Zhou Z. 2018. Neonatal triphenyl phosphate and its metabolite diphenyl phosphate exposure induce sex- and dose-dependent metabolic disruptions in adult mice. *Environ Pollut* 237:10–17, PMID: 29466770, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.047>.
- Watts GF, Barrett PH, Ji J, Serone AP, Chan DC, Croft KD, et al. 2003. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes* 52(3):803–811, PMID: 12606523, <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.803>.
- Wei GL, Li DQ, Zhuo MN, Liao YS, Xie ZY, Guo TL, et al. 2015. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: sources, occurrence, toxicity and human exposure. *Environ Pollut* 196:29–46, PMID: 25290907, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.012>.
- Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. 2009. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(10):3698–3703, PMID: 19234110, <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>.
- Yamamoto T, Hatabayashi K, Arita M, Yajima N, Takenaka C, Suzuki T, et al. 2019. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Sci Signal* 12(587):eaaw3306, PMID: 31239324, <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw3306>.
- Zhao F, Kang Q, Zhang X, Liu J, Hu J. 2019. Urinary biomarkers for assessment of human exposure to monomeric aryl phosphate flame retardants. *Environ Int* 124:259–264, PMID: 30660026, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.022>.
- Zhou G, Soufan O, Ewald J, Hancock REW, Basu N, Xia J. 2019. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res* 47(W1):W234–W241, PMID: 30931480, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz240>.

Résultat Contributeur n°2



Dosage lipidique des membranes par
marquage au Dioll

Le second projet dans lequel j'ai pu participer se porte sur la création d'un outil de quantification membranaire, ses travaux ont été portés par la Dr. Maniti et la Pr. Girard-Egrot de l'équipe GEMBAS à l'ICBMS. A l'heure d'aujourd'hui, la quantification lipidique des membranes nécessite une étape d'extraction lipidique puis une quantification colorimétrique par le dosage de Stewart. Cependant ces méthodes comportent plusieurs désavantages. La première est l'utilisation de solvant organique tel que le chloroforme. Le deuxième et la nécessité de manipuler des volumes de plusieurs millilitres. La troisième est la nécessité d'utiliser de la verrerie, notamment lors de la mesure par absorbance du ferrothiocyanate complexé avec les phospholipides. L'ensemble de ces défauts rendent périlleuse la quantification des membranes. L'équipe GEMBAS ont alors développé une mesure de quantification membranaire grâce à l'utilisation du Dioll. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie résultat n°1, le Dioll possède plusieurs avantages pour son utilisation dans un tel contexte. La première est la quasi-absence de fluorescence dans un milieu aqueux, en comparaison à sa fluorescence lors de son insertion par affinité au sein des membranes. La deuxième est sa nature fluorescente et son intensité de fluorescence élevée, qui permettent la création d'un outil de mesure de fluorescence précis, à des concentrations faibles et des volumes faibles. Troisièmement, son affinité élevée avec les régions rigides et fluides et son rapport quantique des deux longueurs d'onde quasi similaires permet d'avoir une robustesse de la mesure sur des échantillons de composition différente et donc de fluidité différente. Enfin, l'utilisation d'une sonde comme outil de quantification permet d'éviter de passer l'étape d'extraction des lipides et donc de l'utilisation du chloroforme. Deux avantages ressortent d'un outil de mesure « *chloroform-free* ». La première est la diminution de l'utilisation de solvant organique qui n'est pas forcément présent dans l'ensemble des laboratoires, notamment dans le domaine de la biologie. La deuxième qui en lien avec l'intensité de fluorescence élevée de la sonde est la possibilité d'utiliser des plaques en plastique 96 puits et donc des lecteurs de plaques permettant ainsi un gain de temps par échantillon. Dans ces travaux ils ont pu mettre au point, l'utilisation du Dioll pour la création d'un outil de quantification de membrane, rapide, « *chloroform-free* », aussi robuste que le dosage Stewart que ce soit pour des systèmes membranaires entièrement lipidiques comme les liposomes, ou encore des systèmes membranaires protéo-lipidiques artificiels ou naturels qui sont respectivement des protéoliposomes et les vésicules extracellulaires (microvésicules et exosomes).

A novel fluorescent method to quantify membranes in artificial and natural lipid and proteolipid vesicles

Meriem Chadli^{1‡}, Samira Samba-Mossiamasson^{1‡}, Julien Bompard¹, Larissa Socrier^{1†}, Sebastien Ibanez¹, Thomas Guillot¹, Leyre Brizuela-Madrid¹, Arnaud Vigneron², David Gueyrard¹, Thierry Granjon¹, Agnès Girard-Egrot¹ and Ofelia Maniti^{1*}

¹ Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246, Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Lyon, France

² Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Lyon, France; LabEx DEVweCAN, Université de Lyon, Lyon, France.

† present address Max Planck Society, Institute for Dynamics and Self-Organization, Am Faßberg 17, 37077 Göttingen, Germany and Georg-August-Universität Göttingen, Institute of Organic and Biomolecular Chemistry, Tammannstraße 2, 37077 Göttingen, Germany

*to whom correspondence should be addressed ofelia.maniti@univ-lyon1.fr

‡ these authors contributed equally

ABSTRACT: Quantification methods of membrane content in various samples are scarce and require lipid extraction in organic solvents, energetic conditions or costly instruments. Here, we present an easy-to-use method of membrane lipid quantification in artificial and natural vesicles based on the fluorescence of an in-house synthesized Laurdan-derivative, Dioll. This fluorophore has a very low fluorescence in aqueous buffers, but when it spontaneously inserts into lipid bilayers its fluorescence increases with a hyperbolic dependency on the vesicles or liposome concentration in the sample. Thus, a plain solution of POPC liposomes of known concentrations was used as standard to determine lipid membrane concentration in samples of diverse compositions and regardless of membrane order or charge. The method was successfully used to quantify membrane lipids in proteoliposome samples, exosomes and giant plasma membrane vesicles.

Introduction

Membranes, as selective barriers between the inner and the outer compartments regulate a plethora of phenomena related to signalling, molecule entry into cells, metabolite exchange or membrane trafficking. Therefore, investigations in the field of membranes are exponentially increasing to-day. The complexity of biological membranes, as major components of living cells, and their numerous interactions with intra- and extracellular networks, make their direct investigation difficult. Therefore, biomimetic models have been developed with the aim of providing a simplified environment to study, among others, membrane-protein interactions. Liposomes 1–4, various supported or tethered bilayers 5–9, monolayers 10–12, bicelles 13,14 or nanodiscs 15, to name only some, are largely used to mimic plasma and organelle membranes.

Among such models, liposomes are widely used to probe protein-lipid interactions, lipid organization and molecule penetration across membranes. They are also used as versatile assemblies in drug delivery systems, as they are non-toxic, biodegradable, and large scale production is possible 4,16–19. They are also extensively used for the reconstitution of trans-membrane proteins, to form proteoliposomes, the lipid bilayer offering a native-like environment for membrane-spanning domains 20. For all these applications, liposomes undergo various preparation steps: extrusion, centrifugation, protein reconstitution, cell-free protein synthesis, molecule grafting, etc 2,21–24. It is therefore of interest to determine

lipid concentration after various processes and in different production batches.

To estimate liposome concentration, several methods are popular. Among them, colorimetric methods such as Bartlett 25 and Rouser 26 methods are based on the reaction between the inorganic phosphate obtained after liposome treatment with perchloric acid and ammonium molybdate to obtain phosphomolybdate. The addition of a reducing agent such as 1-amino-2-naphthol-4 sulfonic acid (Bartlett method) and ascorbic acid (Rouser method) leads to formation of a violet complex absorbing at 820–830 nm. Both methods are rather sensitive (limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) around 5 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively). Alternatively, the Stewart method 27, probably the most widely used method for phospholipid determination, is based on the formation of complexes between the phosphate group of lipid polar heads and ammonium ferro-thiocyanate, which absorb at 485 nm. It is rather fast and easy to implement, but requires lipid extraction in organic solvent and the use of chloroform-resistant recipes and protection. LOD and LOQ are evaluated at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively.

Chromatographic methods of lipid separation, together with mass spectroscopy 28–30 or NMR 31,32 are also used for lipid detection and quantification, as one can obtain not only the lipid amount, but also the lipid class distribution. Yet, they are time consuming, rather expensive and not readily used in routine experiments. Among non-destructive methods we can

cite the report from Elmer-Dixon and Bowler, 2017, which proposes an interesting quantification of cardiolipin-containing liposomes based on absorbance measurements and Mie diffusion using MatLab algorithms 33.

Given the number of studies dwelling on liposomes, proteoliposomes and on cell-derived vesicles, we propose a simple method to estimate vesicle concentration in aqueous solutions. This method is based on the fluorescence of an in-house synthesized Laurdan-derived fluorophore, Dioll (Patent pending EPO19306175.1, 1-(6-((2,3-dihydroxypropyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)dodecan-1-one). This fluorophore, like its more illustrious analogue, Laurdan 34–36, is a membrane probe sensitive to the viscosity of its environment, used for the study of membrane fluidity and organization 37. Both Dioll and Laurdan have a very low fluorescence emission intensity in aqueous buffers, but the fluorescence intensity increases drastically when the fluorophore is inserted into a lipid bilayer. In this report, we analyzed the evolution of the fluorescence emission of Dioll with respect to the amount of phospholipid vesicles in the sample and found that it followed a hyperbolic function. Fitting the experimental results to a hyperbola permitted us to quantify lipids in various preparations.

The Dioll-based quantification method was found to be robust with respect to membrane fluidity, presence of charges, or cholesterol content, and was used to determine membrane content in proteoliposomes and in two types of natural vesicles, exosomes and giant plasma membrane vesicles (GPMV).

Experimental section

Materials

Lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Dioll was produced as described elsewhere (patent pending EPO19306175.1). HEPES, PBS, NaCl, ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$) and ammonium thiocyanate (NH_4SCN) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Falavier, France). Ultrapure water was obtained with a Pure-LabOption Q7 system (Véolia Water STI, Decines, France).

Liposome preparation

Liposomes were prepared using a classical freeze/thaw protocol. Briefly, the appropriate lipid mixture solubilized in chloroform was dried under vacuum, then solubilized with 1 ml buffer under strong agitation. Assays were done either in HEPES 20 mM pH 7.4 buffer 100 mM NaCl or in phosphate buffer saline (PBS). The liposome emulsion obtained was submitted to 6 freeze/thaw cycles (5 min in liquid nitrogen/10 min in water bath at 37°C, 1 minute strong agitation) to decrease the number of bilayers and obtain unilamellar vesicles. To obtain homogenous vesicles, the liposome solution was extruded 19 times through a 400 nm and 100 nm polycarbonate membrane successively using an extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster AL). Liposomes were routinely prepared at lipid concentrations between 1 and 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ and subsequently diluted at the desired concentration.

Dioll fluorescence-based liposome quantification

A POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine) liposome solution (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was used as standard. Increasing volumes of the standard solution were diluted with buffer in a 96 well plate (Nunc). The final volume per well was 200 μl and lipid concentrations between 0 and 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ were used. Samples were prepared in parallel to a final volume of 200 μl per well.

A constant volume of Dioll solution in ethanol (5 μl) was added in each well to obtain a final Dioll concentration of 2

μM . The volume of ethanol added represented 2.5 % of the final volume and had no effect on liposome integrity. The plate was incubated at room temperature for 10 min. Fluorescence emission spectra were recorded between 420 nm and 600 nm for an excitation wavelength of 390 nm with a TECAN InfiniteM200 plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Spectra were recorded at 21°C.

The surface under the spectrum was calculated for each condition using an Excel complementary function, IntegralP (www.fordom.free.fr), which allows calculating the integral of a function when discrete data sets are available. Maximum fluorescence intensity or surface under the curve values were plotted as a function of the lipid concentration to obtain the standard curve. They both showed a hyperbolic variation and the equation of the standard curve was obtained using a hyperbolic fit $y=ax/(x+b)$ (SigmaPlot). The calculation of the a and b coefficients allowed us to determine lipid concentrations in the samples. As various volumes were used for the assays, the concentration of the stock liposome solution was presented taking into account various dilution factors. Measurements were performed in triplicate.

For the estimation of the LOD and LOQ, the fluorescence spectra of 2 μM Dioll in aqueous buffer were recorded in the absence of liposomes and the surface under the curve was calculated to estimate the blank value on 5 independent measurements. LOD and LOQ were calculated as 3 times or 10 times the standard deviation of the blank, respectively.

Sensitivity was estimated from the slope of the linear fit for low liposome concentrations (up to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). As the fluorescence intensity is dependent on the instrument used, in this study we estimated that an increase of 100 A.U. in the fluorescence intensity obtained with TECAN InfiniteM200 was significant.

To conclude upon the repeatability of the method, the coefficient of variation (CV) was calculated as the percentage of the standard deviation on the mean of 5 independent measurements. Accuracy was deduced from the difference between the concentrations obtained with the Dioll-based method and a standard method of phospholipid quantification, in our case the Stewart method 27.

Lipid quantification with Stewart Method

Lipids were extracted from samples with chloroform. In brief, aqueous samples were mixed with chloroform (10 times the volume of the sample) under vigorous shaking. The samples were then centrifuged at 300 x g for 10 min to accelerate phase separation (Multifuge 3 LR, Heraeus ThermoScientific). The chloroform (bottom) phase was recovered with a glass pipette.

A POPC standard solution was prepared at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in chloroform. Increasing volumes of the standard solution were diluted with chloroform in glass centrifuge tubes to a final volume of 2 ml. Samples extracted in chloroform were prepared in parallel and diluted to 2 ml. 2 ml of Ferrothiocyanate solution (obtained by mixing 20.7 g of Ferric chloride hexahydrate and 30.4 g of ammonium thiocyanate in 1L of ultrapure water) was added to each tube. The solutions were vigorously mixed and then, centrifuged at 300 x g for 10 min (Multifuge 3 LR, Heraeus). The chloroform phase was recovered and the absorbance was measured at 485 nm in glass cuvettes with a Jasco V-730 spectrophotometer (Jasco, Lisses, France). For quantification, absorbance at 485 nm was plotted against the phospholipid concentration.

Sample preparation

Proteoliposomes were a kind gift from Synthelis (Grenoble, France) and were prepared according to previously published protocols 38.

Exosomes were obtained by series of differential centrifugations adapted from 39. In brief, 120 ml of HMEC culture medium were collected after two days culture, and centrifuged at 2 000 x g at 4°C during 10 min (Multifuge 3LR Heraeus™). Supernatants were collected and ultracentrifuged at 20 000 x g, 4°C during 30 min (Optima LE-80 Beckman™ with a fixed rotor angle 50.2 Ti Beckman™). A second ultracentrifugation was realized at 100 000 x g, 4 °C during 2 h. Pellets were resuspended with 1 mL of PBS buffer, pooled in the same tube and ultracentrifuged at 100 000 x g, 4 °C during 1 h. Finally, the pellet was resuspended in 200 µL of PBS buffer to obtain concentrated exosomes.

Giant Plasma Membrane Vesicles (GPMVs) were prepared according to previously described protocol 40, but adapted to PC-3 cell culture. In brief, PC-3 were cultured in RPMI-1640 medium with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C until cells reached a confluency of 80 % in 25 cm² plastic flasks. Growth medium was removed and cell were incubated for 1h with 25 mM formaldehyde 2 mM DTT in PBS at room temperature under agitation. The supernatant containing GPMVs was recovered and the presence of GPMVs was checked with an optical microscope. For Dioll-based measurements, 200 µl of the GPMV preparation was incubated with 5 µl Dioll ethanol solution (2 µM final concentration) and fluorescence spectra were recorded as described above. The lipid concentration was determined using POPC liposomes as standard.

Results

To probe the dependency of Dioll fluorescence upon liposome content, increasing concentrations of POPC liposomes were incubated with a constant concentration of 2 µM Dioll. Fluorescence spectra were recorded and plotted in Figure 1A. Fluorescence intensity increased progressively with lipid amount, but seemed to reach saturation at concentrations over 50 µg.ml⁻¹. The fluorescence intensity emission maximum was obtained at 490 nm, which corresponded to lipid membranes in liquid disordered state, as expected for POPC liposomes at 21°C (T_m -4°C). Fluorescence intensity at 490 nm as a function of the lipid concentration in the well (Figure 1B) showed a hyperbolic evolution. Yet, for polarity-sensitive probes, like Dioll, the position of the maximum fluorescence emission largely depends on the order state of the lipid membrane. This characteristic, which makes them valuable for determining the order state of the membrane, is an inconvenient when sample fluidity does not match that of the standard solution. Therefore, to overcome this inconvenient, the fluorescence intensity parameter was replaced by the surface under the peak, which does not depend on the fluidity state of the membrane 34,35. The surface under the peak was estimated by integrating the spectra obtained between 420 and 560 nm. When plotted as a function of the liposome concentration, the surface under the peak also fitted a hyperbolic function (Figure 1C). Therefore, the hyperbolic dependency between the surface under the experimental fluorescence emission spectra and the liposome concentration in the well can be used as a calibration curve to measure liposome concentration in various samples.

The LOD, the lowest concentration that can be detected but not quantified, and the LOQ, the lowest concentration that can be quantified with a reasonable degree of confidence, of the calibration curve were determined from the standard deviation of the blank solution (2 µM Dioll in buffer) (Figure

1D). The LOD, which corresponded to the lipid concentration obtained at 3 times the standard deviation of the blank, was equal to 0.4 µg.ml⁻¹, whereas the LOQ, which corresponded to 10 times the standard deviation of the blank, was equal to a lipid concentration of 1.2 µg.ml⁻¹. These limits are rather low and make this method interesting for measuring low lipid concentrations, when small or diluted sample volumes are available.

The sensitivity of the detection method is defined as the dependency between the instrumental response and the variation in the concentration of the compound of interest. It is instrument-dependent. In our conditions, the slope of the linear part equaled to 10 000 A.U. per concentration unit (µg.ml⁻¹). That means that, considering that the sensitivity limit of TECAN InfiniteM200 used in this study was 100 A.U., one can detect variations in liposome concentration of the sample as low as 1 ng.ml⁻¹.

The repeatability of the method, which represents the determination of how close values are to each other under identical experimental conditions, was assessed by determination of the concentration of a POPC liposome solution prepared independently of the standard solution. A concentration of 914 ± 56 µg ml⁻¹ was obtained with 5 replicates, which gave a repeatability of 6 %. To assess the accuracy of the new quantification method, the same POPC liposome solution was measured using the largely used Stewart method. A difference of 1.2 % was obtained between mean values obtained with the two methods. Results were therefore consistent and opened the possibility to routinely use the Dioll as a probe to measure membrane amount in various samples, without lipid extraction and in a rather short time (less than 30 min).

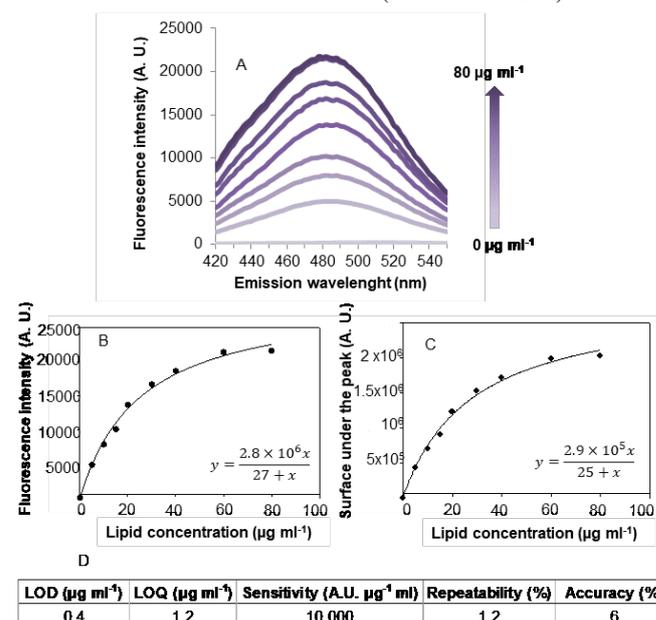


Figure 1. Quantification of POPC liposomes using the Dioll method: A. Fluorescence emission spectra of Dioll inserted in the lipid bilayers (λ_{ex} 390 nm) - 2 µM Dioll was added to increasing liposome concentrations. B. Maximum fluorescence intensity (λ_{max} 490 nm) as function of the lipid concentration – experimental data was fitted to a hyperbolic function. C. Surface under the peak as a function of the lipid concentration and hyperbolic fit of the data (full line). Data sets are representative of at least 3 independent measurements. D. Evaluation of the efficiency of the Dioll method: LOD, LOQ and sensitivity were evaluated as described in material and methods section. Repeatability was determined with a POPC liposome preparation different of the

standard on 5 independent measurements. Accuracy was determined with respect to phospholipid quantification by Stewart method.

Robustness of the Dioll method was checked with respect to various parameters. One major point of interest was whether the membrane fluidity, which largely influences Dioll fluorescence, had an impact on the Dioll-based quantification method. To this purpose, liposomes constituted of DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DPPC (1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine) were prepared (Table 1).

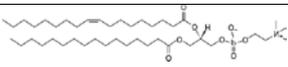
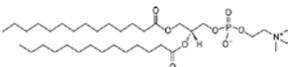
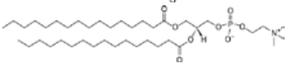
Liposome preparation	Lipid	Acyl chain composition	Schematic structure	T _i
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0-18:1 PC		-4°
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	14:0 PC		24
DPPC	1,2-dipalmitoyl-glycero-3-phosphocholine	16:0 PC		41

Table 1: Liposome preparations used and corresponding gel-to-liquid crystalline phase transition temperatures (T_m).

In our experimental conditions (21°C), DMPC, with a gel-to-liquid crystalline transition temperature (T_m) of 24°C, is expected to be in an ordered state, but close to the liquid ordered-liquid disordered transition, and DPPC (T_m, 41°C) in an ordered configuration. Independently, a standard liposome solution was prepared for each lipid to obtain the corresponding calibration curves. DMPC-inserted Dioll fluorescence spectra (Figure 2A) showed a maximum fluorescence emission at 440 nm consistent with lipid membranes in an ordered state, with a contribution at 490 nm corresponding to the fluid phase.

Although it is difficult to calculate the proportion of each state, the fluorescence emission spectra indicated that, in our experimental conditions, DMPC liposomes make a good model of membranes in which two phases coexist. When inserted in DPPC liposomes, Dioll maximum fluorescence emission was obtained at 440 nm, which is consistent with a membrane in gel/ordered state (Figure 2B). For both DMPC and DPPC liposomes, the surface under the peak estimated as described above gave hyperbolic evolutions (Figure 2C and D). The equations obtained by fitting the experimental data to a hyperbola allowed us to estimate concentration of liposomes in various samples.

To check the influence of the membrane fluidity on the quantification method, POPC, DMPC and DPPC liposomes were prepared and their concentration was determined using either POPC, DMPC or DPPC calibration curves, or by the Stewart method with POPC in chloroform solution as standard. Results are presented in figure 2E. The concentration of the POPC solution measured using either POPC, DMPC or DPPC calibration curves was consistent with that obtained by the Stewart method. Similar results were obtained for DMPC and DPPC liposomes quantified using Dioll-based calibration curves or by Stewart method. Therefore, the surface under the peak parameter as a function of the liposome concentration can successfully replace the fluorescence intensity to measure sample concentration, whatever the membrane fluidity state. This is particularly interesting as membrane fluidity in samples of interest is usually unknown.

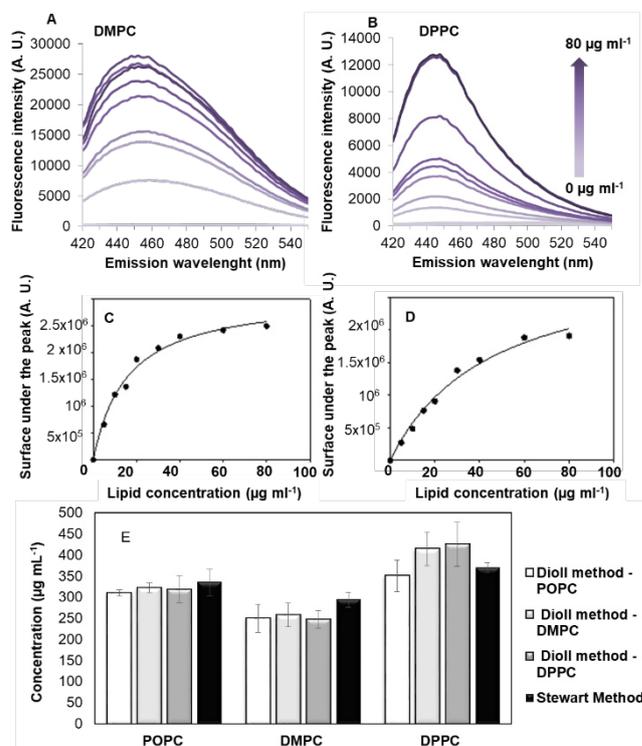


Figure 2. Robustness of Dioll quantification method upon variations of lipid bilayer fluidity. Fluorescence emission spectra of Dioll (2 μM) inserted in DMPC (A) or DPPC (B) liposomes (λ_{ex} 390 nm). Surface under the peak calculated from spectra from figure A and B as a function of DMPC (C) or DPPC (D) liposome concentration. Cross calculations of concentrations of POPC, DMPC or DPPC test solutions using POPC (white bars), DMPC (light grey), DMPC (grey) standard solutions or by Stewart method (black bars) (E). Error bars represent standard deviation obtained with 3 independent measurements.

Cholesterol is one major component of membranes and also a major modulator of membrane order 41. Depending on cell type and membrane, the proportion of cholesterol can vary between 10 and 30 % of lipid total mass. Liposomes containing a mixture of POPC and cholesterol were prepared and, the concentration was measured using Dioll method and a stock solution of POPC liposomes as standard. The concentration obtained for 10, 20 and 30 % cholesterol correlated with the concentration of phospholipids obtained using the Stewart method (Figure 3A), and was not influenced by the cholesterol content in the sample.

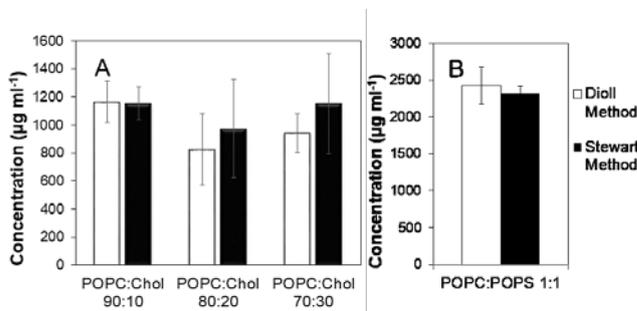


Figure 3. Cholesterol and charge effect on liposome quantification with Dioll. Quantification of POPC liposomes containing (A) cholesterol and (B) POPS using the Dioll method with POPC liposomes as standard (white bars) or by Stewart method (black bars). Error bars are SD obtained with 3 independent measurements.

Membranes contain non negligible amounts of negatively charged lipids with precise and fundamental functions. It is thus of interest to check the robustness of the Dioll-based quantification method towards negatively charged lipids. As an example, we have chosen to prepare liposomes containing 50 % POPC and 50 % POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphoserine). The concentration of the prepared liposome solution was estimated either by the Dioll-based method, with POPC liposomes of known concentration as standard curve, or by the Stewart method with a POPC chloroform solution as standard (Figure 3B). The two methods gave consistent results.

Liposomes provide an adequate environment that preserves transmembrane protein structure and function. Therefore, they are largely used to produce various transmembrane proteins in a native-like environment by different strategies. Whatever the production strategy, it is important that, after various preparation and purification steps, one easily estimates the proteoliposome amount in the sample without additional extraction steps.

The transmembrane protein used as a model in this study was the C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4), a 7 transmembrane domains G protein-coupled receptor (GPCR). CXCR4 was obtained with a cell-free expression system allowing a one-step synthesis reaction of the protein with concomitant insertion in a lipid bilayer through the addition of liposomes to the reaction mix (Synthelabo). The following lipid composition DOPC/DOPE/DMPA/Chol (31:17:20:32 %mol) was used to prepare liposomes and the functionality of CXCR4 was tested using T22, a synthetic antagonist specific to this receptor 38,42. To probe the use of the Dioll-based fluorescence quantification method with proteoliposomes, we quantified lipid concentration in six different protein production batches (Figure 4). Transmembrane proteins are known to modify membrane fluidity towards a more disordered conformation. This was the case for CXCR4, which increased the 490 nm contribution on the Dioll fluorescence emission spectrum, which corresponds to a membrane in a more fluid state (data not shown). As described above, the surface under the curve parameter allowed us to overcome the modifications in membrane fluidity and in the shape of the spectrum. Indeed, membrane lipid concentration in the sample obtained by Dioll method correlated well with phospholipid membrane amount obtained by Stewart method, after protein precipitation with acetone and lipid extraction with chloroform. Hence, the Dioll-based quantification of membranes turns out to be a fast and easy to use method of proteoliposome quantification.

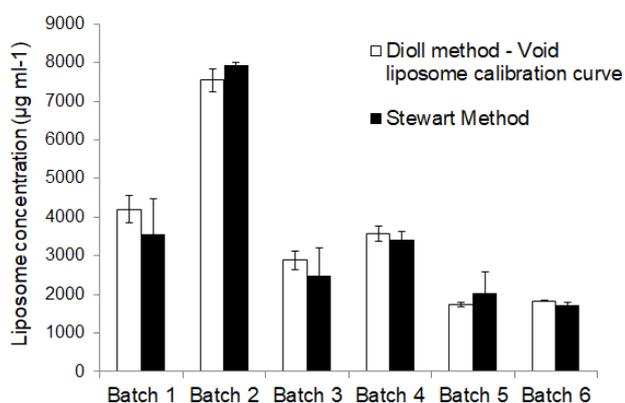


Figure 4 : Proteoliposomes quantification using the Dioll (white bar) and Stewart (black bar) methods. Proteoliposomes were obtained following previously described protocols 38. Six different samples were tested. Error bars are SD obtained with 3 independent experiments.

To summarize, the use of the surface under the curve proved to be a robust parameter for the Dioll-based method to quantify

membrane lipids with respect to the order state of the membrane. By using a simple standard such as plain liposome solution and a constant fluorophore concentration, one can determine membrane amount in samples of different compositions: DMPC, DPPC, cholesterol-containing liposomes, negatively charged liposomes or protein-containing liposomes.

The challenge was now to measure membrane lipid concentration in various natural vesicles, such as extracellular vesicles in general, and exosomes in particular. The number of studies on exosomes in various physiological and pathological conditions is exponentially growing. Indeed, exosomes are small vesicles (50 to 150 nm) secreted by cells, specific of their origin cell and which can be extracted from numerous body fluids (blood, urine...). They are therefore of interest for studies of pathologies, but also for the development of non-invasive diagnostic tools, notably in oncology 43. Measuring exosome concentration rapidly, with small sample volumes, in a non-destructive manner is of growing interest. Therefore, we adapted the Dioll-based quantification method to this type of vesicles. A standard curve based on POPC liposomes of known concentration in the presence of a constant Dioll concentration (2 µM) was recorded as the surface under the curve vs. liposome concentration in the well, as described above. Exosome samples were incubated with the same Dioll concentration as the standard solution, and the surface under the curve was determined. Vesicle concentration was obtained using a hyperbolic fit of the standard curve and a value of $98 \pm 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ was calculated, which correlated with phospholipid determination obtained using Stewart method ($102 \pm 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Figure 5).

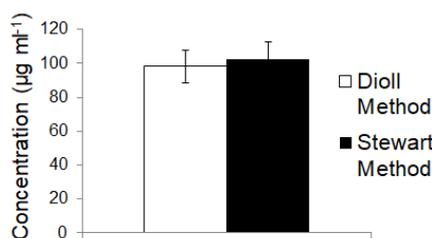


Figure 5: Quantification of exosomes using the Dioll (white bar) and Stewart (black bar) methods. POPC liposomes were used as standards in both cases. Error bars are SD obtained with 3 independent measurements.

A second type of vesicles used in this study was obtained from living cells by plasma membrane budding. GPMVs are derived from biological cells, by chemically induced plasma membrane vesiculation (here with 25 mM formaldehyde, 2 mM DTT in PBS) or ‘‘blebbing’’ 40.

This type of vesicles is largely used to analyze phase coexistence in systems with realistic biological membrane compositions 40,44,45 or peptide penetration across membranes 46,47. Given the raising interest in the study of plasma membrane heterogeneities, we determined the amount of membranes in the GPMVs samples. As expected from literature data 40,44, GPMVs obtained by this method show simple, low-curvature geometries of giant unilamellar vesicles and appear free of cytoskeletal constraints (Figure 6A). Using Dioll fluorescence, a lipid concentration of $84 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ was obtained from an estimated PC-3 cell population of 5 million. Using the Stewart method a good correlation was observed with an estimated phospholipid sample concentration of $87 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figure 6B).

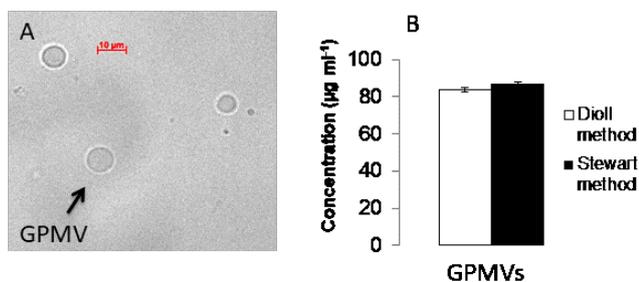


Figure 6: Evaluation of the Dioll method using GPMVs. (A) GPMVs observed with an optical microscope. (B) Quantification of GPMVs with the Dioll (white bar) and Stewart (black bar) methods. GPMVs were obtained by incubation of PC-3 cells with a 2 mM DTT/ 25 mM formaldehyde solution. Dioll quantification was performed using POPC liposomes as standard. Regarding the Stewart method, lipids were extracted with chloroform and quantified as described in the experimental section. Error bars are SD obtained with 3 independent measurements.

Discussion

Quantification methods of membrane lipid content in various samples are scarce and require either lengthy protocols involving lipid extraction, costly instruments, or energetic conditions.

Here, we present a new, rapid and easy to use method of membrane lipid quantification in artificial and natural vesicles based on the fluorescence of a Laurdan derivative, Dioll 1-(6-((2,3-dihydroxypropyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)dodecan-1-one). This fluorophore has a very low fluorescence in aqueous buffers, but when it spontaneously inserts into lipid bilayers its fluorescence drastically increases. We checked therefore whether this was a regular increase by incubating a constant amount of fluorophore with increasing amounts of liposomes (Figure 1). A hyperbolic dependency existed, not only between the maximum fluorescence intensity, but also between the surface under the fluorescence emission spectra and the lipid amount in the sample. This parameter, does not depend on the membrane fluidity and may serve as a universal parameter to quantify membranes.

To check this hypothesis, 3 types of liposomes were prepared with lipids with different ordering degrees at room temperature (23°C): POPC (fluid state), DMPC (phase transition) and DPPC (gel state). The amount of liposomes was quantified using as standards either liposome solutions of the same nature, or liposome solutions of different fluidity. Quantification results (Figure 2) show that similar results were obtained whatever the com-

References

- Sezgin, E.; Schwille, P. Model Membrane Platforms to Study Protein-Membrane Interactions. *Mol. Membr. Biol.* **2012**, *29* (5), 144–154. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.700490>.
- Shen, H.-H.; Lithgow, T.; Martin, L. Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes: Seeking Better Ways to Retain Protein Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (1), 1589–1607. <https://doi.org/10.3390/ijms14011589>.
- Pick, H.; Alves, A. C.; Vogel, H. Single-Vesicle Assays Using Liposomes and Cell-Derived Vesicles: From Modeling Complex Membrane Processes to Synthetic Biology and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (18), 8598–8654. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00777>.
- Torchilin, V. P. Multifunctional, Stimuli-Sensitive Nanoparticulate Systems for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (11), 813–827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>.
- Tamm, L. K.; McConnell, H. M. Supported Phospholipid Bilayers. *Biophys. J.* **1985**. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83882-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83882-0).
- Sackmann, E.; Tanaka, M. Supported Membranes on Soft Polymer Cushions: Fabrication, Characterization and Applications. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18* (2), 58–64. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01412-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01412-2).
- Sackmann, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science* (80-.). **1996**, *271* (5245), 43–48. <https://doi.org/10.1126/science.271.5245.43>.
- Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3497–3505. <https://doi.org/10.1021/la052687c>.
- Rebaud, S.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A. P. Tethered Bilayer Lipid Membranes (TBLMs): Interest and Applications for Biological Membrane Investigations. *Biochimie* **2014**, *107* (Part A), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.021>.
- Elderdfi, M.; Sikorski, A. F. Langmuir-Monolayer Methodologies for Characterizing Protein-Lipid Interactions. *Chemistry and*

position of the standard solution. Moreover, the lipid concentrations in the samples correlated well with those obtained by Stewart method after lipid extraction in chloroform. Thus, a plain solution of POPC liposomes of known concentration may serve as standard for samples of diverse lipid composition and diverse membrane states.

Detection and quantification limits of the POPC standard curve attained values as low as 0.4 and 1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively, comparable with those of Bartlett and Stewart methods, which allows one to quantify low amounts of lipids in biological samples. Although a fluorophore is inserted into the bilayer, this method is not destructive and liposomes, proteoliposomes or diverse vesicles may be used for further applications.

The sensitivity of the method was good up to 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figure 1 and 2). Above this value, the intensity of fluorescence reaches a plateau and samples require dilution. The sensitivity of the method depends on the instrumental response to the variation in the analyte concentration, therefore it is instrument-dependent. In our conditions, by using an instrument such as TECAN InfiniteM200, we were able to detect variations in the liposome concentrations in the range of 1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Robustness of the detection method was checked with respect to the presence of cholesterol (Figure 3A) and negatively charged lipids (Figure 3B). A good correlation was obtained with phospholipid quantification by Stewart method. Therefore, this method was used for quantification of more complex vesicles, such as proteoliposomes (Figure 4), and natural vesicles, such as exosomes (Figure 5) and GPMVs (Figure 6). If we consider the insertion mode of its analogue, Laurdan, Dioll is expected to fit between lipids at the level of the glycerol backbone 48. Therefore, the fluorescence intensity is dependent on the amount of phospholipid membranes. Cholesterol and other components, like proteins in proteoliposomes, or glycolipids in natural vesicles, largely influence membrane fluidity and, consequently, the shape of the spectrum, but did not influence fluorescence yield in terms of surface under the curve. Therefore, systematic correlation was obtained between membrane content determined by Dioll and phospholipid concentration determined by Stewart method.

To conclude, Dioll fluorescence can be used as a parameter to measure the amount of phospholipid membranes in complex samples without solvent extraction and that, by using simple liposome compositions as standards. The detection method, based on fluorescence, is fast, simple to use, sensitive and requires standard lab equipment.

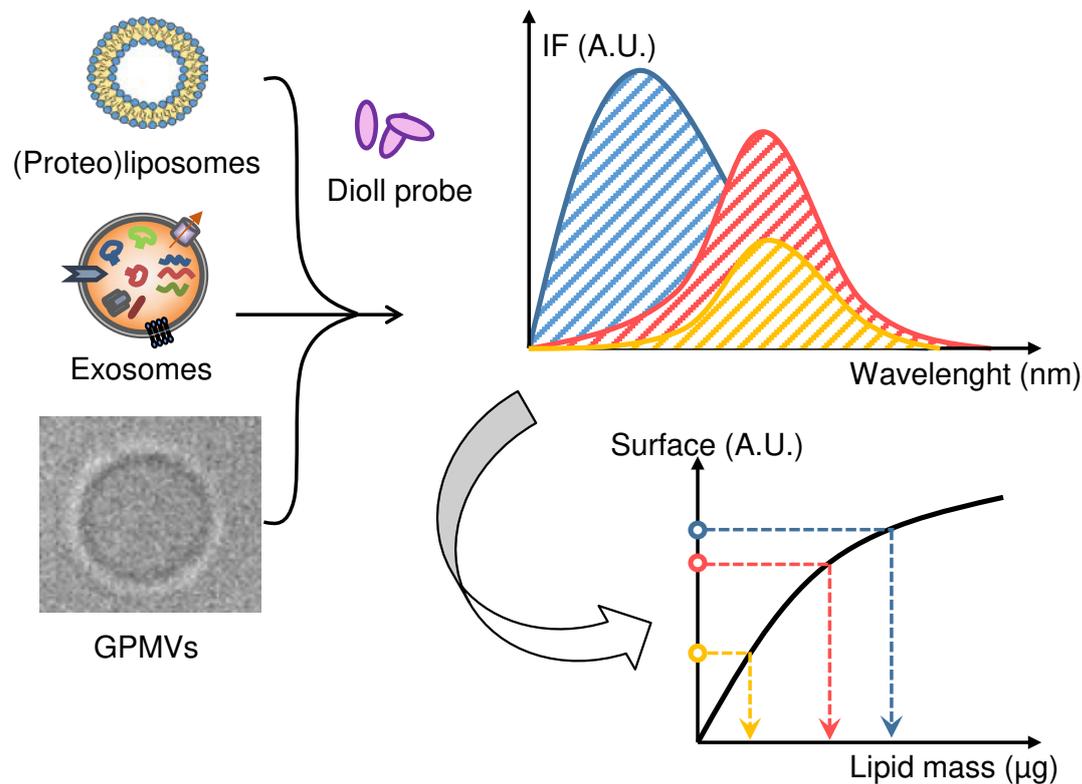
Acknowledgments: We acknowledge funding from CNRS (pre-maturation program) and the Technology Transfer Accelerator Office Lyon-Saint-Etienne *Pulsalys*. We thank Synthelis (Grenoble, Fr) for kind gift of proteoliposomes.

Physics of Lipids. 2018, pp 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.01.008>.

- (11) Daear, W.; Mahadeo, M.; Prenner, E. J. Applications of Brewster Angle Microscopy from Biological Materials to Biological Systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859* (10), 1749–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.06.016>.
- (12) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100–102* (SUPPL.), 563–584. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4).
- (13) Poulos, S.; Morgan, J. L. W.; Zimmer, J.; Faham, S. Bicyclics Coming of Age: An Empirical Approach to Bicelle Crystallization. *Methods Enzymol.* **2015**, *557*, 393–416. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.12.024>.
- (14) Durr, U. H. N.; Goldenberg, M.; Ramamoorthy, A. The Magic of Bicyclics Lights up Membrane Protein Structure. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 6054–6074. <https://doi.org/10.1021/cr300061w>.
- (15) Borch, J.; Hamann, T. The Nanodisc: A Novel Tool for Membrane Protein Studies. *Biol. Chem.* **2009**, *390* (8), 805–814. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.091>.
- (16) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- (17) Samad, A.; Aqil, Y. S. and M. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery*. 2007, pp 297–305. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/156720107782151269>.
- (18) Ahmed, K. S.; Hussein, S. A.; Ali, A. H.; Korma, S. A.; Lipeng, Q.; Jinghua, C. Liposome: Composition, Characterisation, Preparation, and Recent Innovation in Clinical Applications. *J. Drug Target.* **2018**, 1–20. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>.
- (19) Shah, S.; Dhawan, V.; Holm, R.; Nagarsenker, M. S.; Perrie, Y. Liposomes: Advancements and Innovation in the Manufacturing Process. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>.
- (20) Kuhn, A.; Haase, M.; Leptihn, S. Assisted and Unassisted Protein Insertion into Liposomes. *Biophys. J.* **2017**, *113* (6), 1187–1193. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.027>.
- (21) Rigaud, J.-L.; Pitard, B.; Levy, D. Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes: Application to Energy-Transducing Membrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1995**, *1231* (3), 223–246. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00091-V](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00091-V).
- (22) Soranzo, T.; Martin, D. K.; Lenormand, J.-L.; Watkins, E. B. Coupling Neutron Reflectivity with Cell-Free Protein Synthesis to Probe Membrane Protein Structure in Supported Bilayers. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 3399. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03472-8>.
- (23) Mus-Veteau, I.; Demange, P.; Zito, F. Membrane Protein Production for Structural Analysis. In *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*; 2014; pp 3–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0662-8_1.
- (24) Carlson, E. D.; Gan, R.; Hodgman, C. E.; Jewett, M. C. Cell-Free Protein Synthesis: Applications Come of Age. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30* (5), 1185–1194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.016>.
- (25) Bartlett, R.; Clinic, S.; Jolla, L. Phosphorus Assay in Column. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234* (3), 466–448.
- (26) G, R.; S, F.; A, Y. Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. *Lipids* **1970**, *5*, 494–496. <https://doi.org/10.4218/etrij.17.0116.0074>.
- (27) Stewart, J. C. M. Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrioxalate. *Anal. Biochem.* **1980**, *104* (1), 10–14. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90269-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9).
- (28) Brouwers, J. F. Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Phospholipids. *Chromatography, Ionization and Quantification. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2011**, *1811* (11), 763–775. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.08.001>.
- (29) Ayciriex, S.; Regazzetti, A.; Gaudin, M.; Prost, E.; Dargère, D.; Massicot, F.; Auzeil, N.; Laprèvote, O. Development of a Novel Method for Quantification of Sterols and Oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: Application to a Neuroinflammation Rat Model. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6396-6>.
- (30) Roces, C. B.; Kastner, E.; Stone, P.; Lowry, D.; Perrie, Y. Rapid Quantification and Validation of Lipid Concentrations within Liposomes. *Pharmaceutics* **2016**. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030029>.
- (31) Han, Y.; Wen, Q.; Chen, Z.; Li, P. Review of Methods Used for Microalgal Lipid-Content Analysis. In *Energy Procedia*; 2011. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.10.124>.
- (32) Hein, R.; Uzundal, C. B.; Hennig, A. Simple and Rapid Quantification of Phospholipids for Supramolecular Membrane Transport Assays. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (7), 2182–2185. <https://doi.org/10.1039/c5ob02480c>.
- (33) Elmer-Dixon, M. M.; Bowler, B. E. Rapid Quantification of Cardiolipin and DOPC Lipid and Vesicle Concentration. *Anal. Biochem.* **2017**, *520*, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.024>.
- (34) Parasassi, T.; Gratton, E. Membrane Lipid Domains and Dynamics as Detected by Laurdan Fluorescence. *J. Fluoresc.* **1995**, *5* (1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/BF00718783>.
- (35) Parasassi, T.; Di Stefano, M.; Loiero, M.; Ravagnan, G.; Gratton, E. Influence of Cholesterol on Phospholipid Bilayers Phase Domains as Detected by Laurdan Fluorescence. *Biophys. J.* **1994**, *66* (1), 120–132. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80763-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80763-5).
- (36) Parasassi, T.; Conti, F.; Gratton, E. Time-Resolved Fluorescence Emission Spectra of Laurdan in Phospholipid Vesicles by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry. *Cell. Mol. Biol.* **1986**, *32* (1), 103–108.
- (37) Bompard, J.; Rosso, A.; Brizuela, L.; Mebarek, S.; Blum, L. J.; Trunfio-Sfarghiu, A.-M.; Lollo, G.; Granjon, T.; Girard-Egrot, A.; Maniti, O. Membrane Fluidity as a New Means to Selectively Target Cancer Cells with Fusogenic Lipid Carriers. *Langmuir* **2020**, *36* (19), 5134–5144. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00262>.
- (38) Chadli, M.; Rebaud, S.; Maniti, O.; Tillier, B.; Cortès, S.; Girard-Egrot, A. New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir* **2017**, *33* (39), 10385–10401. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01636>.
- (39) Théry, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. cell Biol.* **2006**, *30* (1), 3.22.1–3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.
- (40) Baumgart, T.; Hammond, A. T.; Sengupta, P.; Hess, S. T.; Holowka, D. A.; Baird, B. A.; Webb, W. W. Large-Scale Fluid/Fluid Phase Separation of Proteins and Lipids in Giant Plasma Membrane Vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (9), 3165–3170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611357104>.
- (41) Yeagle, P. L. Cholesterol and the Cell Membrane. *BBA - Reviews on Biomembranes*. 1985. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90011-5).
- (42) Chadli, M.; Maniti, O.; Marquette, C.; Tillier, B.; Cortès, S.; Girard-Egrot, A. A New Functional Membrane Protein Microarray Based on Tethered Phospholipid Bilayers. *Analyst* **2018**, *143* (9), 2165–2173. <https://doi.org/10.1039/c8an00260f>.

- (43) Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- (44) Baumgart, T.; Hess, S. T.; Webb, W. W. Imaging Coexisting Fluid Domains in Biomembrane Models Coupling Curvature and Line Tension. *Nature* **2003**, *425* (6960), 821–824. <https://doi.org/10.1038/nature02013>.
- (45) Lingwood, D.; Ries, J.; Schuille, P.; Simons, K. Plasma Membranes Are Poised for Activation of Raft Phase Coalescence at Physiological Temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (29), 10005–10010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804374105>.
- (46) Maniti, O.; Piao, H. R.; Ayala-Sanmartin, J. Basic Cell Penetrating Peptides Induce Plasma Membrane Positive Curvature, Lipid Domain Separation and Protein Redistribution. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *50* (1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.017>.
- (47) Maniti, O.; Blanchard, E.; Trugnan, G.; Lamazire, A.; Ayala-Sanmartin, J. Metabolic Energy-Independent Mechanism of Internalization for the Cell Penetrating Peptide Penetratin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44* (6), 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.010>.
- (48) Jurkiewicz, P.; Cwiklik, L.; Jungwirth, P.; Hof, M. Lipid Hydration and Mobility: An Interplay between Fluorescence Solvent Relaxation Experiments and Molecular Dynamics Simulations. *Biochimie*. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.027>.

Insert Table of Contents artwork here



DISCUSSION

I- Optimisation de la mesure de la fluidité membranaire par la sonde Dioll :

Lors de ma thèse, j'ai pu montrer à partir de modèles *in vitro* que les modulations métaboliques présentes lors de l'acquisition d'un phénotype plastique, que l'on retrouve lors de la mise en place de mécanismes de dédifférenciations, peuvent être suivies grâce à la mesure de la fluidité membranaire. La stratégie envisagée pour effectuer ces mesures de fluidité membranaire et le développement d'outils de diagnostic basés sur le suivi de ce paramètre physico-chimique des membranes cellulaires mettent en œuvre l'utilisation de sondes fluorescentes ratiométriques sensibles à l'hydratation des membranes^{245,265}. Or, par leur nature, les sondes préexistantes, telles que le Laurdan, possèdent des désavantages pour une utilisation sur des modèles biologiques (marquage des gouttelettes lipidiques, faible intensité, agrégation en milieu aqueux, rapport quantique dépendant de l'environnement et donc différent entre les deux longueurs d'onde d'émissions). Afin de pallier ces défauts, des travaux d'une thèse antérieure au sein de l'équipe ont été consacrés à la création de sondes analogues du Laurdan²⁶⁰. L'une des sondes obtenues, nommée Dioll, possède des caractéristiques intéressantes sur des modèles de membranes biomimétiques. En effet, le Dioll possédant une structure moins hydrophobe que celle du Laurdan, permet une meilleure solubilisation tout en gardant la capacité de suivre la fluidité membranaire, avec en plus une meilleure résolution des variations de fluidité. Ma première partie de thèse a donc été consacrée à la validation de cette sonde pour le suivi de la fluidité membranaire des cellules. Mes différents travaux ont révélé plusieurs avantages du Dioll comparativement aux autres sondes ratiométrique utilisées jusqu'à présent dans la littérature, palliant une grande partie de leurs inconvénients cités plus haut. La première est la distribution du Dioll dans l'ensemble des membranes cellulaires ou du moins dans les membranes principales de la cellule. En effet, le co-marquage du Dioll avec des sondes spécifiques de certaines organelles (mitochondrie, réticulum endoplasmique, noyau, lysosome) montre le marquage de leur membrane par le Dioll. Même si ces résultats sous-entendent que sa distribution doit s'effectuer dans l'ensemble des membranes, il serait intéressant de les confirmer par des co-marquages avec des sondes spécifiques du trafic vésiculaire, l'appareil de Golgi ou encore du peroxysome. Lors de nos observations, nous avons pu obtenir une qualité d'image encore jamais atteinte, permettant de mesurer pour la première fois *in cellulo* la fluidité membranaire des différentes membranes. Ces résultats mettent clairement en évidence un niveau de fluidité membranaire en adéquation avec la composition des membranes décrite dans la littérature, avec dans l'ordre de fluidité croissante la membrane plasmique, le RE, la mitochondrie et le noyau¹⁷². Ces mesurent ont été rendues possible, grâce à une meilleure discrimination des domaines fluides par le Dioll, mais aussi grâce au fait que le rendement quantique du Dioll reste élevé même dans les régions désordonnées. De plus, nous avons pu montrer lors de nos travaux qu'il était possible de mesurer la fluidité membranaire lors d'un marquage au Dioll à l'aide de différents appareils. Pour la mesure sur cellule entière nous avons des mesures efficaces à partir de la spectrofluorimétrie, la cytométrie en flux et la microscopie

confoalce. Cependant pour des mesures sur des membranes spécifiques d'une cellule, seule la microscopie confocale est utilisable.

L'ensemble de ces avancées techniques ouvrent de nouvelles perspectives notamment sur le suivi de modulations dynamiques de la fluidité membranaire dans un contexte sain ou pathologique. Le Dioll n'étant pas cytotoxique pour les cellules, il est donc possible de suivre une cinétiquement l'évolution la fluidité membranaire. Cette caractéristique du Dioll permettrait dans des conditions normales de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'homéostasie des membranes et de la réponse cellulaire aux variations de fluidités. Il pourrait de même être intéressant de comprendre par imagerie de cellules vivantes comment la cellule répond à des modifications nutritives notamment en variant l'apport lipidique. Des travaux antérieurs, utilisant le c-Laurdan, ont pu mettre en évidence qu'un import exogène en DHA induisait une augmentation de la fluidité membranaire de la cellule. En réponse à cette augmentation de fluidité, la cellule retrouve une homéostasie de ses membranes en augmentant la synthèse de cholestérol grâce à l'activation de SREBP2²⁵⁵. L'une des questions qui reste en suspens est le mécanisme permettant son activation lors de l'augmentation de la fluidité membranaire. Alors que ces résultats sous-entendent une sensibilité de l'activation de SREBP2 à la modulation de la fluidité membranaire, il serait intéressant d'imaginer un protocole de co-marquage du Dioll avec une protéine SREBP2 de fusion couplée à une protéine fluorescente (par exemple iRFP). Une telle expérimentation permettrait ainsi de suivre en direct la cinétique d'activation du SREBP2 couplé à la modulation du GP. Si ce dernier est activé dans des régions au GP spécifique, ceci sous-entendrait que l'activation de SREBP2 serait sensible à un contexte particulier de fluidité membranaire du RE. J'ai pris pour exemple l'activation de SREBP2, cependant l'activation d'autres protéines dans un contexte de modifications de compositions lipidiques reste encore mal comprise²⁶⁶⁻²⁶⁹. En plus de l'analyse des mécanismes associés aux modulations de la fluidité membranaire au sein des cellules saines, l'utilisation du Dioll dans un contexte pathologique pourrait être utilisée pour comprendre les maladies associées à un déséquilibre métabolique qui comme dans le cas du diabète 2 ou encore dans les maladies cardiovasculaires peut impacter la composition membranaire des cellules. Il serait donc intéressant de comprendre dans quelle mesure ces modulations métaboliques impacteraient les membranes cellulaires et les mécanismes associées à cette dérégulation²⁷⁰⁻²⁷². Tout comme les pathologies précédemment citées, les maladies neurodégénératives sont aussi associées à des dérégulations du métabolisme lipidique pouvant donc se traduire par des modifications de la fluidité membranaire. Je prendrai deux exemples :

Le premier, la maladie d'Alzheimer qui est une pathologie associée à l'activité des bêta et gamma sécrétases formant des peptides β -amyloïdes. Ces peptides vont par leurs agrégations produire des plaques peptidiques qui déstabilisent l'activité des neurones. Du fait de l'activité des sécrétases au niveau de la membrane, il est justifiable de se demander si ces dernières seraient susceptibles d'être modulées par des variations de leur environnement membranaire. Il serait donc intéressant à partir du Dioll de regarder s'il existe des conditions dans lesquelles le niveau de fluidité membranaire induirait une activité pathologique de ces enzymes, d'autant plus que cette maladie est aussi associée à une modulation du métabolisme des lipides^{273,274}.

Je terminerai avec mon second exemple qui est la maladie de Huntington. Cette pathologie est associée à une altération du métabolisme des lipides, tout particulièrement celui du cholestérol, se traduisant par sa diminution au niveau cellulaire. Ce métabolisme réduit du cholestérol couplé à son faible renouvellement au niveau du système nerveux a pour conséquence des troubles neurodégénératifs²⁷⁵. Dans ce contexte, des molécules analogues au cholestérol ont été utilisées comme traitement. Dans ces travaux, l'analyse de l'activité de la molécule a été effectuée par un suivi de la fluidité membranaire des mitochondries après leur purification²⁷⁶.

En regardant ces résultats, deux avantages ressortent à l'utilisation du Dioll :

Premièrement, dans un but du suivi de l'activité d'une molécule active, le Dioll permettrait d'effectuer des mesures *in cellulo* gardant ainsi les organelles dans un environnement cellulaire et évitant des biais lors de la purification.

Deuxièmement, sachant que le Dioll marque l'intégralité des membranes, il est tout à fait possible d'imaginer la création d'un système de « drug discovery » haut débit dans lequel le marquage des cellules au Dioll suivi de mesures au lecteur de plaque permettrait de discriminer des molécules permettant la réacquisition d'une homéostasie membranaire normale.

Mes travaux de thèses ont aussi pu mettre en lumière le marquage des gouttelettes lipidiques par le Laurdan et le c-Laurdan, mais pas par le Dioll. La conséquence du marquage des gouttelettes lipidiques dans les papiers antérieurs est la focalisation systématique des modulations de la fluidité membranaire au niveau de la membrane plasmique, laissant de côté celle des endomembranes^{251,252}. Ce marquage des gouttelettes lipidiques peut être l'une des explications de la difficulté à effectuer des mesures répétables sur cellules entières lors de l'utilisation du Laurdan au sein de l'équipe. En effet, la quantité de gouttelettes étant fortement dépendante des variations nutritives, des changements au niveau de la culture cellulaire peuvent entraîner des variations de quantité de gouttelettes lipidiques et donc modifier le GP mesuré de la cellule d'une expérimentation à l'autre. Ainsi, la spécificité du Dioll à marquer uniquement les lipides membranaires est un avantage majeur pour éviter des biais lors de la mesure de la fluidité membranaire. Alors qu'il est assez intuitif, de par sa structure pauvre en région polaire, que le Laurdan ait la capacité de s'insérer au sein des gouttelettes lipidiques, il est beaucoup plus difficile de comprendre pourquoi le c-Laurdan se retrouve aussi au sein des gouttelettes lipidiques. L'une des explications pourrait venir de sa fonction carboxylique au niveau de sa région polaire. Il serait alors intéressant de voir si le c-laurdan par sa structure peut servir de substrat pour l'acylation des TAG et des ester de cholestérol, permettant alors son incorporation au sein des gouttelettes lipidiques.

Enfin comme je l'ai démontré lors de cette thèse, par son importante intensité de fluorescence (7 fois plus intense que le Laurdan incorporé dans les mêmes liposomes), il a été possible, grâce au Dioll de suivre la fluidité membranaire des vésicules sécrétées via l'utilisation d'un cytomètre en flux de type spectral. Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives notamment une meilleure discrimination des microvésicules et des exosomes par leur fluidité membranaire. En

effet, ces vésicules auraient respectivement une fluidité membranaire rigide et fluide due à leur origine, le « shedding » de la membrane plasmique et les corps multivésiculaires du système endosomale. Le couplage du Dioll avec la technologie de trieur par cytométrie en flux spectrale développé récemment par l'entreprise Cyteck® permettrait alors, non seulement de discriminer les différentes vésicules extracellulaires mais également de les trier par leur niveau de fluidité membranaire, qui semble être un marqueur de discrimination plus relevant que la taille et les marqueurs protéiques (des expériences sont en cours en collaboration avec l'entreprise Cytek®). Parallèlement, l'analyse protéomique de ces vésicules permettrait alors de décrire les EV afin de comprendre l'origine de ces vésicules qui restent encore mal comprises en comparant celles aux membranes rigides à celle aux membranes fluides. Je reviendrai sur les EV à la fin de la discussion dans la partie création d'outils de diagnostic.

Nous venons de voir certains avantages du Dioll tout particulièrement en ce qui concerne la mesure de la fluidité membranaire au sein des cellules vivantes, J'aimerais cependant souligner deux limites à l'utilisation du Dioll. La première est l'impossibilité de marquer les organismes comportant une paroi. En effet, par sa structure riche en molécules polaires, elle doit exercer une barrière physico-chimique au Dioll, qui par sa structure apolaire empêche son incorporation au sein des membranes lipidiques. En effet, lors de ma thèse, nous avons pu remarquer l'incapacité du Dioll à marquer les levures, limitant ainsi l'utilisation du Dioll sur l'analyse de cellules d'organismes de type animal multicellulaires. Enfin, la deuxième limite est sa fluorescence dans le bleu qui ne permet pas encore l'analyse dans les tissus de la fluidité membranaire. En effet, les basses longueurs d'onde ont un pouvoir pénétrant tissulaire très faible en comparaison des hautes longueurs d'onde.

II- Fluidité membranaire paramètre du suivi de la plasticité cellulaire :

Ainsi lors de cette première partie de thèse nous avons pu mettre en évidence l'intérêt d'utiliser le Dioll afin de suivre la fluidité membranaire des cellules. Comme je l'ai souligné dans l'introduction de ce manuscrit, quelques indices semblaient indiquer que cette propriété biophysique puisse être associée au développement tumoral et à l'agressivité des tumeurs même si le critère expliquant cette corrélation n'était absolument pas défini. Plus précisément, il était bien décrit que l'anabolisme des lipides était généralement augmenté, l'oléate étant considéré comme un acide gras particulièrement abondant dans les cellules cancéreuses permettant de maintenir les propriétés biophysiques de leurs membranes. Ce type d'observation était cependant difficile à concilier avec une propriété très spécifique des tumeurs puisque de façon générale les mécanismes de prolifération pathologique, mais aussi physiologique, sont associés avec une plus grande production de lipide. Intuitivement, le caractère mésenchymateux de certains carcinomes constituait aussi un autre indice d'un lien entre fluidité membranaire et agressivité des tumeurs, ce caractère étant important dans les processus de migration et d'invasion tissulaire. En effet, le processus de migration nécessite une certaine déformabilité cellulaire, et une plus grande fluidité membranaire pouvait sembler un élément intéressant à considérer dans ce contexte. En réalité, cette déformabilité est majoritairement soutenue par des mécanismes moléculaires associés au cytosquelette plus qu'à des modifications locales de

fluidité qui n'impacte que faiblement la capacité de la membrane à changer sa position ou sa courbure à l'échelle de la cellule.

Finalement, nous avons conceptualisé un nouveau lien entre la fluidité membranaire et une propriété fondamentale des cellules cancéreuses, complètement originales et de primes abords tout à fait inattendus de par l'éloignement apparent des mécanismes moléculaires impliqués dans ces deux propriétés. Très récemment, la plasticité cellulaire c'est-à-dire la capacité d'une cellule à bouleverser son identité est apparue comme une nouvelle propriété permettant de répondre à de nombreux problèmes conceptuels sur la compréhension des mécanismes du développement tumoral et les différents niveaux d'agressivité des tumeurs. Notamment, il était tout à fait déroutant d'observer que l'élimination des cellules les plus tumorigéniques ne permettait généralement pas d'éradiquer les tumeurs, cette population étant reconstituée à partir de cellules cancéreuses initialement moins agressives. La plasticité cellulaire et la dynamique phénotypique qu'elle permet sont alors apparues comme une des propriétés déterminantes de l'agressivité tumorale. Malheureusement, cette propriété, essentiellement basée sur des mécanismes épigénétiques, est difficile à mesurer et ne constituait pas a priori un élément pouvant être mis en lumière par la fluidité des membranes. Quelques éléments, que j'ai indiqués dans l'introduction, nous ont cependant guidés dans cette direction et encouragés à explorer ce lien. Pour rappel, la sensibilité à la ferroptose et quelques modulations du métabolisme des PUFA et du cholestérol dans des cellules cancéreuses à l'identité particulièrement altérée étaient des éléments intéressants qui pouvaient apparaître comme des indices de corrélation entre ces dérégulations épigénétiques et une plus grande fluidité des membranes.

En suivant cette piste, nous avons pu établir des preuves de concept assez solide du lien existant entre ces deux paramètres, excluant notamment le rôle du caractère mésenchymateux. L'analyse de la sensibilité de la ferroptose dans différentes lignées cancéreuses mammaires se voyait beaucoup plus marquée au sein des lignées Basal-like, que celles Luminal et Claudin-low. Cette analyse est intéressante, car les cellules Basal-like proviennent des tumeurs les plus agressives avec pour origine des cellules ayant subies des mécanismes de dédifférenciations induisant une altération profonde de leur identité cellulaire. Remarquablement, cette sensibilité à la ferroptose était associée à une fluidité membranaire plus importante au sein des lignées Basal-like. À l'inverse, les lignées Luminal qui elles ont gardé leur identité cellulaire d'origine, étaient moins sensibles à la ferroptose et arboraient une fluidité membranaire moindre. De façon étonnante, les lignées Claudin-low, qui a pour origine des progéniteurs très précoces, possédaient une sensibilité faible à la ferroptose corrélée à une faible fluidité membranaire. Comme je l'ai expliqué dans la discussion des résultats, la plasticité cellulaire élevée de la cellule d'origine de ce type de tumeur pourrait faire intervenir un mécanisme très transitoire permettant alors à la cellule d'acquérir rapidement une nouvelle identité cellulaire. Dans un second temps, nous avons généré un modèle *in vitro* dans lequel nous pouvions moduler l'identité cellulaire des cellules HMEC jusqu'à l'obtention de cellules aux caractéristiques progéniteurs bipotents et maintenues dans un état métastable. Ces cellules avaient la faculté de rentrer dans une voie de différenciation luminale et myoépithéliale et de façon contrôlée grâce à la régulation de l'environnement hormono-nutritif. Ce modèle dans lequel il était possible de faire varier le niveau de plasticité cellulaire nous a permis de démontrer que l'augmentation de

la fluidité membranaire était une nouvelle fois associée à l'acquisition d'une plus grande plasticité cellulaire. À l'inverse l'entrée de ces cellules dans un programme de différenciation était systématiquement corrélée à une perte de fluidité membranaire. De plus, comme nous allons le voir, la signature du transcriptome des cellules métastables est fortement liée à celle des cellules cancéreuses dynamiquement dédifférenciées décrites dans la littérature. Ces résultats qui portent en grande partie sur des modèles *in vitro* indiquent que la mesure de la fluidité membranaire est en adéquation avec les mécanismes que j'ai décrits dans l'introduction. Ainsi, l'acquisition d'un phénotype de types cellule cancéreuse dynamiquement dédifférenciée est associée à une augmentation de la fluidité des membranes. Cependant, comme indiqué dans la discussion des résultats n°2, nous n'avons pas encore effectué de liens entre fluidité membranaire et expérimentation *in vivo*. Il est donc à partir de notre modèle *in vitro* difficile de dissocier la fluidité membranaire de nos cellules plastiques telles que les métastables et les conditions de cultures, notamment la nécessité d'un enrichissement du milieu en PUFA pour l'acquisition et le maintien de la plasticité cellulaire. Sans revenir sur l'ensemble de ce qui a déjà été dit, les futures approches *in vivo* au sein de l'équipe permettront de valider s'il y a bien une corrélation entre fluidité membranaire et plasticité cellulaire et si dans notre modèle les cellules métastables acquièrent une capacité tumorigénique avec un fort potentiel d'adaptation tissulaire.

À partir de ces résultats, essentiellement corrélatifs, j'aimerais maintenant mettre en perspectives les données que nous avons obtenues avec des éléments de la littérature permettant de proposer une intégration mécanistique du contrôle de la fluidité des membranes et des processus associés à une plus grande plasticité épigénétique telle que celle retrouvée dans les cellules cancéreuses les plus agressives. Cet effort constituera d'autre part les bases conceptuelles permettant d'établir de nouvelles stratégies expérimentales nécessaires à la poursuite de ce projet et à la démonstration définitive du lien entre fluidité membranaire et plasticité cellulaire.

Métabolisme, réponse antioxydante et stress du RE au cœur de l'acquisition d'un phénotype plastique :

Je commencerai en première partie par investiguer le rôle probablement essentiel de NRF2 à l'acquisition d'un phénotype plastique, que ce soit dans notre modèle ou dans les cellules CCDD. Nous verrons dans un second temps les liens existant entre l'activation de NRF2, la plasticité et l'induction d'une réponse au stress du réticulum endoplasmique. Je m'attarderai ensuite sur les modulations nutritives potentiellement impliquées dans l'acquisition de ces phénotypes, aussi bien dans nos conditions expérimentales que dans un processus de développement tumoral *in situ*. Enfin j'apporterai des éléments sur les liens entre les perturbations métaboliques associés à la plasticité cellulaire des cellules cancéreuses et les mécanismes de contrôle de la fluidité membranaire. Je terminerai par une hypothèse tout à fait conceptuelle sur une raison thermodynamique permettant de comprendre les racines profondes du lien fluidité membranaire-plasticité cellulaire.

Le premier élément soutenant l'hypothèse d'une relation entre fluidité membranaire et plasticité cellulaire correspond à la mise en évidence d'une corrélation entre la sensibilité à la ferroptose des lignées cancéreuses mammaires et leur fluidité membranaire. Comme nous l'avons vu, une plus grande sensibilité à la ferroptose a fréquemment été associée aux cellules cancéreuses les plus tumorigéniques et à l'acquisition de propriétés retrouvées dans les cellules souches. Il était ainsi tout à fait intéressant de confirmer que les lignées Basal-like, justement plus tumorigénique et à l'identité mammaire profondément altérée, possédaient une sensibilité accrue à la ferroptose qui était associée à une fluidité membranaire importante. Face à cette sensibilité, il est donc probable que ces cellules soient particulièrement dépendantes à la mise en place de réponses antioxydantes efficaces, en particulier pour se protéger de la peroxydation lipidique. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse transcriptomique de la lignée métastable qui possède le caractère bipotent des cellules souches mammaire et qui, comme les cellules cancéreuses Basal-like, présente une fluidité membranaire plus importante que des progéniteurs engagés dans une des branches de la hiérarchie mammaire. En effet, ces cellules expriment de façon plus intense les gènes associés aux réponses au stress RedOx et à la ferroptose. Ces gènes sont principalement régulés par le facteur de transcription NRF2²⁷⁷, impliquant que celui-ci puisse posséder un rôle majeur dans le maintien d'un phénotype cellulaire à forte plasticité susceptible d'être enrichie en PUFA. De plus, un métabolisme du fer soutenu nécessaire au contrôle des mécanismes épigénétique et au maintien d'un phénotype plastique constitue sans doute un autre élément important de sensibilité au stress oxydant et à la ferroptose chez ces mêmes cellules²¹⁷. En résumé, l'activation de NRF2 pourrait constituer un carrefour moléculaire connectant les différentes propriétés associées aux cellules les plus plastiques, notamment dans le contexte du développement d'une tumeur. Cette idée rejoint les observations effectuées dans les laboratoires de Max Wicha et J.F Lo qui ont également montré dans différents modèles de carcinome le rôle central joué par NRF2 dans l'acquisition de propriété comme la quiescence, les fortes propriétés antioxydantes de ces cellules et surtout le maintien dynamique de leur très grande plasticité. De façon remarquable, ces études ont même associé les changements relatifs de niveau de stress oxydant à l'entrée des cellules cancéreuses très indifférenciées dans des processus de réacquisition d'identité cellulaire plus proche de celle des cellules normales^{152,278}.

Ayant introduit l'hypothèse de NRF2 comme un lien moléculaire essentiel aux propriétés de plasticité cellulaire exacerbées dans les cellules cancéreuses, je vais maintenant tenter d'étendre ce concept en y intégrant les données de la littérature à mes propres résultats. Mon but ici est notamment de démontrer la cohérence de l'hypothèse proposant que la plus grande fluidité des membranes associée à la plasticité cellulaire puisse être une conséquence directe de ces régulations génétiques et biochimiques. Je commencerai ici par revenir sur les états cellulaires dits hybrides associant à la fois des caractéristiques mésenchymateuses et épithéliales. Ces états, retrouvés dans les cellules Basal-like sont clairement la conséquence des processus de perte d'identité cellulaire et sont aujourd'hui considérés comme à la base des processus métastatiques, voir dans certaines conditions, à la base de l'initiation tumorale^{128,129,279}. L'analyse mathématique des réseaux de gènes supportant ces états hybrides a permis de mettre en évidence la présence de NRF2 en leur cœur et sa capacité à promouvoir un état hyper plastique en coopération avec le facteur ZEB1²⁸⁰. Ces analyses ont ensuite été confirmées par

des analyses *in vitro* montrant que la perte d'expression de *NFE2L2* (gène de NRF2) dans ces mêmes cellules hybrides favorisant l'acquisition d'une identité cellulaire mésenchymateuse. Des simulations informatiques par la méthode de « *Random Circuit Perturbation* » (RACIPE)²⁸¹ ont permis de mettre en évidence que l'état hybride était systématiquement associé à une expression élevée de NRF2. À l'inverse de ZEB1, SNAIL induisait quant à lui l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux aberrant et inversement corrélé à NRF2. Ces résultats sont à rapprocher des mécanismes nous ayant permis de générer la lignée métastable justement par le contrôle de l'activité de ZEB1 où, ce n'est pas l'activation constitutive du facteur qui place la cellule dans cet état de grande plasticité, mais plutôt son activation modérée en intensité et en durée. Il est ici intéressant de rappeler qu'en cas d'activation constitutive, de ce facteur ZEB1, les cellules HMEC adoptent elles aussi un état complètement mésenchymateux. De la même façon, l'acquisition du phénotype métastable de nos cellules n'était pas accompagnée d'une augmentation d'expression de SNAIL, voir même était diminuée en comparaison des cellules HMEC d'origines. En revanche, son augmentation était observée lors de l'induction de la différenciation des cellules métastable en cellules myoépithéliales, donc lorsque les cellules acquièrent une identité plus mésenchymateuse. Ainsi, nos résultats obtenus à partir des cellules métastables étaient similaires à ceux du modèle *in silico* précédemment décrit dans lequel l'activation de NRF2 joue un rôle essentiel. Il serait donc maintenant intéressant de comprendre quels sont les mécanismes qui permettraient l'activation de NRF2 dans le cadre d'une plus grande plasticité et la façon dont ces mécanismes connecteraient les modifications épigénétiques associées à cet état à la plus grande fluidité des membranes.

Le mécanisme classique permettant l'induction efficace de NRF2 est le déséquilibre de la balance RedOx qui, par l'augmentation des ROS et l'oxydation de cystéines, permet la libération de NRF2 d'une protéine chaperonne KEAP1. Cependant, d'autres mécanismes activant cette protéine ont été décrits. Une étude a pu mettre en évidence que lors de la mise en place d'un programme de dédifférenciation de cellules épithéliales mammaires par induction de l'expression de l'EMT-TF TWIST1, un mécanisme ROS-indépendant, mais lié au stress du réticulum endoplasmique permettait, par l'activation de PERK, d'induire une réponse de NRF2. Cette régulation homéostatique était essentielle, car son inhibition entraînait de façon spécifique à ces cellules une forte augmentation de la peroxydation lipidique. En résumé, un mécanisme moléculaire complexe semblait donc connecter une modification homéostatique du réticulum, potentiellement lipidique, à l'activation de NRF2 dans un modèle de dédifférenciation mammaire²⁸². Il est important de noter à ce niveau que même si l'induction de PERK s'effectue classiquement lors de la mise en place d'une réponse aux protéines mal repliées au sein du réticulum endoplasmique (*Unfold protein response*: UPR), l'altération des propriétés biophysiques des membranes du RE constitue sans aucun doute un autre signal activant le programme UPR, aussi bien lors d'une rigidification que d'une fluidification trop importante^{283,284,285}. Une hypothèse probable formulée à partir des précédents résultats est donc qu'un remodelage lipidique prenne place au sein du RE lors de la mise en place d'un mécanisme de dédifférenciation, sensibilisant la cellule au stress oxydant et à la ferroptose, et nécessitant en conséquence une activation de NRF2 rendu possible par ce mécanisme connectant l'homéostasie membranaire du RE à l'activation de ce facteur de transcription. Une élévation du niveau des PUFA au niveau du RE serait notamment un élément important de cette

régulation qui mériterait d'être vérifiée par des approches lipidomiques effectuées à partir de préparation de microsomes (Figure 19).

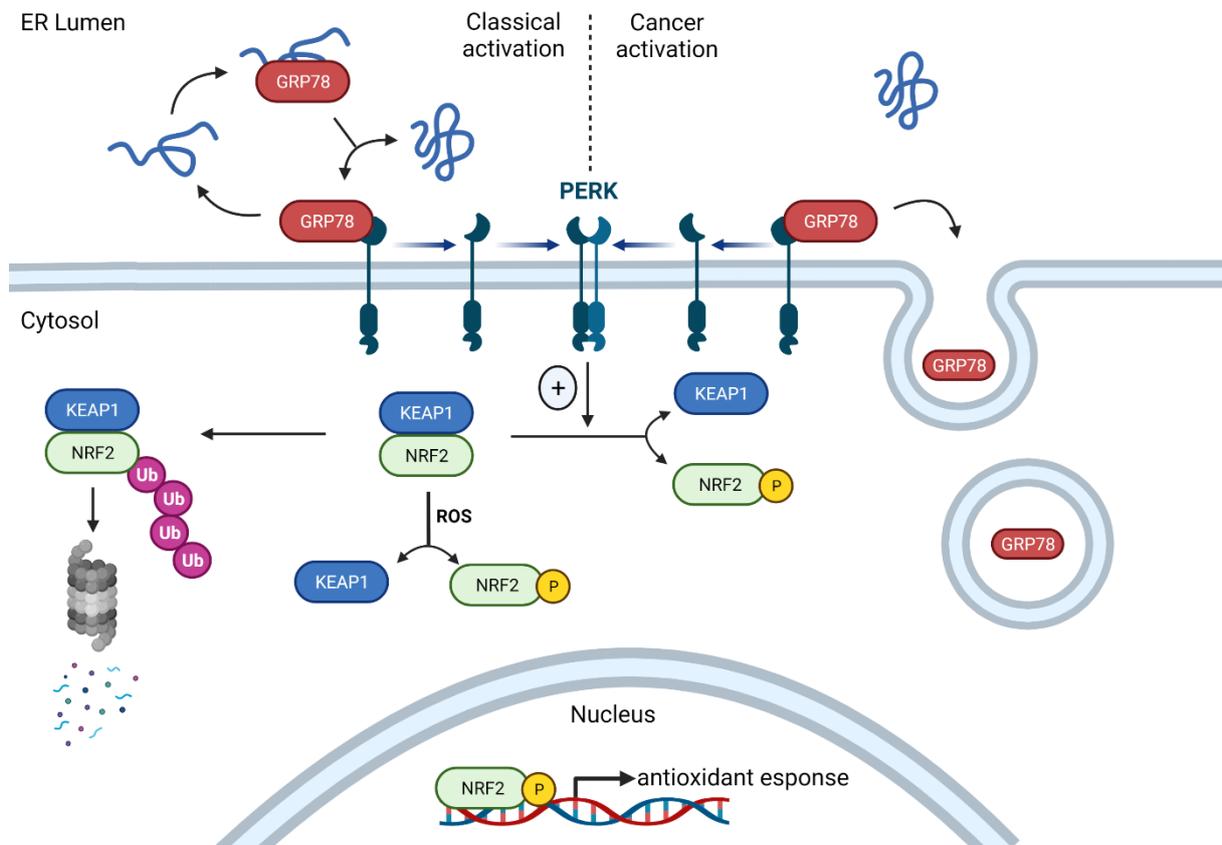


Figure 19 : Activation ROS dépendant et indépendant de NRF2. Deux types d'activations de NRF2 ont été décrits dans la littérature. La première passe par l'action des ROS sur KEAP1 ce qui permet de libérer NRF2. La seconde passe quant à elle par l'activation de NRF2 par PERK permettant alors sa dissociation de KEAP1. Cette activation par PERK peut s'effectuer lorsque la protéine chaperonne GRP78 se dissocie de PERK, soit lorsqu'elle effectue son activité chaperonne (en haut à gauche), soit lorsqu'elle est transloquée vers la membrane plasmique (en haut à droite)

Il est important de noter ensuite que ce modèle homéostatique couplant NRF2 à des perturbations homéostatiques et lipidiques du réticulum suite à l'élévation de la plasticité cellulaire a été rapporté dans d'autres études déjà mentionnées, mais est aussi validé par certaines de nos propres observations. Tout d'abord, l'activation de NRF2 par PERK a aussi été rapportée dans les cellules hybrides E/M²⁷⁸. Cette activation était connectée ici à une relocalisation des protéines chaperonnes inhibitrices de PERK à la membrane plasmique. Ces protéines, connues sous le nom de GRP78 (ou BiP) sont des régulateurs essentiels du stress du RE et il serait ainsi intéressant de vérifier si ce processus de relocalisation à la membrane plasmique est associé à des perturbations des propriétés biophysiques des membranes du RE. De façon similaire ensuite, nous avons pu observer une augmentation d'expression d'ATF4 dans notre lignée métastable en comparaison des cellules d'origines HMEC. La traduction de l'ARNm de ce facteur de transcription est elle-même augmentée par eIF2 α , elle-même activée par phosphorylation par PERK. De la même manière, l'analyse par immunohistochimie de coupe de tumeur triple négative, majoritairement basal-like, montre une plus forte expression d'eIF2 α et d'ATF4 en comparaison du tissu normal²⁸⁶. Ces résultats constituent d'autres

éléments indiquant que les processus de plasticité physiologiques ou pathologiques sont associés à des réponses de stress du RE. D'autre part, l'activation du facteur ATF4 pourrait être un autre événement moléculaire important permettant de connecter cette plasticité à une plus grande fluidité membranaire. L'activation de l'UPR, à travers notamment ATF4 s'accompagne de façon assez universelle d'une augmentation du volume de réticulum endoplasmique, ces résultats étant observés aussi bien chez l'homme que chez des organismes très simples comme la levure. Ce mécanisme aurait pour but de diluer les protéines intrinsèquement mal repliées et ainsi d'éviter leur agrégation, le point le plus délétère pour le contrôle de l'homéostasie du réticulum²⁸⁷⁻²⁸⁹. Nous avons nous-mêmes observé une tendance à un volume plus fort du RE dans notre lignée métastable et dans les lignées cancéreuses Basal-like en comparaison des autres modèles cellulaires étudiées. Ainsi, le ratio du volume du RE sur celui de la membrane plasmique serait augmenté dans les cellules possédant une plus grande plasticité phénotypique se traduisant alors par une augmentation apparente de la fluidité membranaire à l'échelle de la cellule entière puisque, comme je l'ai confirmé, la fluidité du RE est de façon générale bien supérieure à celle de la membrane plasmique. Enfin, j'aimerais souligner que l'ensemble des mécanismes que je viens de rapporter dans un contexte tumoral, ou au sein de notre modèle, semble également exister dans un modèle de plasticité extrême, les cellules iPS (*Induced pluripotent stem cell*)^{290,291}. Nous venons de voir que les cellules les plus plastiques possédaient en plus d'une réponse antioxydante induite par NRF2, un métabolisme associé en soutien à cette réponse. Au vu du rôle clé de l'environnement hormono-nutritif pour l'acquisition et le maintien de nos cellules métastables. Il est justifiable de se demander, *in vivo*, dans quel microenvironnement nous retrouvons les CCDD afin de tenter de comprendre les mécanismes liés à la plasticité cellulaire et à l'acquisition d'une fluidité membranaire plus importante.

Métabolisme, UPR et modulateur de l'identité cellulaire :

Ayant vu le rôle probable de la réponse UPR et de NRF2 lors de la mise en place d'un programme de plasticité, je voudrais maintenant apporter des éléments reliant le contrôle de l'identité cellulaire au niveau épigénétique à celle de l'homéostasie du RE. Les cellules cancéreuses mammaires Basal-like expriment de façon plus importante le gène ACSL4, codant pour une enzyme essentielle à l'activation de l'acide arachidonique²⁹² et qui est couplée à une plus forte sensibilité à l'inhibition des mécanismes anti-ferroptose²¹⁸. D'autre part, les facteurs de plasticité comme ZEB1 permettent d'augmenter également l'expression de l'enzyme GPX4 importante pour prévenir l'induction de la ferroptose en réponse à une augmentation du métabolisme des PUFA²⁹³. On voit ainsi que de façon très directe, les remodelages épigénétiques et les modifications d'homéostasies lipidiques peuvent être contrôlées par les mêmes facteurs inducteurs de plasticité. Pour aller plus loin, cette connexion pourrait en fait être renforcée par des mécanismes biochimiques. L'activation de la voie des hexosamines permet la production d'UDP-N-Acetylglucosamine, un substrat permettant l'ajout d'un groupement N-acetylglucosamine sur les sérines de certaines protéines. L'activité de la voie des hexosamines et cette modification post-traductionnelle (O-GlcNacylation) ont été fortement associées à de nombreux modèles de plasticité cellulaire et nous avons pu nous même

observer une élévation d'expression du gène GFPT2 dans notre lignée métastable, ce gène codant pour l'enzyme limitante de la voie des hexosamines. Des données du laboratoire montrent d'autre part que le gène GFPT2 est activé par un complexe transcriptionnel entre ZEB1 et les facteurs YAP, connectant ainsi de façon très directe l'activation de la voie des hexosamines au processus de plasticité. L'élément le plus intéressant à propos de cette régulation est la mise en évidence probable d'une boucle de régulation connectant l'activité de ces facteurs capables de perturber l'identité cellulaire, la voie des hexosamines et les enzymes de contrôle des PUFA. Au sein des tumeurs hépatiques, la O-GlcNacylation de YAP permet par exemple de le maintenir au sein du noyau, d'augmenter son activité protumorigénique et sa capacité à induire des caractères souches²⁹⁴. Dans ce même tissu, l'enzyme ACSL4 est elle-même modifiée post-traductionnellement par une O-GlcNacylation augmentant son activité, ce mécanisme étant fortement sollicité dans les hépatocarcinomes agressifs²⁹⁵. L'activité d'ACSL4 serait elle-même capable d'intensifier celle de la voie des hexosamines. Enfin, en dehors de ces régulations par O-GlcNacylation, des travaux par inactivation de YAP ont montré que le gène ACSL4 est lui-même régulé par YAP. On voit ainsi à travers ces résultats le très fort niveau d'intégration entre ces mécanismes génétiques et biochimiques permettant de relier probablement le contrôle de l'identité cellulaire à celui de la fluidité membranaire (Figure 20).

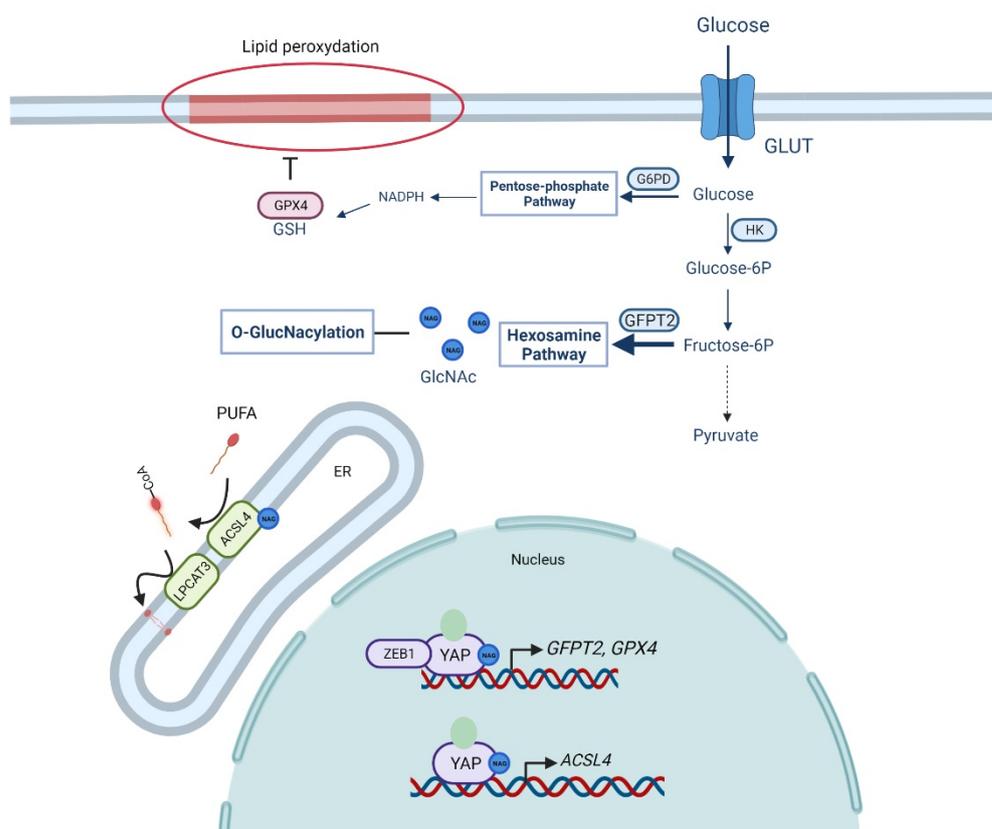


Figure 20 : Boucle de régulation des perturbateurs de l'identité cellulaire, la voie des hexosamines et le métabolisme des PUFA.

La présence presque certaine des facteurs YAP au cœur de ces réseaux constitue un élément sans doute fondamental à la connexion de ces régulations épigénétiques et lipidiques. Comme

je l'ai indiqué précédemment, les programmes de plasticité sont très fortement impactés par l'activité des facteurs ZEB1 et YAP qui sont capables de former un complexe transcriptionnel associée à la régulation génétique et épigénétique d'un nombre de gènes très importants, notamment dans le contexte du développement des tumeurs mammaires²⁹⁶, dont GFPT2 ferait partie. La régulation des facteurs YAP est un processus extrêmement complexe, impliquant des effets tissulaires par mécano-transduction et contrôle de la voie Hippo en réponse aux jonctions cellulaires formées par les cellules épithéliales. Cependant, un contrôle biochimique est également exercé sur YAP à travers l'activité de la voie du mévalonate et la production de géranylgeranyl-PP associée²⁰⁴. La voie du mévalonate permet d'autre part d'assurer à la fois la synthèse du cholestérol, et du CoQ₁₀, constituant autant de connexion entre le contrôle transcriptomique de la plasticité et des régulations biochimiques associées à l'homéostasie lipidique ou à la ferroptose. L'activation de la voie du mévalonate est normalement sensible au manque de dérivés du cholestérol permettant l'activation du facteur clef SREBP2 par sa translocation depuis le RE vers le noyau. Cependant dans un contexte de réponse UPR, SREBP2 peut être activé indépendamment de cette régulation par le cholestérol indiquant que l'induction de cette réponse UPR par modulation du métabolisme des PUFA puisse être à l'origine d'une intense activité de la voie des mévalonates. Que ce mécanisme puisse favoriser l'activation de YAP et une protection contre la ferroptose par une plus grande synthèse de CoQ₁₀ est une évidence, en revanche il est plus difficile de le relier à une plus grande fluidité des membranes, le cholestérol favorisant au contraire des effets opposés. Nous et d'autres avons observé dans les modèles de plasticité notamment mammaire que cette plus grande activité de la voie du mévalonate était couplée à une plus forte expression du récepteur à efflux du cholestérol ABCA1. Ainsi, même en cas de synthèse plus élevée du cholestérol, cela pourrait ne pas conduire à une élévation de sa concentration au sein des membranes. Ce mécanisme permettrait en parallèle de garantir la forte production de geranyl-geranyl-PP et de CoQ₁₀²⁹⁷. L'activation des pompes à efflux du cholestérol est d'autre part sous le contrôle des récepteurs nucléaires LXR²¹² et il est donc tout à fait intéressant d'observer que les protéines LXR tout comme les transporteurs à efflux du cholestérol d'ABCA1 sont fortement exprimés au sein des tumeurs mammaires triples négatives de sous-type Basal-like²¹³. Enfin, le traitement de tumeurs hormono-dépendantes, dans lesquelles l'identité cellulaire est plutôt bien conservée peuvent être rendues plus agressives, indépendantes aux œstrogènes et métastatiques suite à l'activation de LXR par son agoniste le 27-hydroxycholestérol. Un programme de plasticité était induit suite à ce traitement comme démontré par l'analyse de marqueurs du processus de l'EMT²¹², plaçant ainsi potentiellement la modulation du flux du cholestérol au cœur de l'acquisition d'une plus grande plasticité cellulaire, en soutien d'autres mécanismes vus précédents. Nous avons en ce sens effectué des marquages à la Filipin, afin d'observer si effectivement la concentration de cholestérol était augmentée ou pas par exemple dans notre modèle métastable. Comme attendu par rapport à l'expression des pompes à efflux, ces marquages n'ont pas démontré une accumulation de cholestérol. Une approche fluxomique est ainsi maintenant envisagée dans le but de caractériser si en revanche le flux du mévalonate est quant à lui activé dans ces modèles, complété par des approches pharmacologiques (statine), visant à vérifier si la perturbation de ce flux conduirait à empêcher la mise en place de ces programmes de plasticité à travers notamment l'inhibition de YAP ou un trop fort stress oxydant conduisant à la ferroptose.

Pour conclure sur cette partie, il est intéressant de se pencher d'une façon purement conceptuelle sur les raisons intrinsèques à cette connexion entre plasticité cellulaire au sens épigénétique et phénotypique, et une plus grande fluidité membranaire. La mise en place d'un tissu épithélial, tout comme les processus de régénération tissulaire associés à la cicatrisation sont sous le contrôle d'interactions morphogénétiques (voies WNT ou Notch parmi d'autres) et matricielles (contact avec les laminines des lames basales par exemple) prenant place au niveau de la membrane plasmique. La position des cellules au sein du tissu, et par extension, la position de ces contacts jouent un rôle fondamental dans ces processus de développement, en particulier dans les phénomènes de polarisation baso-apical et planaire. Ainsi on peut émettre l'hypothèse que la rigidification des membranes autour de ces contacts facilite leur stabilisation au sein des cellules ayant acquis leur identité terminale, ces deux phénomènes s'entretenant simultanément puisque les contacts notamment morphogénétiques participent de façon active au maintien de cette identité (on peut rappeler le réengagement des propriétés de bipotence dans les progéniteurs basaux mammaires suite à la perte de leurs contacts avec les cellules luminales). À l'inverse, une plus grande fluidité membranaire se mettant en place par exemple lors de la réacquisition d'une forte plasticité dans un processus de cicatrisation permettrait de dissoudre plus facilement ces points de contact tout en facilitant leur redistribution lors de la réacquisition d'une nouvelle identité. Ces mécanismes seraient bien sûr fortement perturbés dans le cadre du développement tumoral. Ces concepts, purement hypothétiques, soulèvent de nombreuses questions, comme par exemple la façon dont la fluidité des endomembranes participerait ou non à ces mécanismes. Aussi, indépendamment de tout mécanisme génétique et en lien avec ces hypothèses, il serait intéressant d'analyser si des modulations pharmacologiques de la fluidité membranaire pourraient conduire à la perturbation de ces contacts morphogénétiques et l'identité cellulaire qu'ils entretiennent. Dans ce contexte, la perturbation homéostatique pourrait alors être la cause pathologique à l'engagement des facteurs de plasticité comme ZEB1, leur activité étant elle-même sous le contrôle de ces régulations morphogénétiques et de ces contacts matriciels. Toutes ces questions pourraient faire l'objet d'un vaste programme de recherche.

Microenvironnement et plasticité cellulaire :

J'aimerais maintenant déplacer ce concept de plasticité cellulaire analysé pour l'instant de façon uniquement intrinsèque dans un cadre plus global de contrôle tissulaire, analysant notamment la façon dont ce cadre participe à modifier la fluidité membranaire. Au niveau d'une tumeur, l'environnement tissulaire est bien sûr perturbé, affectant notamment les gradients de concentration des composés hormonaux et nutritifs, notamment la concentration en O₂. Ainsi les processus de plasticité et la fluidité des membranes qui peuvent bien sûr être affectées par ces apports nutritifs sont vraisemblablement fortement influencés par ce contexte tissulaire. D'autre part, la communication paracrine des cellules cancéreuses avec les cellules normales de leur environnement est également susceptible de modifier leur engagement dans un processus plus ou moins exacerbé de plasticité. Je vais essayer de présenter maintenant ces deux aspects en y incorporant des éléments de mes propres travaux.

Je commencerais tout d'abord par m'intéresser aux interactions paracrines, notamment dans le contexte des niches périvasculaires. L'analyse par exemple de coupes histologiques de tumeurs de carcinomes de la tête et du cou de patient a permis de mettre en évidence une localisation des cellules les plus différenciées repérées par les marqueurs de surface CD44⁺ et ALDH1A1⁺ à proximité du réseau sanguin²⁹⁸. Des apports nutritifs importants pourraient ainsi être associés à une plus grande plasticité dans ce contexte. Cependant, la formation de sphère en 3D in vitro par des lignées cellulaires maintenues dans un milieu conditionné par des cellules endothéliales était améliorée et s'accompagnait d'une augmentation du nombre de CCDD. Des effets paracrines étaient donc a priori impliqués. Ce type d'effet a également été observé avec d'autres systèmes cellulaires comme les fibroblastes associés aux cellules tumorales (*Cancer associated fibroblast* : CAF), qui jouent un rôle sur l'activation de mécanisme de plasticité, notamment par leur sécrétion de TGFβ qui est un puissant inducteur du programme de l'EMT^{299,300}, mais aussi par la sécrétion de l'IL6^{110,301}. De façon similaire, des macrophages polarisés M2, eux aussi localisés de façon périvasculaire dans un modèle de cholangiocarcinome intra-hépatique peuvent favoriser par leur sécrétion d'Interleukine 10 (IL-10) un support à la croissance et à l'invasion tumorale, notamment grâce à l'induction de l'EMT et tout particulièrement de l'EMT-TF ZEB1 par l'IL-10³⁰². Des métabolites produits par les tumeurs pourraient être impliqués de façon directe dans ces phénomènes, notamment ceux comme la kynurénine issue de la dégradation du tryptophane. La kynurénine atténue notamment les réponses immunitaires via l'activation du récepteur AHR³⁰³, en exerçant notamment un fort contrôle sur la polarisation des macrophages. D'autre part, de nombreuses études et nos propres observations ont rapporté une plus forte expression du gène *KYNU* dans les cellules possédant une plus grande plasticité indiquant l'existence possible de boucles de régulations tissulaires entretenant cette plasticité. En effet ce gène favorise la libération de composés analogues à la kynurénine conduisant donc le système immunitaire et notamment les macrophages à favoriser ce même programme de plasticité par l'IL-10 qu'ils secrètent. Il est intéressant dans ce contexte de noter que la kynurénine est plus fortement concentrée au sein des tumeurs triples négatives³⁰⁴ et serait associée à une boucle de rétrocontrôle positive avec la prostaglandine E2 (PGE₂), qui pour rappel est synthétisée à partir de l'acide arachidonique³⁰⁵. Finalement, l'activation d'AHR par la kynurénine au sein même des cellules cancéreuses pourrait participer à leur plus grande plasticité et au contrôle de la fluidité des membranes. AHR permettrait tout d'abord la modulation du métabolisme lipidique et tout particulièrement celui des PUFA, augmentant alors la synthèse de PGE₂. Cette prostaglandine peut alors à son tour moduler l'activité de l'immunité au niveau de la tumeur en faveur de la croissance tumorale et permettrait le maintien de son expression en augmentant le métabolisme de la kynurénine. AHR d'autre part, a été récemment impliqué dans le contrôle des facteurs de transcription les plus essentiels à la physiologie des cellules souches embryonnaires comme Nanog et Oct4, ces régulations s'observant dans la plasticité mammaire, notamment dans le cadre de nos études sur le DPhP. Pour finir sur cet aspect de coopération avec le système immunitaire, j'aimerais mentionner également l'interaction métabolique existant entre les macrophages et les cellules cancéreuses au niveau de l'homéostasie du fer, qui comme nous l'avons vu, joue un rôle essentiel dans les processus épigénétiques associés à la plasticité. Il a ainsi été montré qu'une l'augmentation de l'efflux du fer dans le milieu extracellulaire par les macrophages pourrait par son incorporation au sein des cellules cancéreuses influencer les mécanismes associés au

remodelage épigénétique que l'on retrouve notamment lors de l'acquisition d'un phénotype CCDD^{217,306}.

Finalement, il est important de se pencher sur les communications paracrines mises en place avec les adipocytes périvasculaires.. Nous avons-nous même observé dans la lignée métastable une augmentation de l'expression de FABP4 qui couplée à un milieu enrichi en PUFA $\omega 6$ semble susceptible de favoriser l'acquisition et le maintien du phénotype métastable. Il est intéressant de constater que ces observations peuvent être corrélées à celles retrouvées dans des conditions *in vivo* lors d'une alimentation de type occidentale. En effet, il a pu être décrit qu'une alimentation riche en $\omega 6$ peut influencer l'acquisition d'un phénotype CCDD. Des travaux ont pu montrer qu'un milieu conditionné par des adipocytes primaires de souris ayant reçu une alimentation de type occidentale riche en $\omega 6$ permettait une augmentation de la plasticité cellulaire, notamment grâce aux facteurs protéiques sécrétés par les adipocytes tels que IL-6 ou encore l'Oncostatine M³⁰⁷⁻³⁰⁹. Un rôle des PUFA non considéré dans cette étude serait bien sûr intéressant à évaluer. De façon similaire, les processus de réoxygénation par traitement d'un agent chimique anti-angiogénique (sunitinib) sont suivis d'une augmentation de FABP4 lors de réémergence tumorale. La réoxygénation s'accompagnant d'un apport nutritif global, un possible rôle des PUFA pour lequel FABP4 est plus affiné semble donc aussi un élément probant à valider dans ce contexte³¹⁰. Ce rôle de FABP4 est sans doute majeur, car il a pu être validé de façon plus directe dans d'autres études. La co-culture d'adipocyte avec des cellules cancéreuses du colon *in vitro* et *in vivo* a pu mettre en évidence l'implication de FABP4 dans la mise en place des processus métastatiques, notamment grâce à une augmentation de l'activation d'un programme d'EMT³¹¹. D'autre part, FABP4, connue pour son affinité pour les PUFA $\omega 6$, a de façon plus globale, un rôle important pour l'incorporation des lipides libres sécrétés principalement par les adipocytes³¹².

En conclusion, il semble donc que l'expression de FABP4 par les cellules engagées dans un processus de plasticité intense favorise par interactions métaboliques avec les adipocytes une plus grande incorporation de PUFA $\omega 6$ que nous avons vu être probablement intrinsèquement liés avec les programmes de plasticité.

En bilan de cette partie, on voit donc qu'au niveau périvasculaire dans un contexte tumoral pathologique, des mécanismes génétiques semblent se mettre en place au sein des cellules les plus plastiques favorisant leur interaction avec les différentes composantes cellulaires présentes dans un but d'entretenir de façon paracrine et métabolique leur grande plasticité.

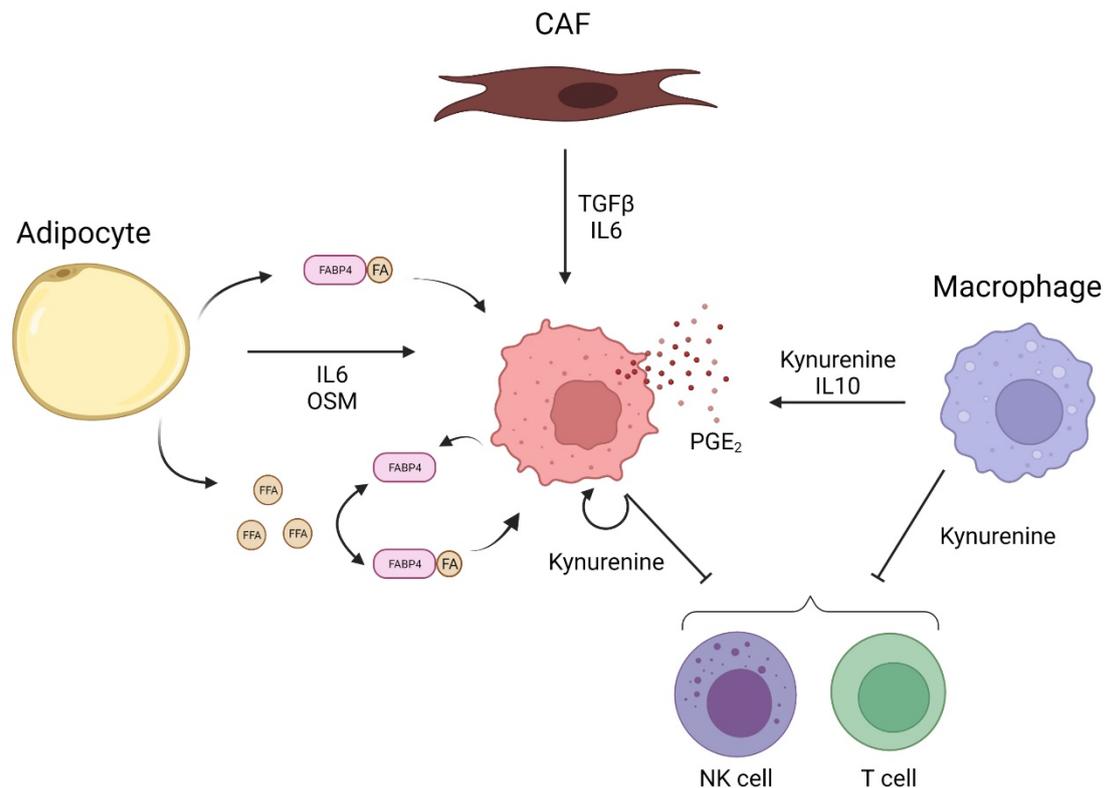


Figure 21 : Interactions des cellules cancéreuses avec le stroma. CAF (cancer associated fibroblast), NK cell (Natural killer cell), T cell (Lymphocyte T), OSM (Oncostatin M), IL6 et 10 (Interleukin 6 et 10), TGFβ (Transforming growth factor beta), PGE₂ (Prostaglandin E2), FA (Fatty acid), FFA (Free fatty acid)

Phénotype CCDD à la croisée d'un métabolisme et des facteurs pro-inducteurs de la plasticité :

Nous venons de voir que les cellules cancéreuses à forte plasticité n'étaient pas isolées dans le tissu, et que ses interactions avec les autres composantes cellulaires leur permettaient de soutenir l'acquisition et le maintien de leur phénotype. Au cours de la progression tumorale, l'environnement n'est pas statique, notamment dû à la croissance tumorale en elle-même, modifiant alors les interactions cellulaires, mais aussi les apports hormonaux et nutritifs. De plus lors de nos travaux nous avons pu mettre en évidence le rôle important de ces modulations pour l'acquisition d'un phénotype métastable et pour son maintien. J'aimerais donc dans cette partie décrire dans quelle région les cellules les plus plastiques pourraient se situer, mais aussi les modifications que peuvent exercer les cellules plastiques sur le tissu.

Comme nous l'avons vu, les interactions cellulaires permettraient d'engager les cellules dans l'acquisition d'un phénotype plastique, décrivant l'environnement périvasculaire comme une région propice à l'augmentation de la plasticité. Cette région serait alors à la croisée d'un ensemble de signaux paracrines et métaboliques et propices à l'acquisition d'un phénotype CCDD, plus plastique. En prenant en considération les effets de dilution et en se basant sur les travaux de l'équipée de Wicha, il est justifiable d'émettre l'hypothèse que le micro-environnement moins riche et plus hypoxique diminuerait la probabilité d'acquérir et de

maintenir un phénotype CCDD, notamment face à l'augmentation des ROS dus à l'hypoxie, poussant alors sur l'acquisition d'un phénotype plus différencié et prolifératif¹⁵². Cependant, comme je l'ai décrit dans l'introduction, l'hypoxie joue un rôle pro-oxydant, mais aussi pro-EMT. Cette dualité pourrait de façon stochastique induire chez les cellules l'acquisition d'un phénotype différencié ou à l'inverse pousser sur l'acquisition d'un phénotype CCDD. La population qui réacquiert une plus grande plasticité pourrait dans ces conditions d'hypoxie effectuer une transdifférenciation en cellule endothéliale afin de maintenir un pool nutritif conséquent. Pour soutenir cette hypothèse, une étude a pu décrire un mécanisme de transdifférenciation lors de l'analyse de tumeur mammaire après injection ectopique de cellules MCF7 marqué par un fluorophore (RFP)³¹³, montrant la création de nouveaux vaisseaux par les cellules cancéreuses elles-mêmes au niveau des régions hypoxiques. En lien avec nos travaux, il serait donc intéressant d'analyser la fluidité membranaire de ces cellules grâce au Dioll, afin d'observer si celles en cours de transdifférenciation auraient une fluidité membranaire plus importante que le bulk adjacent.

Alors que dans cette hypothèse, les cellules plastiques se situeraient en périphérie de la tumeur, la néovascularisation permettrait la création de nouvelles régions propice à l'acquisition d'un phénotype plastique. Après un temps de développement tumoral plus long, le réarrangement de l'environnement tumoral lors de la tumorigenèse pourrait ainsi changer la distribution des différentes populations, notamment au niveau de la périphérie. En effet, lors de nos travaux nous avons pu observer que lors d'une exposition prolongée aux facteurs pro-EMT (TGF β et OSM) les cellules métastables acquéraient un phénotype mésenchymateux aberrant. De la même manière, il serait possible qu'une exposition prolongée des cellules CCDD aux facteurs inducteurs du programme de l'EMT par le micro-environnement tumoral périsvasculaire permettrait aux cellules d'acquérir une identité plus mésenchymateuse des CCDD. Toujours par effet de diffusion des molécules, les cellules les plus différenciées et les plus éloignées du système sanguin permettraient de maintenir une prolifération de la tumeur *in situ*. Les CCDD hybrides quant à elles seraient à l'interface de ces deux régions, qui comporterait les concentrations optimales du cocktail hormono-nutritif propice à l'acquisition d'un phénotype plastique. Cette hypothèse est fortement soutenue par les travaux de l'équipe de C. Blanpain, qui ont pu discriminer un ensemble de populations ayant différents phénotypes répartis sur le continuum du processus de l'EMT, à partir d'un modèle murin où l'expression de K-RAS^{G12D} et la délétion de P53 au niveau des follicules pileux permettaient le développement spontané des tumeurs de la peau¹²⁸. Dans ce même modèle, les auteurs indiquent que la région où se situe les cellules à la plus forte identité mésenchymateuse se situe au plus proche des cellules endothéliales avec en arrière la région comportant principalement des cellules CCDD hybrides E/M. Dans un tel contexte de répartition cellulaire, les cellules mésenchymateuses joueraient un rôle de leader pour l'invasion tumorale *in situ*, permettant alors aux cellules CCDD hybrides les plus adaptables à un nouvel environnement d'entrer dans la circulation et coloniser d'autres tissus^{124,127,279}. En prenant en considération que nos travaux ont montré que la plasticité cellulaire était corrélée à la plasticité phénotypique, il serait intéressant d'effectuer des mesures de la fluidité membranaire sur des coupes de tumeurs, afin de discriminer différentes régions de plasticité, qui seraient corrélées à celles décrites par immunomarquages.

Création d'outils de mesures de la plasticité cellulaire par suivi de la fluidité membranaire :

Même s'il reste encore à comprendre de nombreux mécanismes permettant de lier la plasticité cellulaire et la fluidité membranaire, il est intéressant de se projeter et d'ouvrir des perspectives sur l'utilisation de la mesure de la fluidité membranaire par la sonde Dioll pour la création d'un index de plasticité. La première approche qui serait possible est de déterminer un scoring au niveau de coupes histologiques de biopsies tumorales ou par analyse FACS. L'une des variables qui pourraient alors impacter la fluidité membranaire est les différences de pression que peut exercer la matrice extracellulaire. Cependant, des analyses préliminaires sur des tumeurs mammaires spontanées par induction de MYC à la doxycycline au sein de l'équipe sont encourageantes. Nous avons pu lors de cette analyse discriminer un ensemble de populations cellulaires, avec une fluidité membranaire la plus importante pour les cellules positives aux marqueurs de plasticité classiques (CD29⁺, CD61⁺, CD24⁻). Néanmoins, une autre approche semble possible par analyse des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules dans les fluides biologiques. En effet par son intensité importante le Dioll à la capacité de discriminer des EV en cytométrie. De plus, des travaux préliminaires par mesure en spectrofluorimétrie au sein de l'équipe semblent montrer que les EV sécrétées par les cellules ont une fluidité dépendante des cellules mères. Ces observations sous-entendent alors que la mesure de la fluidité des EV permettrait de discriminer celles de cellules différenciées de ceux de cellules ayant subi un processus de dédifférenciation. L'avantage de créer un outil basé sur les EV est sa facilité et le confort du prélèvement quasi non invasif (prélèvement sanguin, collecte d'urine ou encore de salive en fonction de l'origine de la tumeur). La limite qu'il pourrait y avoir avec cette approche est le pouvoir discriminatoire des EV d'origines cancéreuses face à l'ensemble des EV de l'organisme entier. Il est cependant possible d'imaginer des protocoles pour surmonter ces limites. La première serait une prépurification des EV spécifique des cellules cancéreuses avec un marqueur membranaire, suivie de la mesure de leur fluidité membranaire afin de discriminer les EV les plus fluides originaires des cellules les plus plastiques. La seconde idée, la plus difficile d'un point de vue clinique, se base sur l'absence de toxicité du Dioll. Il serait intéressant de transporter le Dioll par un vecteur spécifique des cellules cancéreuses. L'intégration du Dioll dans les cellules cancéreuses permettrait alors le marquage EV lors de leur biogenèse. Il sera alors possible de directement effectuer la mesure de la fluidité membranaire. Enfin, une autre possibilité serait à la croisée des deux autres possibilités, vectoriser un fluorochrome spécifique à la formation des EV qui permettrait une purification facilitée avant le marquage au Dioll et la mesure de la fluidité membranaire. Afin d'augmenter la résolution de la mesure de la fluidité membranaire à partir de cytomètre spectral, la mise au point d'analyse multiparamétrique de la fluidité membranaire est en cours au sein de l'équipe, ce qui permettrait une meilleure discrimination des vésicules, mais aussi des cellules. Le principe est d'effectuer d'une analyse en composantes principales sur un ensemble de liposomes correspondant à une gamme de fluidité membranaire. En intégrant les valeurs de la signature spectrale de nos échantillons avec ceux des liposomes, il sera alors possible de discriminer des variations de fluidité membranaire plus faible. Avec l'augmentation de la résolution de notre mesure de la fluidité membranaire, l'ensemble de ces approches aurait alors pour but d'effectuer des mesures précises afin d'aider les cliniciens sur l'orientation de la stratégie thérapeutique notamment grâce à la création d'un scoring de plasticité. Dans un second temps, la détection de

d'EV cancéreuses permettrait d'adapter le suivie thérapeutique. Soit pour une surveillance accrue soit pour éviter un sur traitement qui à l'heure actuelle exerce des effets secondaires lourds sur des patients dont la probabilité de rechute est faible.

CONCLUSION

La création du Dioll a permis d'obtenir un outil de mesure des membranes cellulaires robuste. Par sa meilleure résolution de la discrimination des régions rigides et fluides et par son incapacité à marquer les lipides non membranaires, cette sonde semble tout à fait en adéquation pour son utilisation comme outil de diagnostic.

Lors de cette thèse, nous avons utilisé le Dioll pour déterminer le lien entre la modulation de la fluidité membranaire et celle de la plasticité cellulaire. Nous avons à partir de différentes lignées cancéreuses mammaires pu constater que la fluidité était corrélée à la classification génétique classique Luminal, Basal-like et Claudin-low. Les lignées Basal-like possèdent une fluidité membranaire la plus importante probablement due à leur phénotype plus indifférencié en comparaison des lignées Luminal. Étonnamment les Claudin-low sont quant à eux les plus rigides pouvant décrire l'acquisition d'une identité mésenchymateuses aberrante dans nos conditions. Dans un second temps nous avons utilisé un modèle isogénique de la modulation de l'identité cellulaire épithéliale des cellules HMEC. L'induction de l'EMT-TF ZEB1 induit un programme de l'EMT au sein des cellules HMEC entraînant alors la perte de leur l'identité cellulaire. Nous avons alors constaté une augmentation de la fluidité membranaire lors de l'acquisition d'un phénotype plus indifférencié. Enfin sur la base de ce modèle et par modulation de l'environnement hormono-nutritif, nous avons pu développer un protocole permettant l'acquisition d'un phénotype métastable aux caractéristiques proches des cellules cancéreuses dynamiquement différenciées que l'on retrouve dans un contexte tumoral. Ces cellules métastables par leur caractère multipotent permettent de les différenciées, à l'heure actuelle, en cellules progénitrices luminaire ou myoépithéliale. À partir de ce modèle, l'analyse par spectrofluorimétrie des cellules montre que la fluidité membranaire est corrélée à la modulation de l'identité cellulaire. Marquant un début de réponse sur l'existence d'un lien entre plasticité et fluidité membranaire, ce dernier pouvant alors servir comme paramètre décrivant un continuum mesurable et quantifiable.

Ces observations ouvrent alors sur des approches et des perspectives mécanistiques et technologiques nouvelles ou encore peu explorées. À l'heure actuelle, une grande partie de la recherche de traitements basés sur la modulation du métabolisme lipidique des cellules CCDD se base sur l'activation de mécanisme de mort cellulaire notamment par induction de la ferroptose. Cependant, il serait intéressant de comprendre les mécanismes en amont permettant la modulation lipidique et la fluidification de la membrane. Comprendre ces modulations permettra alors le développement de molécules permettant une rigidification délétère à l'acquisition d'un phénotype plastique. Enfin, un développement de technologies serait intéressant pour la création d'outil d'aide au diagnostic et à la mise au point d'une stratégie thérapeutique. Deux approches sont alors possibles, celle des biopsies solides ou celle liquide avec l'analyse des vésicules extracellulaires.

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. GM, S., S, Q. & P, S. Cancer: the dark side of wound healing. *FEBS J.* **285**, 4516–4534 (2018).
3. SN, R. & AS, R. Human lung cancer and p53: the interplay between mutagenesis and selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12244–12249 (2000).
4. Werner, B. & Sottoriva, A. Variation of mutational burden in healthy human tissues suggests non-random strand segregation and allows measuring somatic mutation rates. *PLOS Comput. Biol.* **14**, e1006233 (2018).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. Anderson, M. W., Reynolds, S. H., You, M. & Maronpot, R. M. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **98**, 13 (1992).
7. RL, D., DE, W. & WJ, M. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* **26**, 1338–1345 (2007).
8. DJ, L. & RB, D. c-Myc in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **7**, 143–164 (2000).
9. Lee, E. Y. H. P. & Muller, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, (2010).
10. MS, C., MD, E., M, D. & J, L. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**, 1195–1214 (2003).
11. EI, P., MI, A., P, A.-P., M, O. & P, H. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. *Curr. Opin. Oncol.* **22**, 64–69 (2010).
12. Liu, X. ling, Ding, J. & Meng, L. hua. *Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer*. vol. 39 1553–1558 (Nature Publishing Group, 2018).
13. Giam, M., Huang, D. C. S. & Bouillet, P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* vol. 27 S128–S136 (2008).
14. Knudson, A. G. & Jr. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 820 (1971).
15. Bouaoun, L. *et al.* TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum. Mutat.* **37**, 865–876 (2016).
16. Hainaut, P. & Hollstein, M. p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. *Adv. Cancer Res.* **77**, 81–86 (1999).
17. Oliner, J. D., Saiki, A. Y. & Caenepeel, S. The role of MDM2 amplification and overexpression in tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 129–133 (2016).
18. Esteller, M. *et al.* Hypermethylation-associated Inactivation of p14ARF Is Independent of p16INK4a Methylation and p53 Mutational Status. *Cancer Res.* **60**, (2000).
19. Morel, A. P. *et al.* A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability. *Nat. Med.* **23**, 568–578 (2017).

20. Watson, C. J. & Khaled, W. T. Mammary development in the embryo and adult: A journey of morphogenesis and commitment. *Development* vol. 135 995–1003 (2008).
21. JE, V. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* **23**, 2563–2577 (2009).
22. Wuidart, A. *et al.* Early lineage segregation of multipotent embryonic mammary gland progenitors. *Nat. Cell Biol.* 2018 206 **20**, 666–676 (2018).
23. Centonze, A. *et al.* Heterotypic cell–cell communication regulates glandular stem cell multipotency. *Nat.* 2020 5847822 **584**, 608–613 (2020).
24. Lee, E., Piranlioglu, R., Wicha, M. S. & Korkaya, H. Plasticity and Potency of Mammary Stem Cell Subsets During Mammary Gland Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 2357 **20**, 2357 (2019).
25. Sørliie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
26. Bernard, P. S. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
27. Lim, E. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* **15**, 907–913 (2009).
28. Liu, S. *et al.* BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1680–1685 (2008).
29. Proia, T. A. *et al.* Genetic Predisposition Directs Breast Cancer Phenotype by Dictating Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell* **8**, 149–163 (2011).
30. Van Keymeulen, A. *et al.* Reactivation of multipotency by oncogenic PIK3CA induces breast tumour heterogeneity. **525**, 119–123 (2015).
31. Weigelt, B. *et al.* Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: A retrospective analysis. *Lancet Oncol.* **11**, 339–349 (2010).
32. Hennessy, B. T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* **69**, 4116–4124 (2009).
33. Sabatier, R. *et al.* Claudin-low breast cancers: Clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol. Cancer* **13**, 1–14 (2014).
34. Prat, A. & Perou, C. M. Mammary development meets cancer genomics. *Nat. Med.* 2009 158 **15**, 842–844 (2009).
35. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* vol. 87 159–170 (1996).
36. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (80-.).* **194**, 23–28 (1976).
37. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).
38. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. *Stem cells, cancer, and*

cancer stem cells. vol. 414 105–111 (Nature Publishing Group, 2001).

39. Naor, D., Sionov, R. V. & Ish-Shalom, D. CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research* vol. 71 241–319 (1997).
40. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3983–3988 (2003).
41. Ginestier, C. *et al.* ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–567 (2007).
42. Li, X. *et al.* Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 672–679 (2008).
43. Lee, H. E. *et al.* An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer* **104**, 1730–1738 (2011).
44. Honeth, G. *et al.* The CD44+/CD24-phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* **10**, 1–12 (2008).
45. Park, S. Y. *et al.* Heterogeneity for Stem Cell-Related Markers According to Tumor Subtype and Histologic Stage in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 876–887 (2010).
46. Shipitsin, M. *et al.* Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer Cell* **11**, 259–273 (2007).
47. AJ, C., AP, F., VI, A., S, B. & RJ, B. An evolving paradigm of cancer stem cell hierarchies: therapeutic implications. *Theranostics* **10**, 3083–3098 (2020).
48. Halaoui, R. *et al.* Progressive polarity loss and luminal collapse disrupt tissue organization in carcinoma. *Genes Dev.* **31**, 1573–1587 (2017).
49. Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 12 23–38 (2012).
50. Ge, Y. *et al.* Stem Cell Lineage Infidelity Drives Wound Repair and Cancer. *Cell* **169**, 636-650.e14 (2017).
51. Van Keymeulen, A. *et al.* Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* **479**, 189–193 (2011).
52. Giraddi, R. R. *et al.* Single-Cell Transcriptomes Distinguish Stem Cell State Changes and Lineage Specification Programs in Early Mammary Gland Development. *Cell Rep.* **24**, 1653-1666.e7 (2018).
53. Herfs, M., Hubert, P. & Delvenne, P. Epithelial metaplasia: adult stem cell reprogramming and (pre)neoplastic transformation mediated by inflammation? *Trends Mol. Med.* **15**, 245–253 (2009).
54. Raj, A. & van Oudenaarden, A. Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell* vol. 135 216–226 (2008).
55. Chung, C. Y. *et al.* Single-Cell Chromatin Analysis of Mammary Gland Development Reveals Cell-State Transcriptional Regulators and Lineage Relationships. *Cell Rep.* **29**,

- 495-510.e6 (2019).
56. Larsson, A. J. M. *et al.* Genomic encoding of transcriptional burst kinetics. *Nat.* 2019 5657738 **565**, 251–254 (2019).
 57. Spike, B. T. *et al.* A Mammary Stem Cell Population Identified and Characterized in Late Embryogenesis Reveals Similarities to Human Breast Cancer. *Cell Stem Cell* **10**, 183–197 (2012).
 58. Tam, W. L. & Weinberg, R. A. *The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer.* vol. 19 1438–1449 (2013).
 59. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. Emt: 2016. *Cell* vol. 166 21–45 (2016).
 60. Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N. & Berx, G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics* vol. 33 943–959 (2017).
 61. Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J. H. & Raman, V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 235–241 (2008).
 62. Battle, E. *et al.* The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 84–89 (2000).
 63. W, L. & Y, K. Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis. *Trends in cancer* **2**, 65–67 (2016).
 64. Chaffer, C. L. *et al.* XPoised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* **154**, 61 (2013).
 65. Morel, A. P. *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**, e2888 (2008).
 66. Mani, S. A. *et al.* The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
 67. Lehmann, W. *et al.* ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
 68. Hay, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anatomica* vol. 154 8–20 (1995).
 69. Kalluri, R. & Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1776–1784 (2003).
 70. Rastaldi, M. P. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* **62**, 137–146 (2002).
 71. Botaille, F. *et al.* Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1514–1527 (2008).
 72. Strutz, F. *et al.* Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* **61**, 1714–1728 (2002).
 73. Peng, C.-Y. *et al.* Positive Feedback Loop of SNAIL-IL-6 Mediates Myofibroblastic

- Differentiation Activity in Precancerous Oral Submucous Fibrosis. *Cancers 2020, Vol. 12, Page 1611* **12**, 1611 (2020).
74. Miyoshi, H., Ajima, R., Luo, C. T., Yamaguchi, T. P. & Stappenbeck, T. S. Wnt5a potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science (80-.)*. **338**, 108–113 (2012).
 75. Le, H. *et al.* Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 768–773 (2008).
 76. Shi, Y. *et al.* Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, (2015).
 77. Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* vol. 141 39–51 (2010).
 78. Sangaletti, S. *et al.* Mesenchymal Transition of High-Grade Breast Carcinomas Depends on Extracellular Matrix Control of Myeloid Suppressor Cell Activity. *Cell Rep.* **17**, 233–248 (2016).
 79. Deckers, M. *et al.* The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor β -induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 2202–2209 (2006).
 80. B, D. & JS, S. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **21**, (2016).
 81. Morita, T., Mayanagi, T. & Sobue, K. Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial-mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J. Cell Biol.* **179**, 1027–1042 (2007).
 82. Shirakihara, T., Saitoh, M. & Miyazono, K. Differential Regulation of Epithelial and Mesenchymal Markers by δ EF1 Proteins in Epithelial–Mesenchymal Transition Induced by TGF- β . <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0249> **18**, 3533–3544 (2007).
 83. Kang, Y., Chen, C. R. & Massagué, J. A self-enabling TGF β response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* **11**, 915–926 (2003).
 84. Dhasarathy, A., Phadke, D., Mav, D., Shah, R. R. & Wade, P. A. The transcription factors snail and slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer. *PLoS One* **6**, e26514 (2011).
 85. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* vol. 425 577–584 (2003).
 86. Gregory, P. A. *et al.* An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-02-0103> **22**, 1686–1698 (2011).
 87. Willis, B. C. & Borok, Z. TGF- β -induced EMT: Mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* vol. 293 (2007).
 88. Kojima, Y. *et al.* Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20009–20014 (2010).

89. Olumi, A. *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts stimulate tumor progression of initiated human epithelium. *Breast Cancer Res.* **2**, 1–1 (2000).
90. Yu, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br. J. Cancer* **110**, 724–732 (2014).
91. Zhan, T., Rindtorff, N. & Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* vol. 36 1461–1473 (2017).
92. Clevers, H. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* vol. 127 469–480 (2006).
93. Wu, Y. *et al.* Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **10**, 1597–1606 (2012).
94. Sánchez-Tilló, E. *et al.* ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* **29**, 3490–3500 (2010).
95. Yook, J. I. *et al.* A Wnt–Axin2–GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 2006 812 **8**, 1398–1406 (2006).
96. Stemmer, V., De Craene, B., Berx, G. & Behrens, J. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with β -catenin. **27**, 5075–5080 (2008).
97. Bafico, A. *et al.* Interaction of Frizzled Related Protein (FRP) with Wnt Ligands and the Frizzled Receptor Suggests Alternative Mechanisms for FRP Inhibition of Wnt Signaling *. *J. Biol. Chem.* **274**, 16180–16187 (1999).
98. Gauger, K. J., Chenausky, K. L., Murray, M. E. & Schneider, S. S. SFRP1 reduction results in an increased sensitivity to TGF- β signaling. *BMC Cancer* 2011 111 **11**, 1–10 (2011).
99. Bhowmick, N. A. *et al.* Transforming growth factor- β 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **12**, 27–36 (2001).
100. Ozdamar, B. *et al.* Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* (80-.). **307**, 1603–1609 (2005).
101. Bray, S. J. Notch signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 17 722–735 (2016).
102. Timmerman, L. A. *et al.* Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* **18**, 99–115 (2004).
103. Natsuzaka, M. *et al.* Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* **8**, 1–16 (2017).
104. Saad, S., Stanners, S. R., Yong, R., Tang, O. & Pollock, C. A. Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1115–1122 (2010).
105. Leong, K. G. *et al.* Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J. Exp. Med.* **204**, 2935–2948 (2007).

106. Blokzijl, A. *et al.* Cross-talk between the Notch and TGF- β signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J. Cell Biol.* **163**, 723–728 (2003).
107. Morrissey, J. *et al.* Transforming Growth Factor- β Induces Renal Epithelial Jagged-1 Expression in Fibrotic Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 1499–1508 (2002).
108. Li, X. *et al.* Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* **25**, 609–621 (2006).
109. Dennler, S. *et al.* Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor- β : Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **67**, 6981–6986 (2007).
110. Sullivan, N. J. *et al.* Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* **28**, 2940–2947 (2009).
111. Junk, D. J. *et al.* Oncostatin M promotes cancer cell plasticity through cooperative STAT3-SMAD3 signaling. *Oncogene* **36**, 4001–4013 (2017).
112. Cohen, E. N. *et al.* Inflammation mediated metastasis: Immune induced epithelial-to-mesenchymal transition in inflammatory breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0132710 (2015).
113. Meng, F. *et al.* CCL18 promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration of pancreatic cancer cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* **46**, 1109–1120 (2015).
114. Tam, S. Y., Wu, V. W. C. & Law, H. K. W. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. *Front. Oncol.* **0**, 486 (2020).
115. Yang, M.-H. H. *et al.* Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. **10**, 295–305 (2008).
116. Zhang, W. *et al.* HIF-1 α promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through direct regulation of ZEB1 in colorectal cancer. *PLoS One* **10**, e0129603 (2015).
117. Wu, M. Z. *et al.* Interplay between HDAC3 and WDR5 Is Essential for Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell* **43**, 811–822 (2011).
118. Chen, J., Imanaka, N., Chen, J. & Griffin, J. D. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* **102**, 351–360 (2010).
119. Copple, B. L. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor- β -dependent mechanisms. *Liver Int.* **30**, 669–682 (2010).
120. Lei, J. *et al.* Hedgehog signaling regulates hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition and invasion in pancreatic cancer cells via a ligand-independent manner. *Mol. Cancer* **12**, 1–11 (2013).
121. Derynck, R. & Weinberg, R. A. EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Developmental Cell* vol. 49 313–316 (2019).
122. Guo, W. *et al.* Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state.

- Cell* **148**, 1015–1028 (2012).
123. Krebs, A. M. *et al.* The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat. Cell Biol.* **19**, 518–529 (2017).
 124. Rhim, A. D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* **148**, 349–361 (2012).
 125. Bronsert, P. *et al.* Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer–host interface. *J. Pathol.* **234**, 410–422 (2014).
 126. Puram, S. V. *et al.* Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell* **171**, 1611–1624.e24 (2017).
 127. Yu, M. *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science (80-.)*. **339**, 580–584 (2013).
 128. Pastushenko, I. *et al.* Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* **556**, 463–468 (2018).
 129. Kröger, C. *et al.* Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 7353–7362 (2019).
 130. CL, C. *et al.* Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* **154**, 61 (2013).
 131. Morel, A. P. *et al.* EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.* **8**, e1002723 (2012).
 132. Ni, T. *et al.* Snail1-dependent p53 repression regulates expansion and activity of tumour-initiating cells in breast cancer. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1221–1232 (2016).
 133. Jiang, H. *et al.* Jagged1-Notch1-deployed tumor perivascular niche promotes breast cancer stem cell phenotype through Zeb1. *Nat. Commun.* **11**, 1–16 (2020).
 134. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science (80-.)*. **123**, 309–314 (1956).
 135. Folmes, C. D. L. *et al.* Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* **14**, 264–271 (2011).
 136. DeBerardinis, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 19345–19350 (2007).
 137. Monti, S. *et al.* Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* **105**, 1851–1861 (2005).
 138. Tan, A. S. *et al.* Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.* **21**, 81–94 (2015).
 139. Horwitz, H. B. & Holt, C. E. SPECIFIC INHIBITION BY ETHIDIUM BROMIDE OF MITOCHONDRIAL DNA SYNTHESIS IN PHYSARUM POLYCEPHALUM. *J. Cell Biol.* **49**, 546–553 (1971).

140. Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J. & Prockop, D. J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1283–1288 (2006).
141. Ciavardelli, D. *et al.* Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death Dis.* **5**, e1336–e1336 (2014).
142. Denicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–110 (2011).
143. Zhou, Y. *et al.* Metabolic Alterations in Highly Tumorigenic Glioblastoma Cells: PREFERENCE FOR HYPOXIA AND HIGH DEPENDENCY ON GLYCOLYSIS *. *J. Biol. Chem.* **286**, 32843–32853 (2011).
144. LeBleu, V. S. *et al.* PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* **16**, 992–1003 (2014).
145. Vazquez, F. *et al.* PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* **23**, 287–301 (2013).
146. Dupuy, F. *et al.* PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab.* **22**, 577–589 (2015).
147. Muller, F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. *J. Am. Aging Assoc.* **23**, 227 (2000).
148. Liu, Y. *et al.* Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ.* **16**, 847–857 (2009).
149. Itoh, K. *et al.* An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313–322 (1997).
150. Taguchi, K., Motohashi, H. & Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* vol. 16 123–140 (2011).
151. Liu, S. *et al.* Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* **2**, 78–91 (2014).
152. Luo, M. *et al.* Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling. *Cell Metab.* **28**, 69–86.e6 (2018).
153. Chandel, N. S. *et al.* Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* **275**, 25130–25138 (2000).
154. Conley, S. J. *et al.* Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 2784–2789 (2012).
155. Kim, N. H. *et al.* Snail reprograms glucose metabolism by repressing phosphofructokinase PFKP allowing cancer cell survival under metabolic stress. *Nat. Commun.* **8**, 1–12 (2017).
156. Klose, R. J., Kallin, E. M. & Zhang, Y. JmjC-domain-containing proteins and histone

- demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 715–727 (2006).
157. Carey, B. W., Finley, L. W. S., Cross, J. R., Allis, C. D. & Thompson, C. B. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nat.* *2014 5187539* **518**, 413–416 (2014).
 158. Moussaieff, A. *et al.* Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Metab.* **21**, 392–402 (2015).
 159. M, S. & RA, S. Epigenetic Signatures and Plasticity of Intestinal and Other Stem Cells. *Annu. Rev. Physiol.* **83**, 405–427 (2021).
 160. A, N. *et al.* Lipidomics of human brain aging and Alzheimer’s disease pathology. *Int. Rev. Neurobiol.* **122**, 133–189 (2015).
 161. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P. & Jacobsson, A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research* vol. 49 186–199 (2010).
 162. Schrader, M., Costello, J., Godinho, L. F. & Islinger, M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* vol. 38 681–702 (2015).
 163. Coleman, R. A. & Lee, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research* vol. 43 134–176 (2004).
 164. Kolczynska, K., Loza-Valdes, A., Hawro, I. & Sumara, G. Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: a review. *Lipids Heal. Dis.* *2020 191* **19**, 1–15 (2020).
 165. Ren, M., Phoon, C. K. L. & Schlame, M. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* **55**, 1–16 (2014).
 166. Hishikawa, D. *et al.* Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2830–2835 (2008).
 167. Yamashita, A. *et al.* Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Progress in Lipid Research* vol. 53 18–81 (2014).
 168. M, H., K, H. & P, S. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* **50**, 240–257 (2011).
 169. Grösch, S., Schiffmann, S. & Geisslinger, G. Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research* vol. 51 50–62 (2012).
 170. Kumari, A. Cholesterol Synthesis. *Sweet Biochem.* 27–31 (2018) doi:10.1016/B978-0-12-814453-4.00007-8.
 171. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (80-.)*. **175**, 720–731 (1972).
 172. Van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 112–124 (2008).
 173. Zwaal, R. F. A. & Schroit, A. J. Pathophysiologic Implications of Membrane

- Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* **89**, 1121–1132 (1997).
174. Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, (1992).
 175. Sud, M. *et al.* LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res.* **35**, D527–D532 (2007).
 176. Brown, D. A. & Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533–544 (1992).
 177. MJ, S., M, H. & R, Š. Interleaflet Coupling of Lipid Nanodomains - Insights From in vitro Systems. *Front. cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
 178. Stein, W. D. & Litman, T. Structural Basis of Movement Across Cell Membranes. *Channels, Carriers, and Pumps* 1–36 (2015) doi:10.1016/B978-0-12-416579-3.00001-0.
 179. Mesmin, B. & Maxfield, F. R. Intracellular Sterol Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 636 (2009).
 180. Eeman, M. & Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. <https://popups.uliege.be/1780-4507> **14**, 719–736 (2010).
 181. Harayama, T. & Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018 195 **19**, 281–296 (2018).
 182. Menendez, J. A. & Lupu, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* vol. 7 763–777 (2007).
 183. Zaidi, N., Swinnen, J. V. & Smans, K. ATP-citrate lyase: A key player in cancer metabolism. *Cancer Research* vol. 72 3709–3714 (2012).
 184. Cruz, P. M., Mo, H., McConathy, W., Sabnis, N. A. & Lacko, A. G. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Front. Pharmacol.* **0**, 119 (2013).
 185. Reilly, P. T. & Mak, T. W. Molecular pathways: Tumor cells Co-opt the brain-specific metabolism gene CPT1C to promote survival. *Clin. Cancer Res.* **18**, 5850–5855 (2012).
 186. Zaugg, K. *et al.* Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev.* **25**, 1041–1051 (2011).
 187. Samudio, I. *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* **120**, 142–156 (2010).
 188. Madden, E., Logue, S. E., Healy, S. J., Manie, S. & Samali, A. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biol. Cell* **111**, 1–17 (2019).
 189. Peck, B. & Schulze, A. Lipid desaturation – the next step in targeting lipogenesis in cancer? *FEBS J.* **283**, 2767–2778 (2016).

190. Borradaile, N. M. *et al.* Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J. Lipid Res.* **47**, 2726–2737 (2006).
191. Ariyama, H., Kono, N., Matsuda, S., Inoue, T. & Arai, H. Decrease in Membrane Phospholipid Unsaturation Induces Unfolded Protein Response. *J. Biol. Chem.* **285**, 22027–22035 (2010).
192. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 132 **13**, 89–102 (2012).
193. Kitai, Y. *et al.* Membrane lipid saturation activates IRE1 α without inducing clustering. *Genes to Cells* **18**, 798–809 (2013).
194. Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H.-R. & Chae, H.-J. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, Vol. 17, Page 327 **17**, 327 (2016).
195. Rong, X. *et al.* LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metab.* **18**, 685–697 (2013).
196. Vriens, K. *et al.* Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity. *Nature* **566**, 403–406 (2019).
197. Park, H. G. *et al.* Palmitic acid (16:0) competes with omega-6 linoleic and omega-3 α -linolenic acids for FADS2 mediated Δ 6-desaturation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 91–97 (2016).
198. Cimino, J. *et al.* Towards lipidomics of low-abundant species for exploring tumor heterogeneity guided by high-resolution mass spectrometry imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 24560–24580 (2013).
199. Gimple, R. C. *et al.* Glioma Stem Cell-Specific Superenhancer Promotes Polyunsaturated Fatty-Acid Synthesis to Support EGFR Signaling. *Cancer Discov.* **9**, 1248–1267 (2019).
200. Endres, N. F. *et al.* Conformational Coupling across the Plasma Membrane in Activation of the EGF Receptor. *Cell* **152**, 543–556 (2013).
201. Roepstorff, K., Thomsen, P., Sandvig, K. & Deurs, B. van. Sequestration of Epidermal Growth Factor Receptors in Non-caveolar Lipid Rafts Inhibits Ligand Binding *. *J. Biol. Chem.* **277**, 18954–18960 (2002).
202. Pike, L. J. & Casey, L. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* **41**, 10315–10322 (2002).
203. Ginestier, C. *et al.* Mevalonate metabolism regulates basal breast cancer stem cells and is a potential therapeutic target. *Stem Cells* **30**, 1327–1337 (2012).
204. Sorrentino, G. *et al.* Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat. Cell Biol.* **16**, 357–366 (2014).
205. Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell* vol. 19 491–505 (2010).
206. Cordenonsi, M. *et al.* The hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **147**, 759–772 (2011).
207. Zhao, Z. *et al.* CtBP promotes metastasis of breast cancer through repressing

- cholesterol and activating TGF- β signaling. *Oncogene* **38**, 2076–2091 (2019).
208. Chen, Y. G. Endocytic regulation of TGF- β signaling. *Cell Research* vol. 19 58–70 (2009).
 209. Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125–1131 (2002).
 210. Mahammad, S. & Parmryd, I. Cholesterol Depletion Using Methyl- β -cyclodextrin. *Methods Mol. Biol.* **1232**, 91–102 (2015).
 211. Zeisig, R., Koklič, T., Wiesner, B., Fichtner, I. & Sentjurč, M. Increase in fluidity in the membrane of MT3 breast cancer cells correlates with enhanced cell adhesion in vitro and increased lung metastasis in NOD/SCID mice. *Arch. Biochem. Biophys.* **459**, 98–106 (2007).
 212. Nelson, E. R. *et al.* 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science (80-.)*. **342**, 1094–1098 (2013).
 213. Zhao, W. *et al.* Candidate antimetastasis drugs suppress the metastatic capacity of breast cancer cells by reducing membrane fluidity. *Cancer Res.* **76**, 2037–2049 (2016).
 214. Donatello, S. *et al.* Lipid Raft Association Restricts CD44-Ezrin Interaction and Promotion of Breast Cancer Cell Migration. *Am. J. Pathol.* **181**, 2172–2187 (2012).
 215. Babina, I. S., McSherry, E. A., Donatello, S., Hill, A. D. & Hopkins, A. M. A novel mechanism of regulating breast cancer cell migration via palmitoylation-dependent alterations in the lipid raft affiliation of CD44. *Breast Cancer Res. 2014 161* **16**, 1–14 (2014).
 216. Thankamony, S. P. & Knudson, W. Acylation of CD44 and Its Association with Lipid Rafts Are Required for Receptor and Hyaluronan Endocytosis *. *J. Biol. Chem.* **281**, 34601–34609 (2006).
 217. Müller, S. *et al.* CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *Nat. Chem. 2020 1210* **12**, 929–938 (2020).
 218. Doll, S. *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat. Chem. Biol. 2016 131* **13**, 91–98 (2016).
 219. J, C. *et al.* ACSL4 promotes hepatocellular carcinoma progression via c-Myc stability mediated by ERK/FBW7/c-Myc axis. *Oncogenesis* **9**, (2020).
 220. Lee, J., You, J. H., Kim, M. S. & Roh, J. L. Epigenetic reprogramming of epithelial-mesenchymal transition promotes ferroptosis of head and neck cancer. *Redox Biol.* **37**, 101697 (2020).
 221. Lee, J. Y. *et al.* Polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway determines ferroptosis sensitivity in gastric cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 32433–32442 (2020).
 222. X, W. *et al.* ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. *Oncotarget* **6**, 44849–44863 (2015).
 223. Kagan, V. E. *et al.* Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 81–90 (2017).

224. Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D. & Evans, E. A. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339 (2000).
225. Manni, M. M. *et al.* Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage. *Elife* **7**, (2018).
226. Pinot, M. *et al.* Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science (80-.)*. **345**, 693–697 (2014).
227. Wassall, S. R. & Stillwell, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: Domain formation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1788 24–32 (2009).
228. Yanes, O. *et al.* Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 411–417 (2010).
229. Yang, W. S. *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317–331 (2014).
230. K, B. *et al.* The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature* **575**, 688–692 (2019).
231. Doll, S. *et al.* FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* **575**, 693–698 (2019).
232. Soula, M. *et al.* Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 1351–1360 (2020).
233. Zheng, J. & Conrad, M. The Metabolic Underpinnings of Ferroptosis. *Cell Metab.* **32**, 920–937 (2020).
234. Sahu, I. D. & Lorigan, G. A. Electron paramagnetic resonance as a tool for studying membrane proteins. *Biomolecules* vol. 10 763 (2020).
235. Sok, M., Šentjurc, M. & Schara, M. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett.* **139**, 215–220 (1999).
236. Connell, S. D. & Smith, D. A. The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes (review). *Molecular Membrane Biology* vol. 23 17–28 (2006).
237. Thomas, G., Burnham, N. A., Camesano, T. A. & Wen, Q. Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *J. Vis. Exp.* e50497 (2013) doi:10.3791/50497.
238. Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L. & Webb, W. W. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys. J.* **16**, 1315–1329 (1976).
239. Schwille, P., Korlach, J. & Webb, W. W. Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry* **36**, 176–182 (1999).
240. Schütz, G. J., Schindler, H. & Schmidt, T. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys. J.* **73**, 1073–1080 (1997).

241. J, Z. *et al.* Multi-scale mechanical characterization of prostate cancer cell lines: Relevant biological markers to evaluate the cell metastatic potential. *Biochim. Biophys. acta. Gen. Subj.* **1861**, 3109–3119 (2017).
242. Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D. & Evans, E. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 321–327 (2000).
243. Owen, D. M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A. & Gaus, K. Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat. Protoc.* **7**, 24–35 (2012).
244. Bagatolli, L. A. Monitoring membrane hydration with 2-(Dimethylamino)-6-acylnaphthalenes fluorescent probes. *Subcell. Biochem.* **71**, 105–125 (2015).
245. Parasassi, T., De Stasio, G., d’Ubaldo, A. & Gratton, E. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **57**, 1179–1186 (1990).
246. Gunther, G., Malacrida, L., Jameson, D. M., Gratton, E. & Sánchez, S. A. LAURDAN since Weber: The Quest for Visualizing Membrane Heterogeneity. *Acc. Chem. Res.* **54**, 976–987 (2021).
247. Jay, A. G. & Hamilton, J. A. Disorder Amidst Membrane Order: Standardizing Laurdan Generalized Polarization and Membrane Fluidity Terms. *J. Fluoresc. 2016 271* **27**, 243–249 (2016).
248. Sanchez, S. A., Tricerri, M. A., Gunther, G. & Gratton, E. Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope.
249. Bagatolli, L. A. & Gratton, E. Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **77**, 2090–2101 (1999).
250. Bagatolli, L. A. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1541–1556 (2006).
251. Gaus, K. *et al.* Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15554–15559 (2003).
252. Maulucci, G. *et al.* Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications. *Free Radic. Res.* **50**, S40–S50 (2016).
253. So, P. T. C., Dong, C. Y., Masters, B. R. & Berland, K. M. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 399–429 (2000).
254. Kim, H. M. *et al.* A two-photon fluorescent probe for lipid raft imaging: C-laurdan. *ChemBioChem* **8**, (2007).
255. Levental, K. R. *et al.* Lipidomic and biophysical homeostasis of mammalian membranes counteracts dietary lipid perturbations to maintain cellular fitness. *Nat. Commun.* **11**, 1–13 (2020).
256. Navarro-Lérida, I. *et al.* Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion. *Dev. Cell* **32**, 318–334 (2015).
257. Friedl, P., Wolf, K. & Lammerding, J. Nuclear mechanics during cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 23 55–64 (2011).

258. Pajerowski, J. D., Dahl, K. N., Zhong, F. L., Sammak, P. J. & Discher, D. E. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15619–15624 (2007).
259. Melcer, S. *et al.* Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation. *Nat. Commun.* **2012 31 3**, 1–12 (2012).
260. Cheniour, M., Gueyrard, D., Goekjian, P. G., Granjon, T. & Marcillat, O. A convenient and versatile synthesis of Laurdan-like fluorescent membrane probes: Characterization of their fluorescence properties. *RSC Adv.* **6**, 5547–5557 (2016).
261. T, Y. *et al.* Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Sci. Signal.* **12**, (2019).
262. CA, O. *et al.* An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**, 197–203 (2011).
263. EA, S. *et al.* The role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of cells with the molecular and functional characteristics of cancer stem-like cells. *BMC Biol.* **14**, (2016).
264. JY, C. *et al.* Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* **16**, (2014).
265. Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M. & Gratton, E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* (1991) doi:10.1016/S0006-3495(91)82041-0.
266. Volmer, R., Van Der Ploeg, K. & Ron, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 4628–4633 (2013).
267. Xu, J., Meng, X., Wu, F., Deng, H. & Fu, S. ER stress drives ER-to-Golgi trafficking of ATF6 by blocking its membrane insertion. *bioRxiv* 822965 (2019) doi:10.1101/822965.
268. Covino, R. *et al.* A Eukaryotic Sensor for Membrane Lipid Saturation. *Mol. Cell* **63**, 49–59 (2016).
269. Halbleib, K. *et al.* Activation of the Unfolded Protein Response by Lipid Bilayer Stress. *Mol. Cell* **67**, 673-684.e8 (2017).
270. J, D. *et al.* Alterations of a Cellular Cholesterol Metabolism Network Are a Molecular Feature of Obesity-Related Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Diabetes* **64**, 3464–3474 (2015).
271. AT, C. *et al.* An integrative multiomic network model links lipid metabolism to glucose regulation in coronary artery disease. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
272. Ménégaut, L., Jalil, A., Thomas, C. & Masson, D. Macrophage fatty acid metabolism and atherosclerosis: The rise of PUFAs. *Atherosclerosis* **291**, 52–61 (2019).
273. Hartmann, T., Kuchenbecker, J. & Grimm, M. O. W. Alzheimer's disease: the lipid connection. *J. Neurochem.* **103**, 159–170 (2007).
274. Q, Y. & X, C. Hydroxyurea-induced membrane fluidity decreasing as a

- characterization of neuronal membrane aging in Alzheimer's disease. *Aging (Albany, NY)*. **13**, 12817–12832 (2021).
275. RC, B., ER, D., CA, B., JT, B. & I, S. Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. *J. Clin. Lipidol.* **4**, 17–23 (2010).
276. J, E. *et al.* Mitochondrial membrane fluidity is consistently increased in different models of Huntington disease: restorative effects of olesoxime. *Mol. Neurobiol.* **50**, 107–118 (2014).
277. TW, K., N, W. & S, B. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 89–116 (2007).
278. Chang, C.-W. *et al.* ROS-independent ER stress-mediated NRF2 activation promotes warburg effect to maintain stemness-associated properties of cancer-initiating cells. *Cell Death Dis.* **2018 92 9**, 1–14 (2018).
279. Celià-Terrassa, T. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J. Clin. Invest.* **122**, 1849–1868 (2012).
280. Bocci, F. *et al.* NRF2 activates a partial epithelial-mesenchymal transition and is maximally present in a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Integr. Biol. (Camb)*. **11**, 251–263 (2019).
281. B, H. *et al.* Interrogating the topological robustness of gene regulatory circuits by randomization. *PLoS Comput. Biol.* **13**, (2017).
282. Vecchio, C. A. Del *et al.* De-Differentiation Confers Multidrug Resistance Via Noncanonical PERK-Nrf2 Signaling. *PLoS Biol.* **12**, e1001945 (2014).
283. Volmer, R., Ploeg, K. van der & Ron, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 4628–4633 (2013).
284. Zhang, Y., Xue, R., Zhang, Z., Yang, X. & Shi, H. Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells. *Lipids Health Dis.* **11**, 1 (2012).
285. Bae, S., Kim, M.-K., Kim, H. S. & Moon, Y.-A. Arachidonic acid induces ER stress and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. <https://doi.org/10.1080/19768354.2020.1813805> **24**, 260–266 (2020).
286. X, B. *et al.* Activation of the eIF2 α /ATF4 axis drives triple-negative breast cancer radioresistance by promoting glutathione biosynthesis. *Redox Biol.* **43**, (2021).
287. Bommiasamy, H. *et al.* ATF6 α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **122**, 1626–1636 (2009).
288. Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K. & Brewer, J. W. XBP1: A link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **167**, 35–41 (2004).
289. Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., Voss, C. & Walter, P. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J. Cell Biol.* **187**, 525–536 (2009).
290. Simic, M. S. *et al.* Transient activation of the UPR ER is an essential step in the

- acquisition of pluripotency during reprogramming. *Sci. Adv.* **5**, (2019).
291. Calon, A., Tauriello, D. V. F. & Batlle, E. *TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. Seminars in Cancer Biology* vol. 25 15–22 (2014).
 292. Wu, X. *et al.* Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 Is a Biomarker for and Mediator of Hormone Resistance in Human Breast Cancer. *PLoS One* **8**, e77060 (2013).
 293. Viswanathan, V. S. *et al.* Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* **547**, 453–457 (2017).
 294. Zhang, X. *et al.* The essential role of YAP O-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis. *Nat. Commun.* **2017 81** **8**, 1–15 (2017).
 295. Wang, J., Wang, Z., Yuan, J., Wang, J. & Shen, X. The positive feedback between ACSL4 expression and O-GlcNAcylation contributes to the growth and survival of hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany, NY)*. **12**, 7786–7800 (2020).
 296. Feldker, N. *et al.* Genome-wide cooperation of EMT transcription factor ZEB1 with YAP and AP-1 in breast cancer. *EMBO J.* **39**, e103209 (2020).
 297. Lee, J. N. & Ye, J. Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 45257–45265 (2004).
 298. S, K. *et al.* Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* **70**, 9969–9978 (2010).
 299. Scheel, C. *et al.* Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* **145**, 926–940 (2011).
 300. Calon, A., Tauriello, D. V. F. & Batlle, E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **25**, 15–22 (2014).
 301. Ebbing, E. A. *et al.* Stromal-derived interleukin 6 drives epithelial-to-mesenchymal transition and therapy resistance in esophageal adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 2237–2242 (2019).
 302. Yuan, H. *et al.* Intrahepatic cholangiocarcinoma induced M2-polarized tumor-associated macrophages facilitate tumor growth and invasiveness. *Cancer Cell Int.* **20**, 1–14 (2020).
 303. LF, C. *et al.* Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenine. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
 304. Labadie, B. W., Bao, R. & Luke, J. J. Reimagining IDO pathway inhibition in cancer immunotherapy via downstream focus on the tryptophan–kynurenine–aryl hydrocarbon axis. *Clinical Cancer Research* vol. 25 1462–1471 (2019).
 305. Ochs, K. *et al.* Tryptophan-2,3-dioxygenase is regulated by prostaglandin E2 in malignant glioma via a positive signaling loop involving prostaglandin e receptor-4. *J. Neurochem.* **136**, 1142–1154 (2016).
 306. Jung, M., Mertens, C., Bauer, R., Rehwald, C. & Brüne, B. Lipocalin-2 and iron trafficking in the tumor microenvironment. *Pharmacological Research* vol. 120 146–156 (2017).

307. Dirat, B. *et al.* Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* **71**, 2455–2465 (2011).
308. Lapeire, L. *et al.* Cancer-associated adipose tissue promotes breast cancer progression by paracrine oncostatin M and Jak/STAT3 signaling. *Cancer Res.* **74**, 6806–6819 (2014).
309. Hill, E. M. *et al.* Dietary polyunsaturated fatty acids modulate adipose secretome and is associated with changes in mammary epithelial stem cell self-renewal. *J. Nutr. Biochem.* **71**, 45–53 (2019).
310. Luis, G. *et al.* Tumor resistance to ferroptosis driven by Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) in cancer cells and Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP4) in tumor microenvironment promote tumor recurrence. *Redox Biol.* **43**, (2021).
311. Tian, W. *et al.* FABP4 promotes invasion and metastasis of colon cancer by regulating fatty acid transport. *Cancer Cell Int.* **20**, 1–13 (2020).
312. Nieman, K. M. *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* **17**, 1498–1503 (2011).
313. Sphyris, N. *et al.* Carcinoma cells that have undergone an epithelial-mesenchymal transition differentiate into endothelial cells and contribute to tumor growth. *Oncotarget* **12**, 823–844 (2021).