

Importance des lipides membranaires pour l'activité d'une saponine, le ginsenoside Rh2

Sandrine Verstraeten

Promoteurs : Marie-Paule Mingeot-Leclercq & Donatienne Tyteca

**Importance des lipides membranaires pour
l'activité d'une saponine, le ginsenoside Rh2**

Les lipides sont essentiels pour notre organisme



Pourtant....



- Réservoir énergétique
- Précurseurs d'hormones (testostérone, cortisol,...)
- Intermédiaires dans des voies de signalisation (croissance, mort cellulaire,...)
- Constituants des membranes cellulaires



Dit Jamy : Au fond c'est quoi un lipide ?

Acides gras



C18:0



C18:1 (n-9)



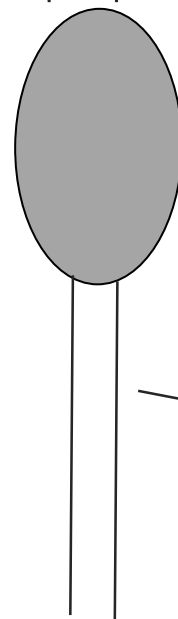
C18:3 (n-3)



Acide gras oméga-3

Phospholipides/Sphingolipides

Amphiphiles



tête hydrophile



queues hydrophobes



Stérois

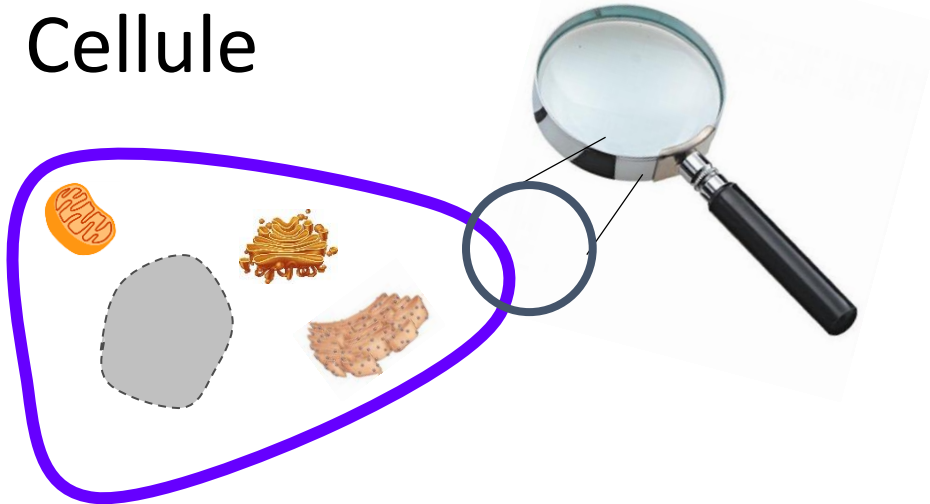


cholestérol

Les lipides membranaires - importance

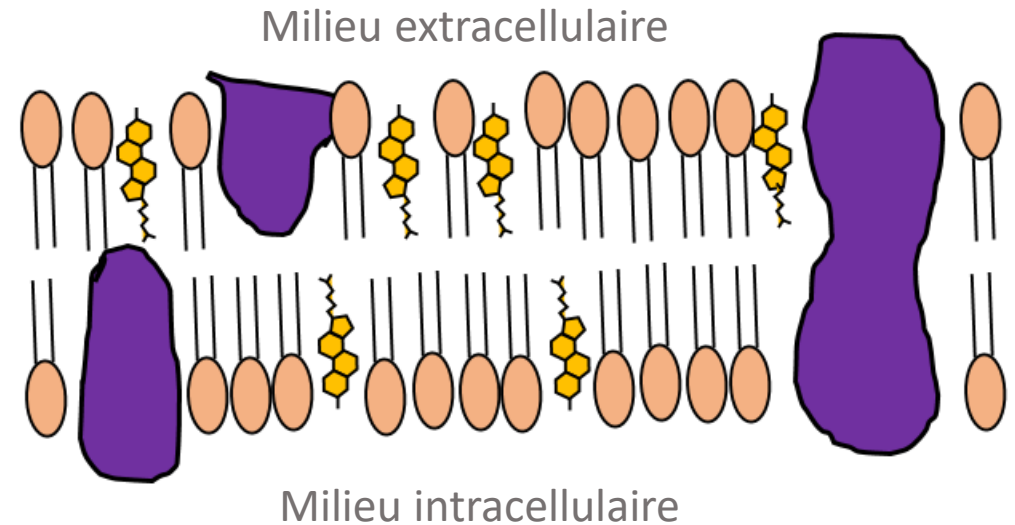
Cellule

10 μ m



La membrane plasmique

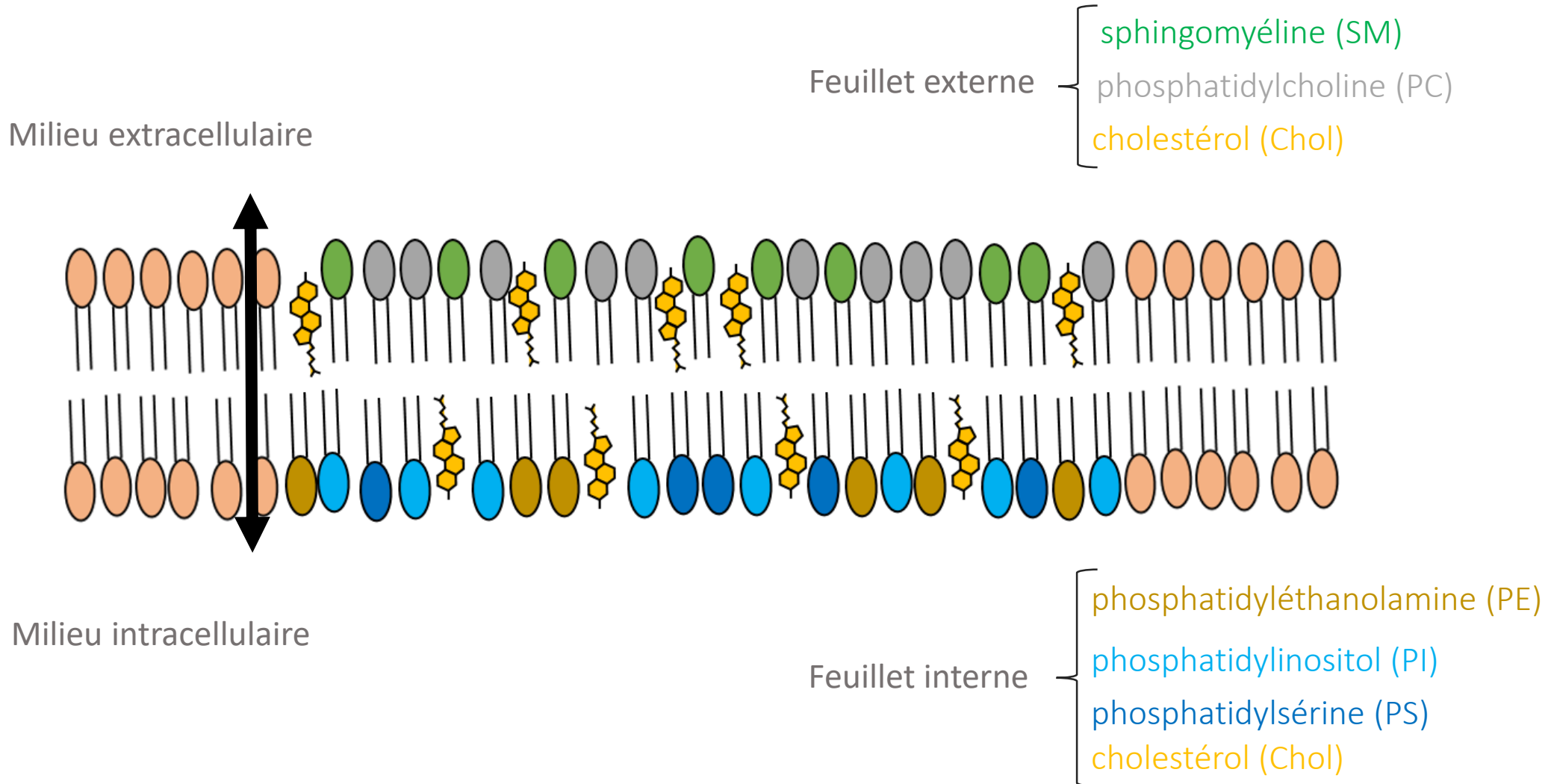
7nm



- Compartimentation cellulaire
- Echange avec le milieu extracellulaire
- Modulation de l'activité de protéines membranaires
- Déformation cellulaire

Organisation optimale

Les lipides membranaires – asymétrie transversale



Les lipides membranaires – asymétrie transversale

Focus sur

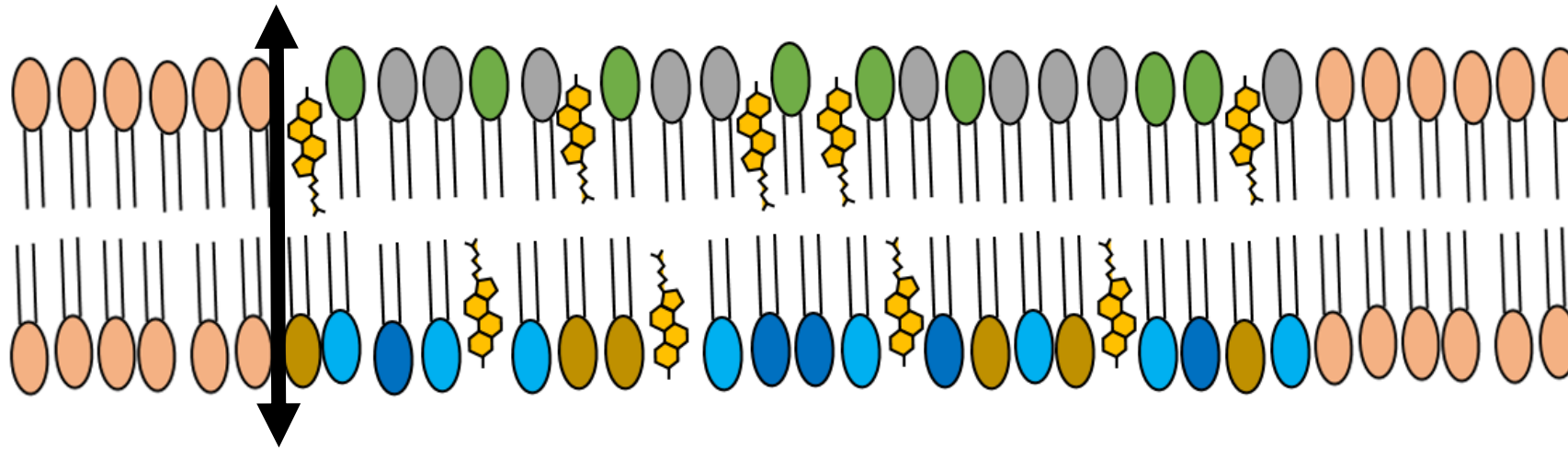
Feuillet externe

sphingomyéline (SM)

phosphatidylcholine (PC)

cholestérol (Chol)

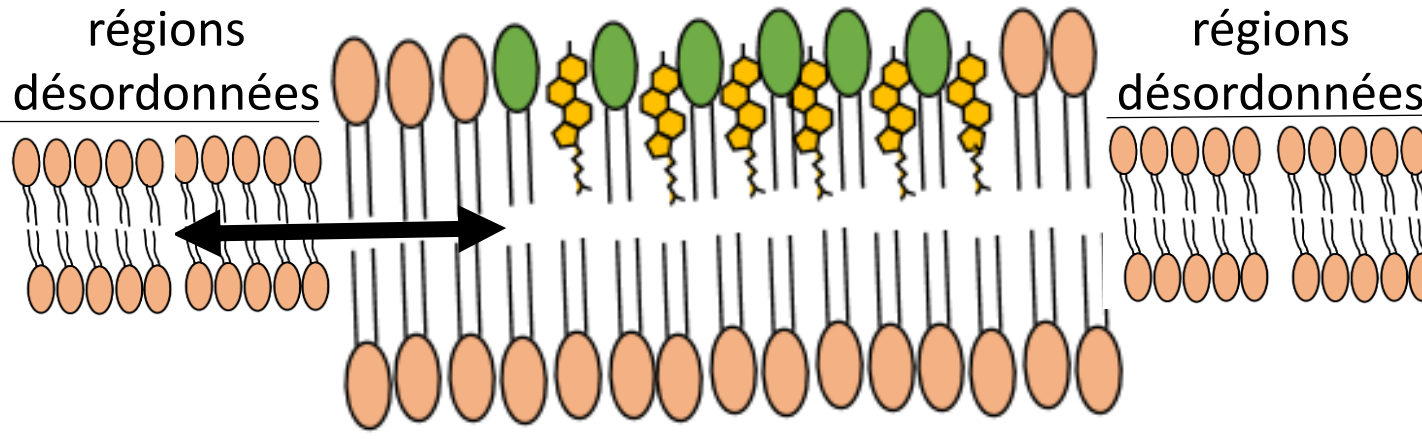
Milieu extracellulaire



Milieu intracellulaire

Les lipides membranaires – asymétrie transversale

Milieu extracellulaire



Milieu intracellulaire

Domaines ordonnés enrichis en
sphingomyéline (SM) & cholestérol (Chol)



Adhésion &
Migration

Survie &
Mort

➤ Les lipides présents dans ces domaines pourraient-ils être des cibles potentielles pour des agents pharmacologiques pour la modulation de voies de signalisation?

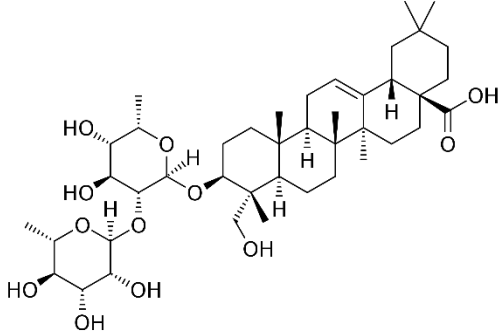
Saponines ?

**Importance des lipides membranaires pour
l'activité d'une saponine, le ginsenoside Rh2**

Les saponines

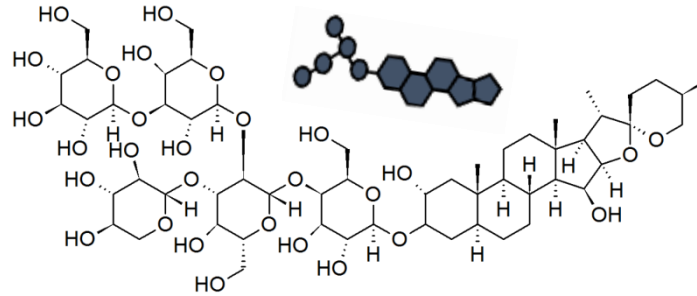
- Molécules amphiphiles produites principalement par les plantes
- Un ou plusieurs groupements sucrés combinés à un noyau triterpénique ou stéroïde
- Plusieurs activités pharmacologiques : antibactérienne, anticancéreuse,...
- Interaction avec la membrane plasmique

α -Hédérine



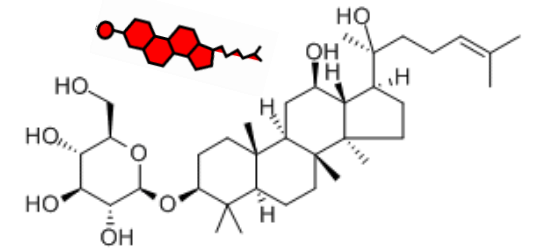
Hedera helix (le lierre commun)

Digitonine



Digitalis purpurea (la digitale pourpre)

Ginsenoside Rh2

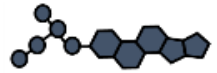


Panax ginseng C.A. Meyer (le ginseng)

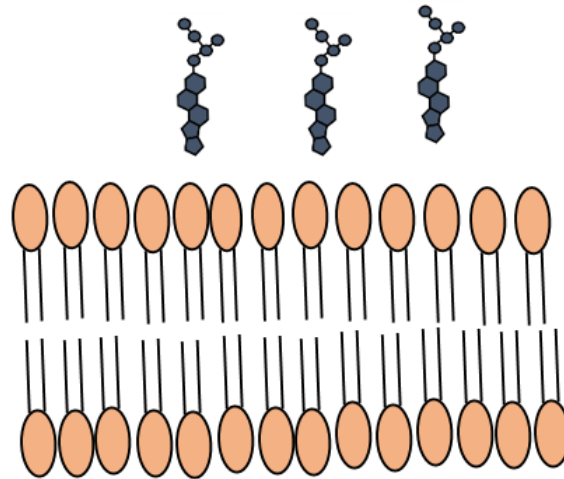
Les saponines

L'activité de certaines saponines (α -hédérine, digitonine,...) est attribuée à leur interaction avec le cholestérol membranaire^{1,2}

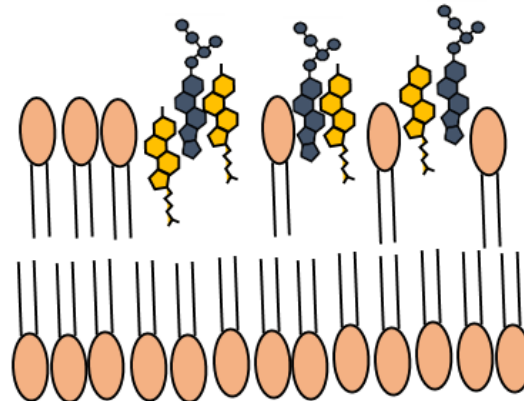
Digitonine



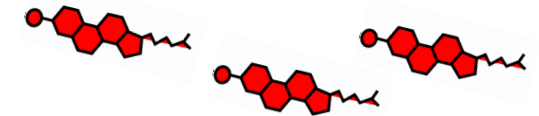
Pas de **cholestérol** →
Pas d'interaction avec la membrane



Présence du **cholestérol** →
Interaction avec la membrane &
Formation de complexes avec le **cholestérol**



Ginsenoside Rh2



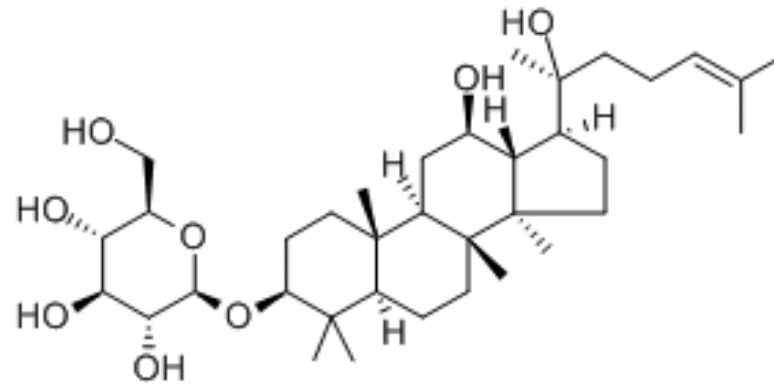
?

1. Sudji IR et al, 2015

2. Lorent JH et al, 2016

Focus sur une saponine, le ginsenoside Rh2

- Un des principes actifs de la racine du *Panax ginseng*
- Effets anti-cancéreux *in vitro* (culture cellulaire) et *in vivo* (souris) : inhibition de la prolifération cellulaire et induction de l'apoptose dans différentes lignées tumorales^{1,2}



Ginsenoside Rh2

Apoptose ?

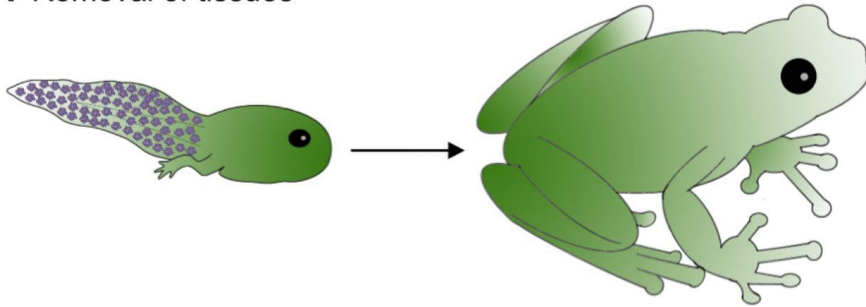
**Importance des lipides membranaires pour
l'activité d'une saponine, le ginsenoside Rh2**

Apoptose - définition

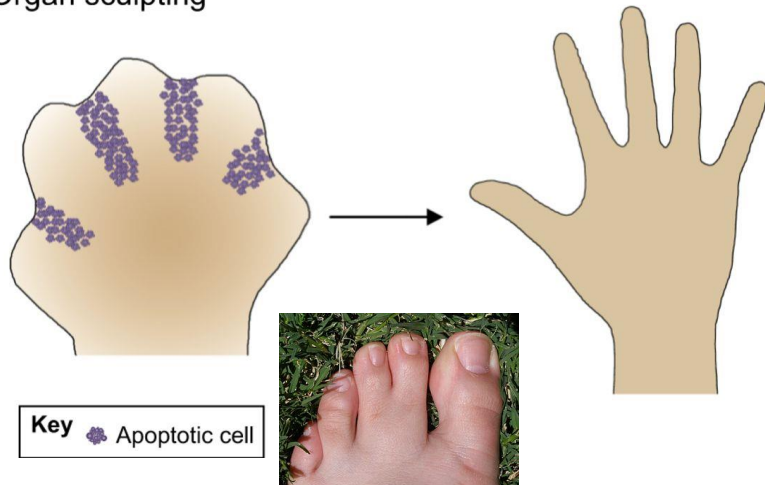
- Processus physiologique (ex : embryogenèse, homéostasie cellulaire) par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction = mort cellulaire programmée¹
- Morphologie : Condensation et fragmentation de l'ADN + formation de corps apoptotiques



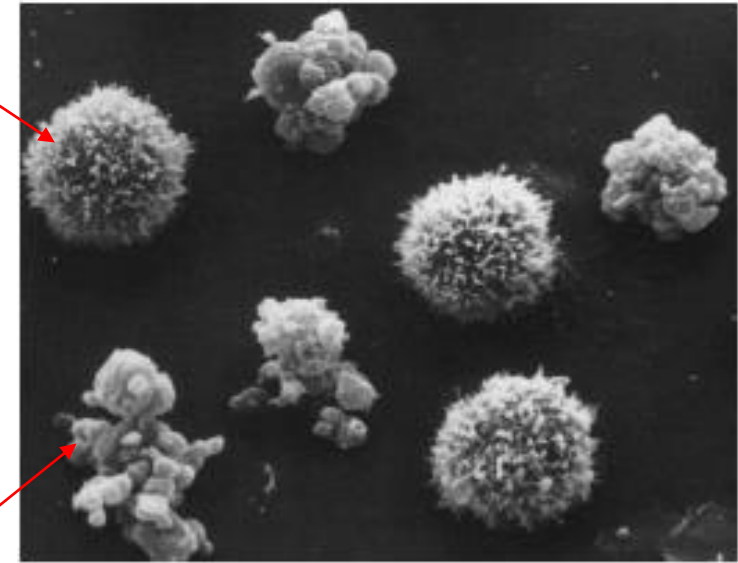
A Removal of tissues



B Organ sculpting



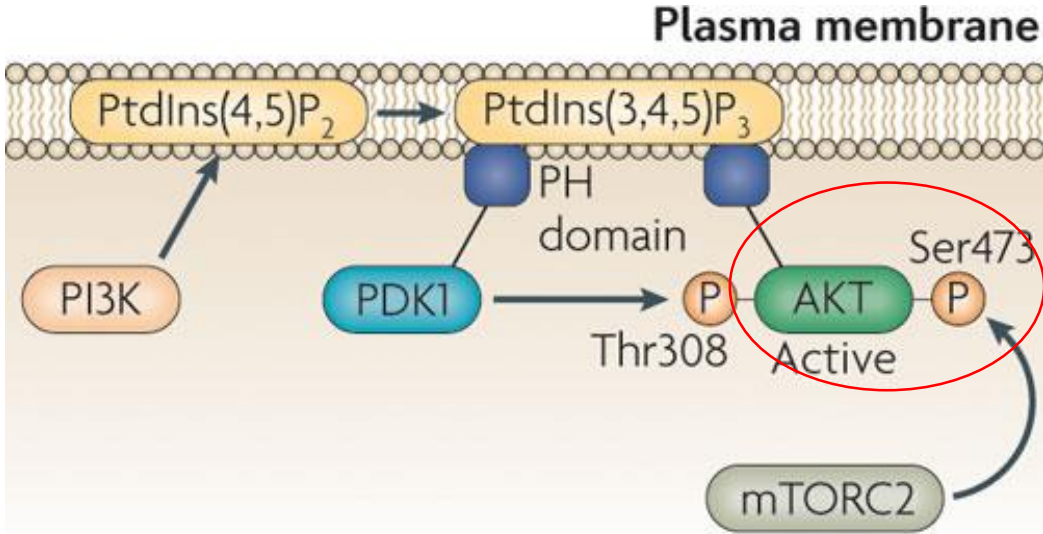
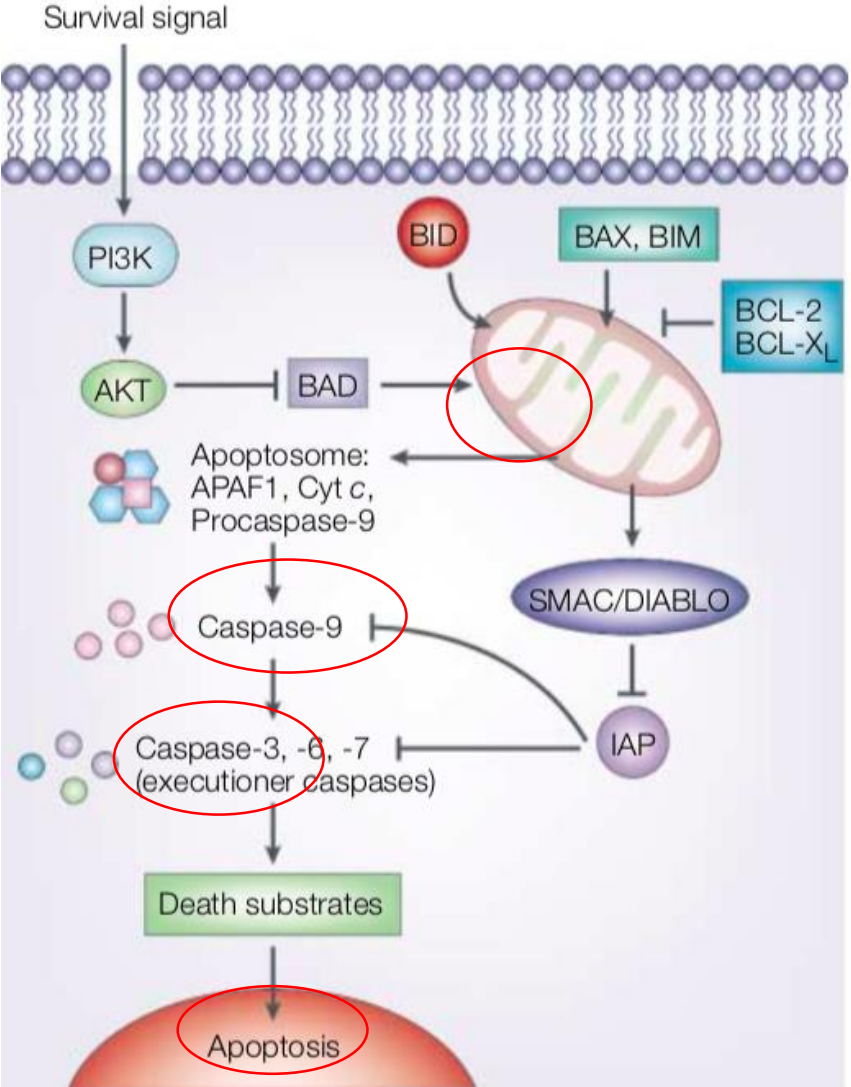
Cellule normale



Cellule en apoptose

Apoptose – la voie intrinsèque

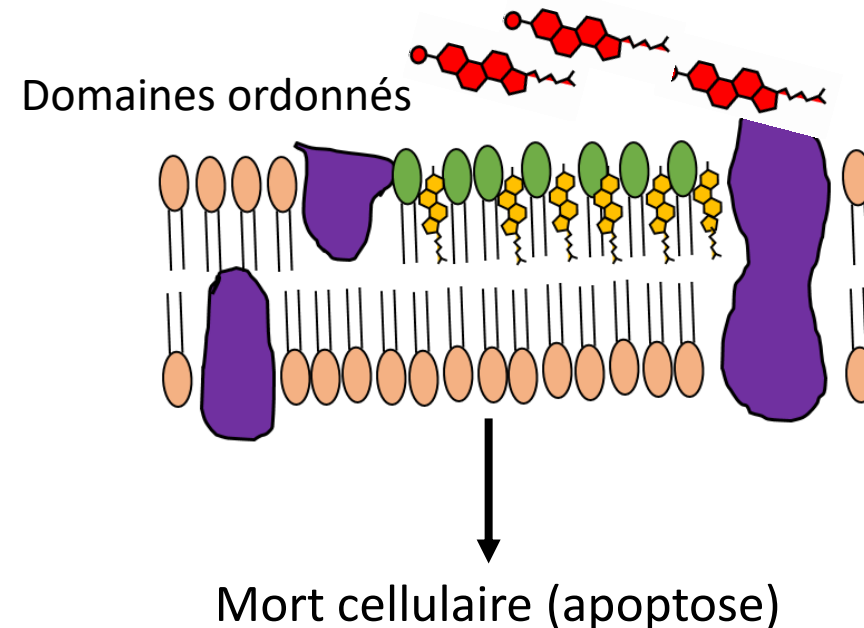
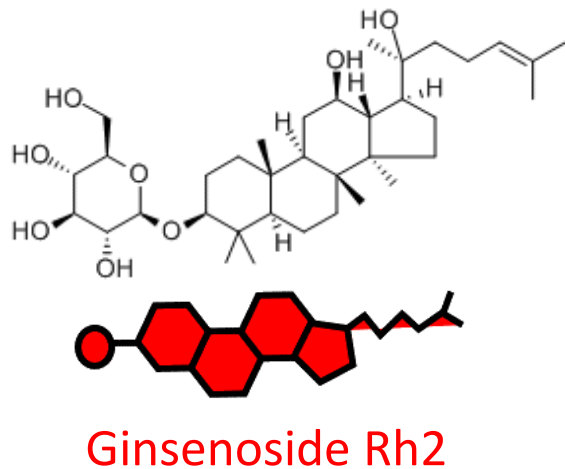
- Deux voies apoptotiques : intrinsèque & extrinsèque²



Nature Reviews | Immunology

L'apoptose induite par le Rh2 résulte d'un effet membranaire

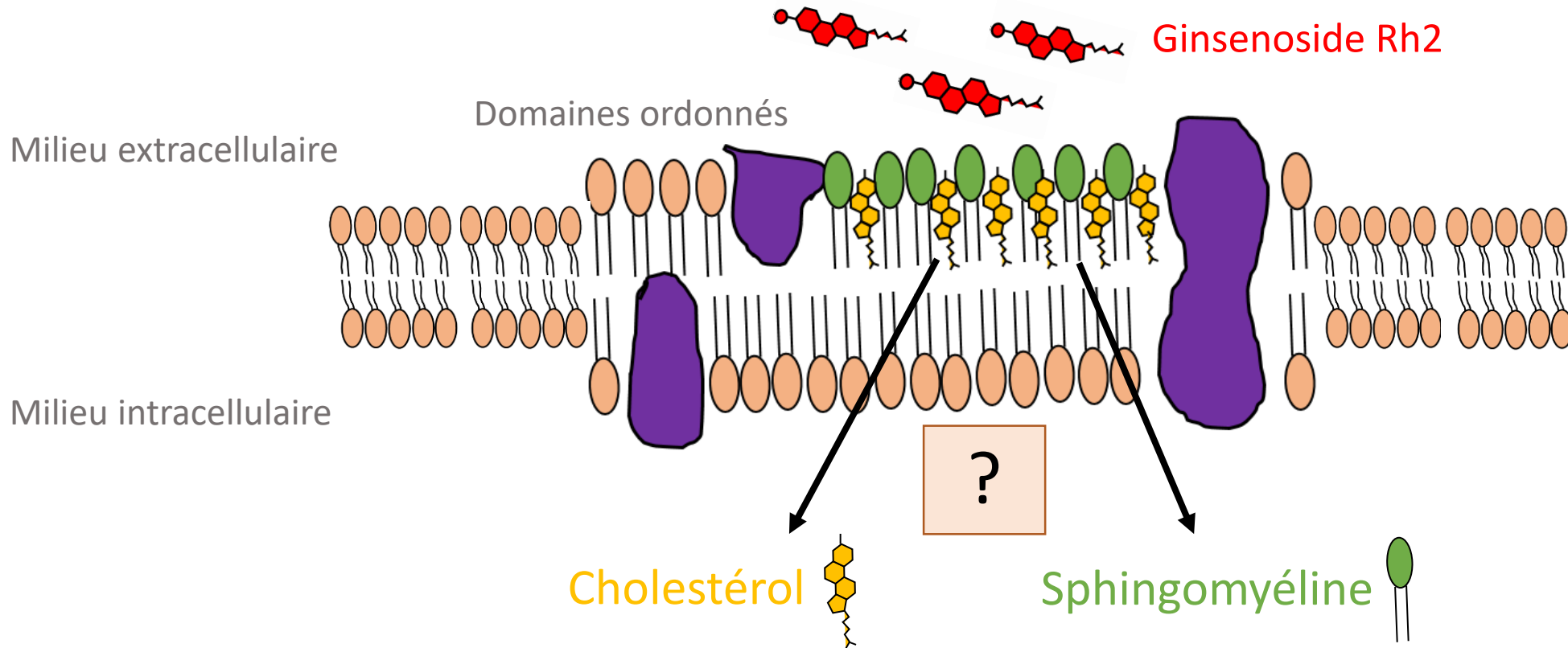
- Un des principes actifs de la racine du *Panax ginseng*
- Effets anti-cancéreux *in vitro* (culture cellulaire) et *in vivo* (souris) : inhibition de la prolifération cellulaire et induction de la mort cellulaire (apoptose) dans différentes lignées tumorales^{1,2}
- L'apoptose induite par le Rh2 semble résulter d'une perturbation des domaines ordonnés riches en sphingomyéline et en cholestérol^{3,4}



3. Yi JS et al, 2009

4. Park EK et al, 2010

Objectif principal

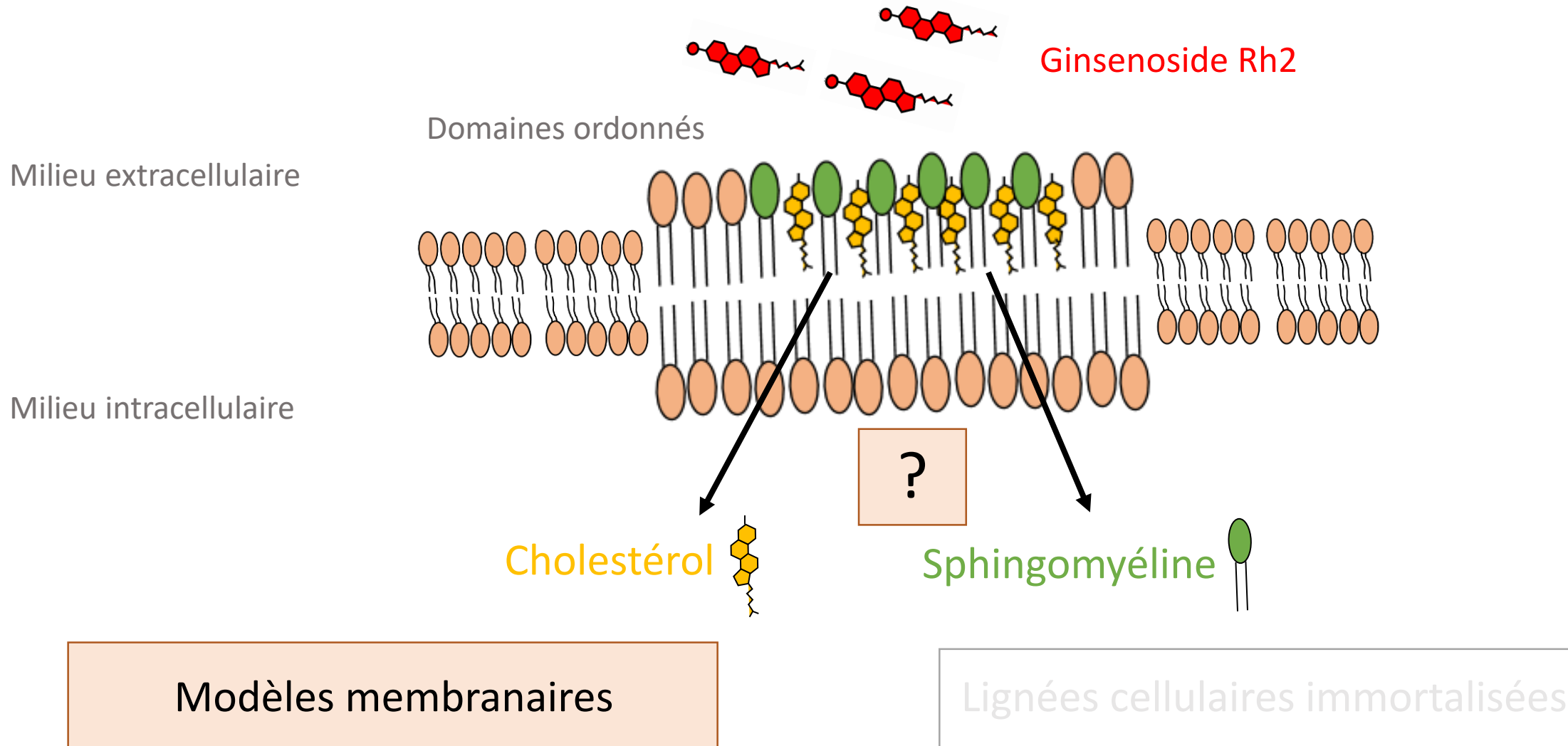


Importance respective du **cholestérol** et de la **sphingomyéline** pour l'activité membranaire et apoptotique du Rh2?

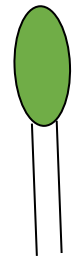
Modèles membranaires

Lignées cellulaires immortalisées

Importance respective du **cholestérol** et de la **sphingomyéline** pour l'activité membranaire du Rh2 ?



Modèles membranaires – 3 compositions lipidiques différentes



Sphingomyéline

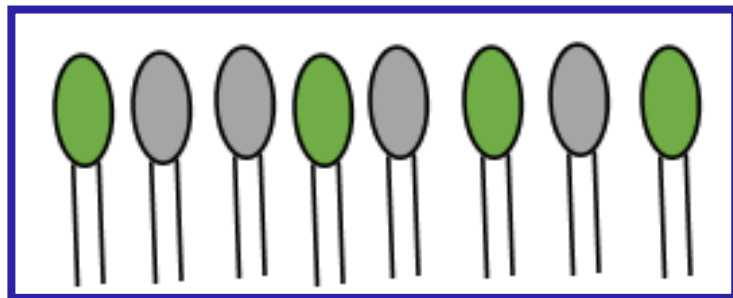


Phosphatidylcholine



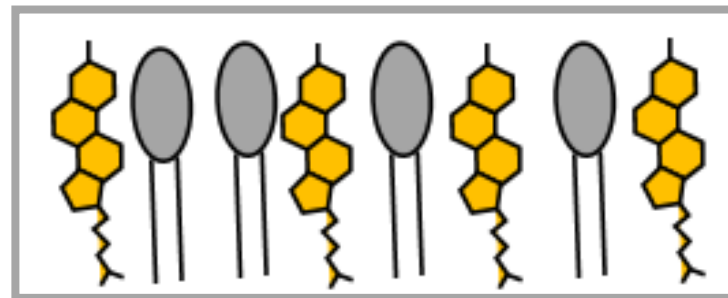
Cholestérol

Sphingomyéline
Phosphatidylcholine



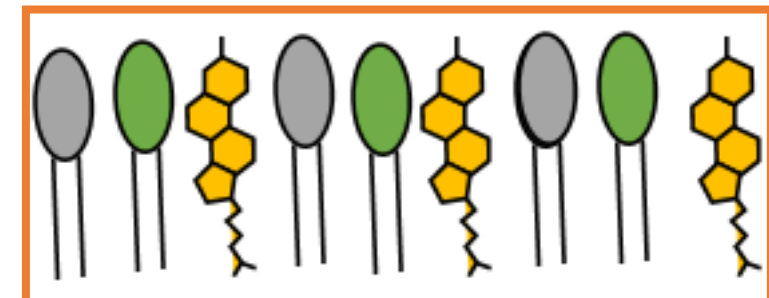
SM:PC (1:1)

Phosphatidylcholine
Cholestérol



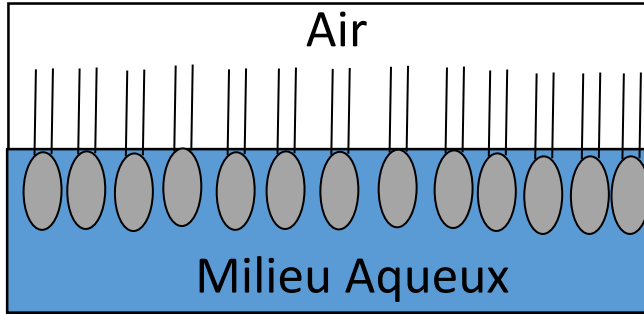
PC:Chol (1:1)

Sphingomyéline
Phosphatidylcholine
Cholestérol



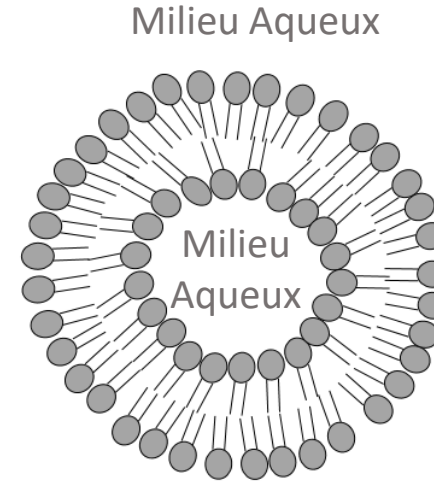
SM:PC:Chol (1:1:1)

Modèles membranaires – 3 types



Monocouches lipidiques
à l'interface eau/air

- Tension de surface



Bicouches lipidiques (liposomes)

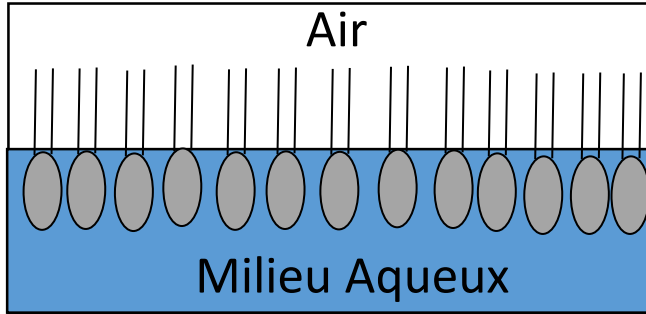
Vésicules larges unilamellaires
(LUVs) ± 150 nm

Vésicules géantes unilamellaires
(GUVs) ± 10 μ m

- Rigidité
- Perméabilité

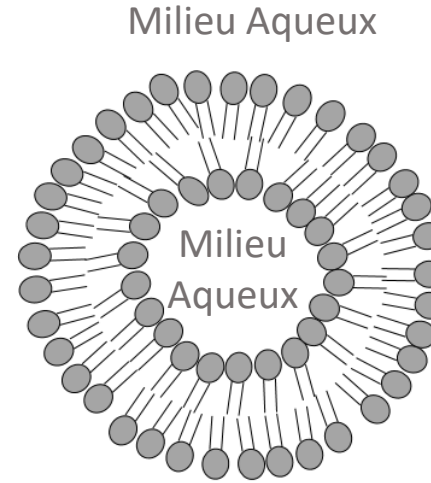
- Courbure & déformabilité

Modèles membranaires – 3 types



Monocouches lipidiques
à l'interface eau/air

- Tension de surface



Bicouches lipidiques (liposomes)

Vésicules larges unilamellaires
(LUVs) ± 150 nm

Vésicules géantes unilamellaires
(GUVs) ± 10 μ m

- Rigidité
- Perméabilité

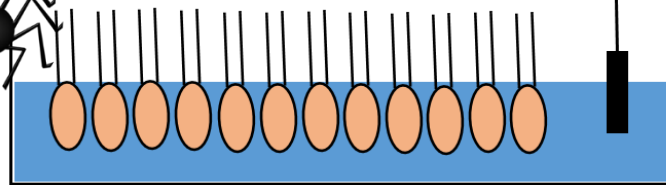
- Courbure & déformabilité

La tension de surface – principe de la méthode

Tension de surface : force à l'interface lipide-eau



Araignées d'eau (Gerris) possèdent des poils hydrofuges à l'extrémité de leurs pattes

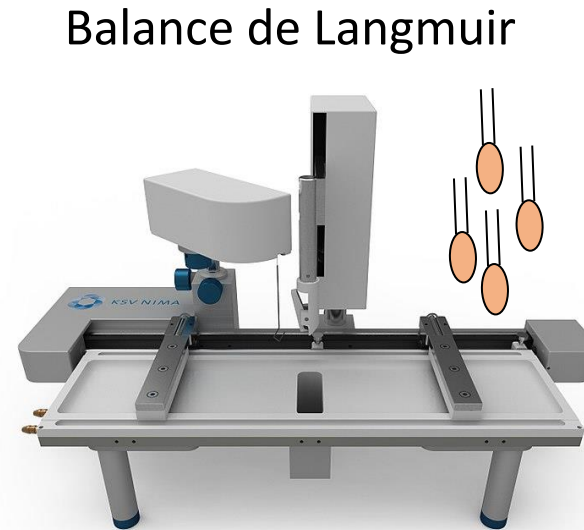


Tensiomètre à plaque de Wilhelmy

Air

Eau

Tension de surface

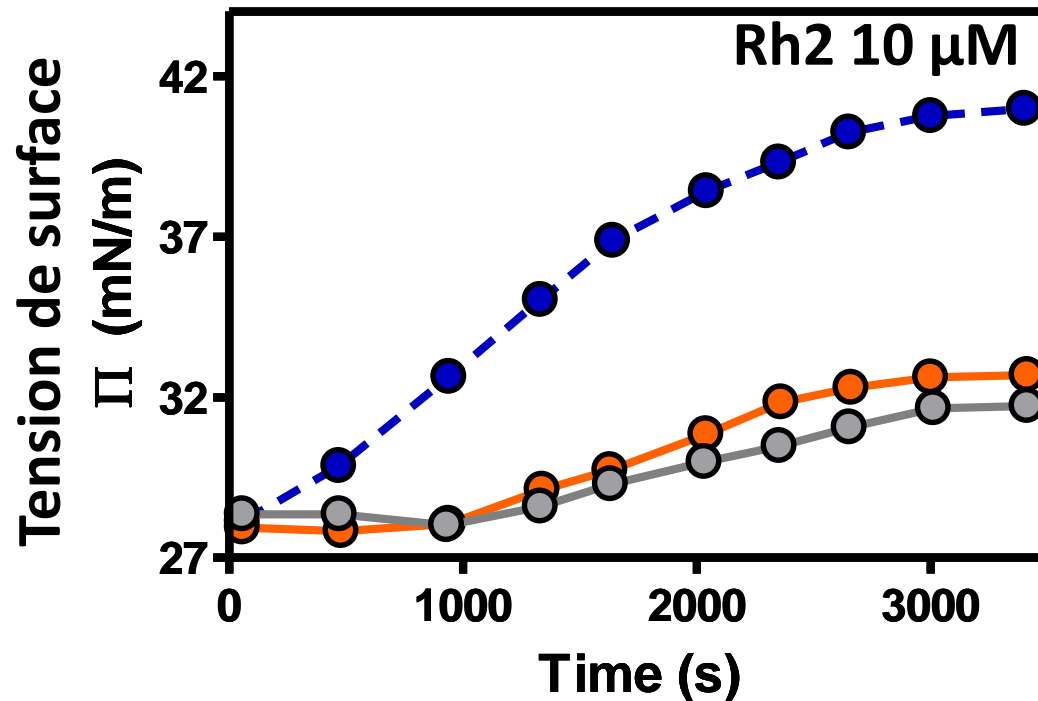


Balance de Langmuir

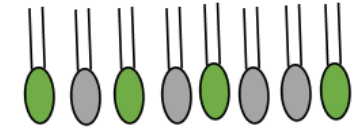


La tension de surface – effet du Rh2

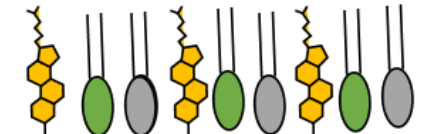
Langmuir
Coll. M. Deleu
(ULg, Gembloux)



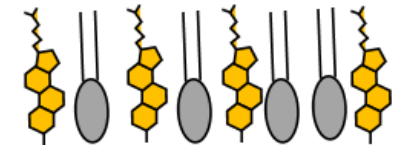
SM:PC



SM:PC:Chol

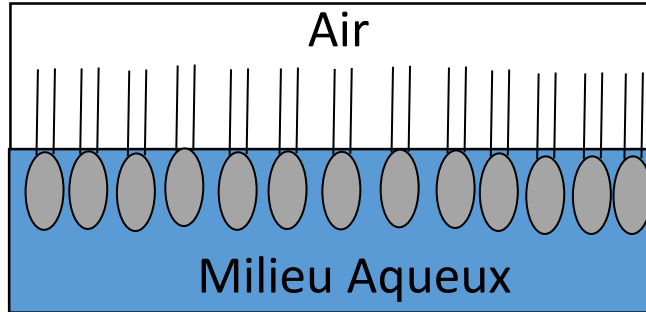


PC:Chol



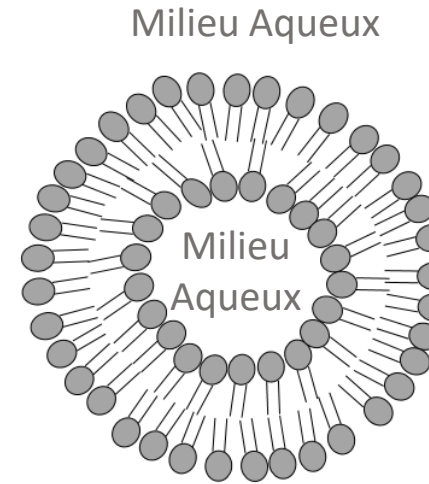
- Le Rh2 s'adsorbe sur une monocouche lipidique préférentiellement en présence de **sphingomyéline** et en absence de **cholestérol**

Modèles membranaires – 3 types



Monocouches lipidiques
à l'interface eau/air

- Tension de surface



Bicouches lipidiques (liposomes)

Vésicules larges unilamellaires
(LUVs) ± 150 nm



- Rigidité
- Perméabilité

Vésicules géantes unilamellaires
(GUVs) ± 10 μ m



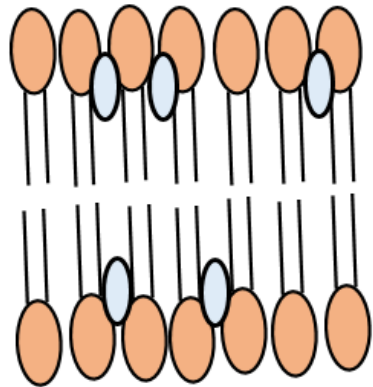
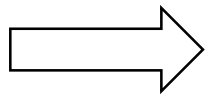
- Courbure & déformabilité

La rigidité membranaire – principe de la méthode

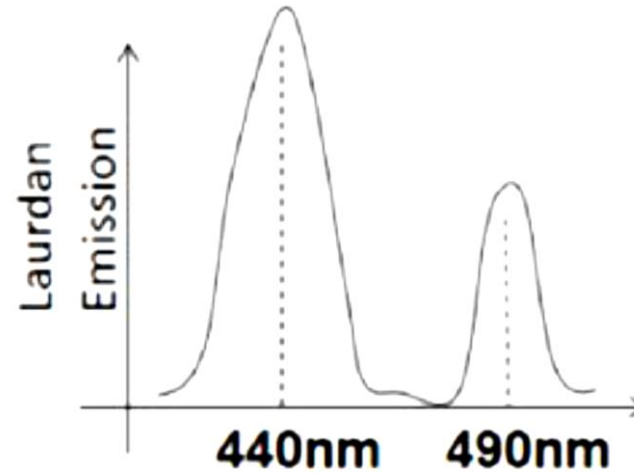
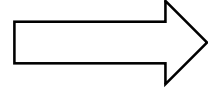
Rigidité/hydratation membranaire ?

Laurdan 

Excitation

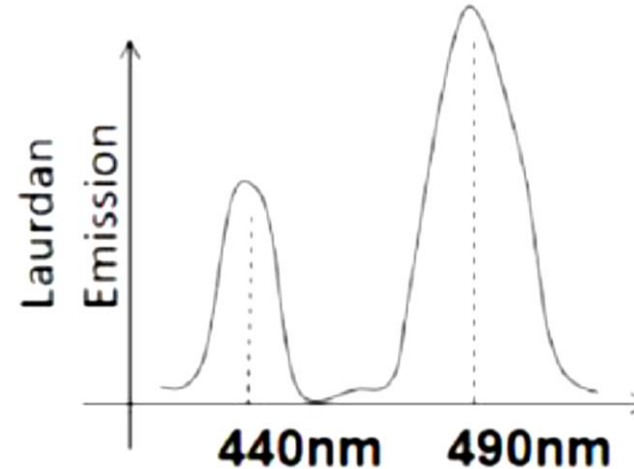
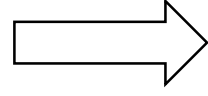
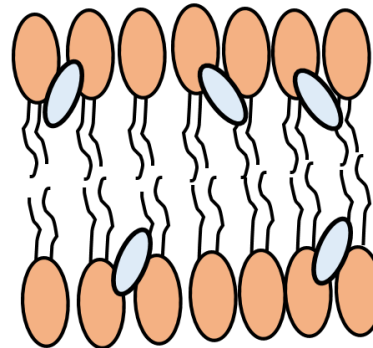
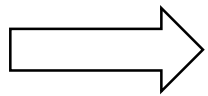


Emission



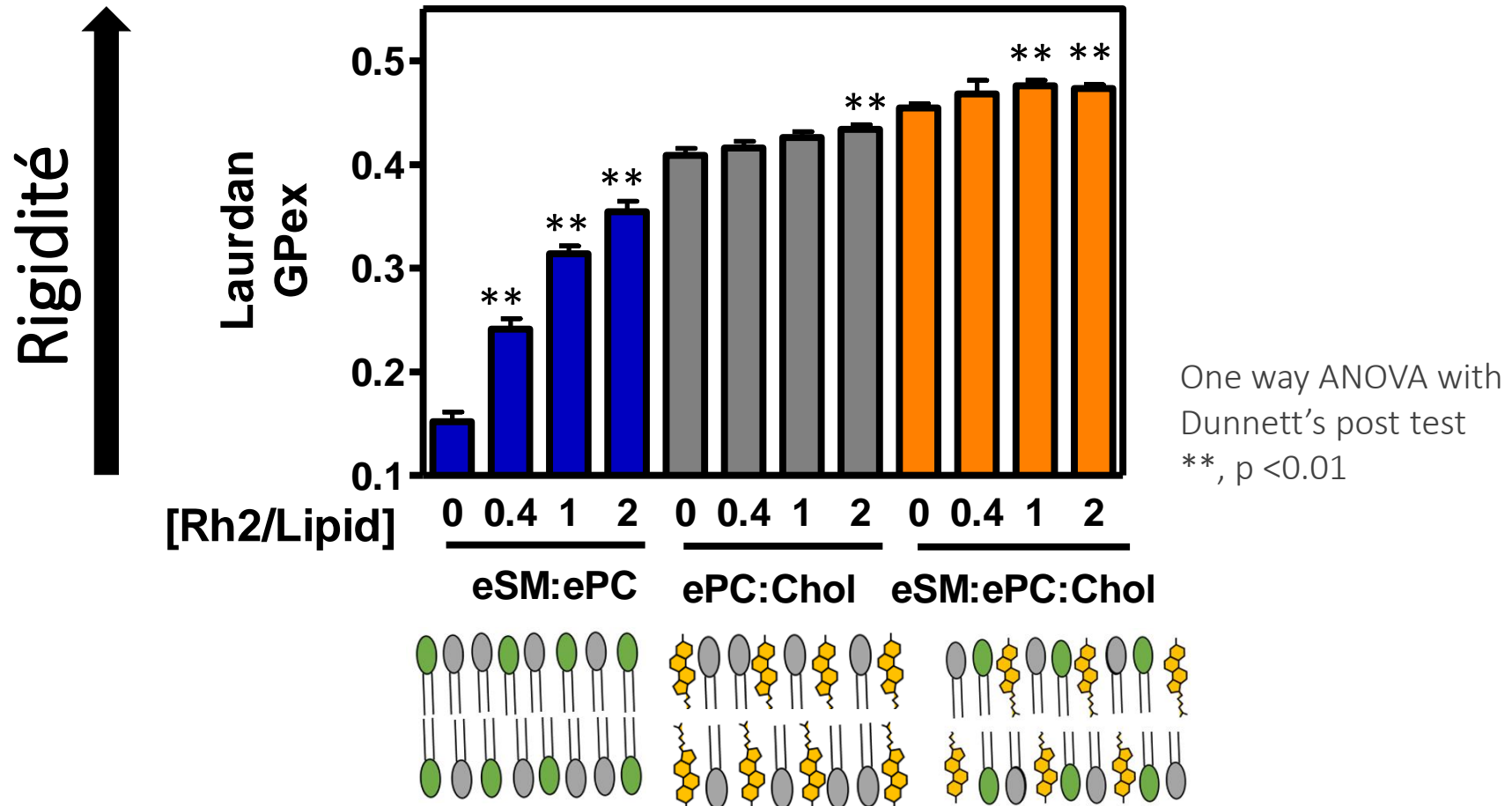
$$GP_{ex} = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

Rigide (- hydratée)
(↑ GP_{ex})



Fluide (+ hydratée)
(↓ GP_{ex})

La rigidité membranaire – effet du Rh2

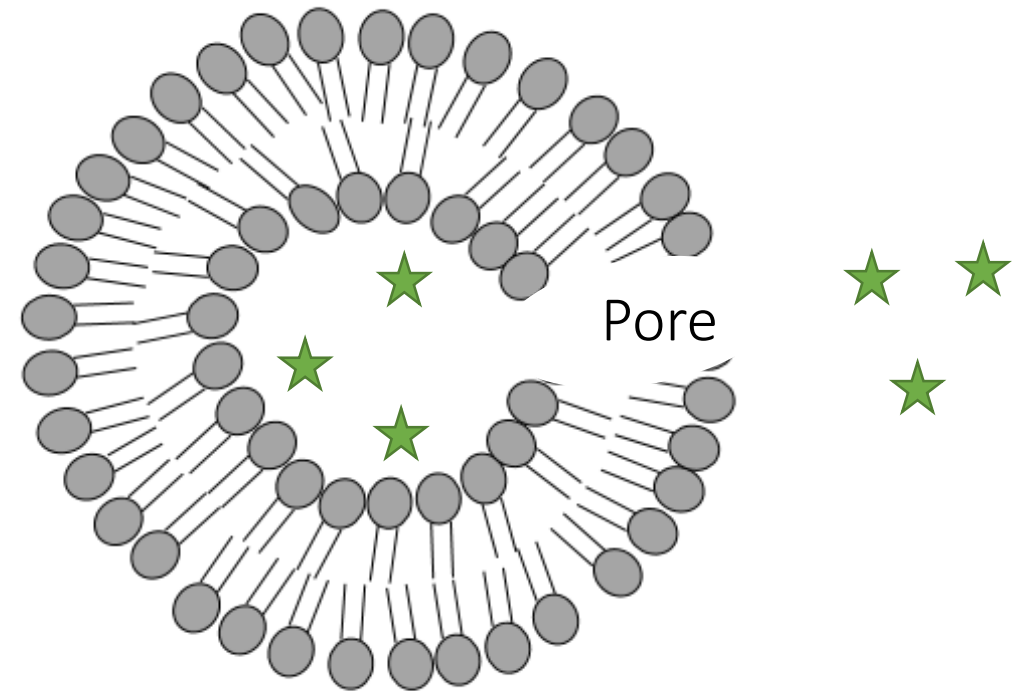
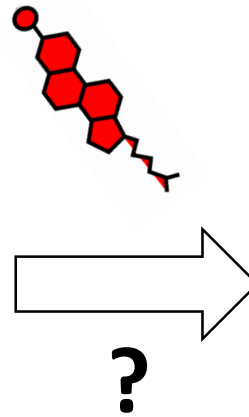
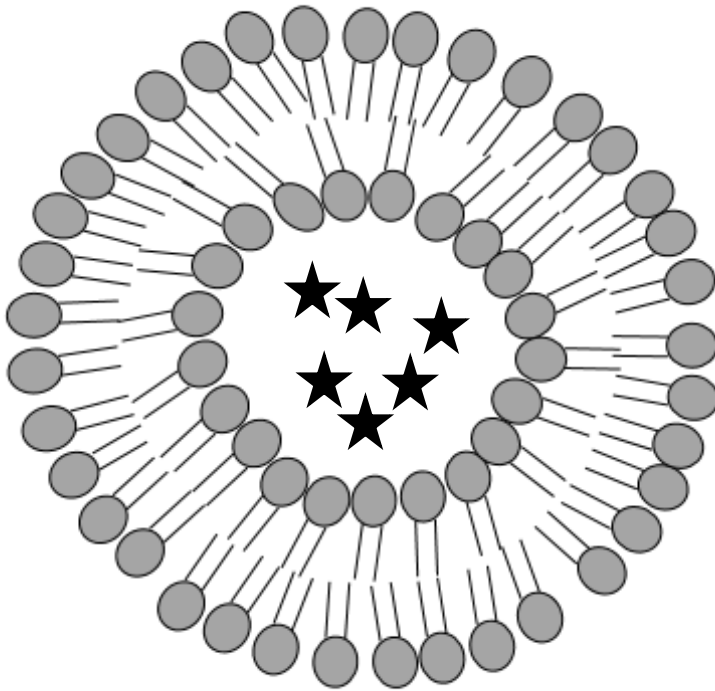


- Le Rh2 augmente la rigidité membranaire à des concentrations plus faibles en présence de **sphingomyéline** et en absence de **cholestérol**

La perméabilité membranaire – principe de la méthode

Perméabilité membranaire ?

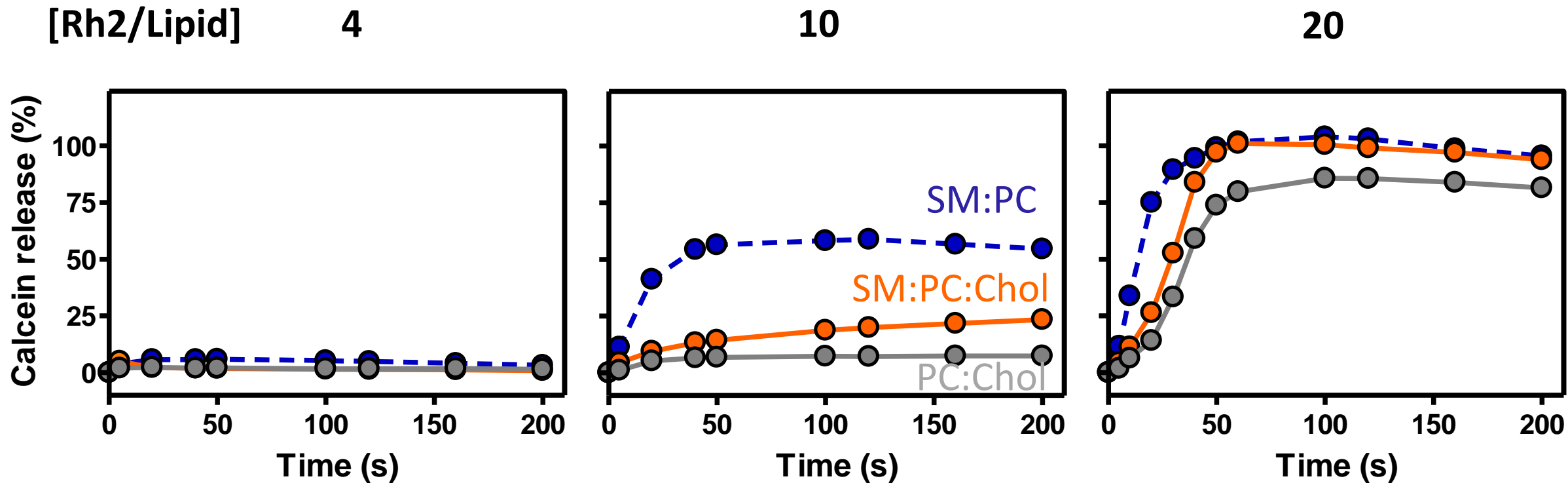
calcéine ★



Extinction de la fluorescence de la calcéine

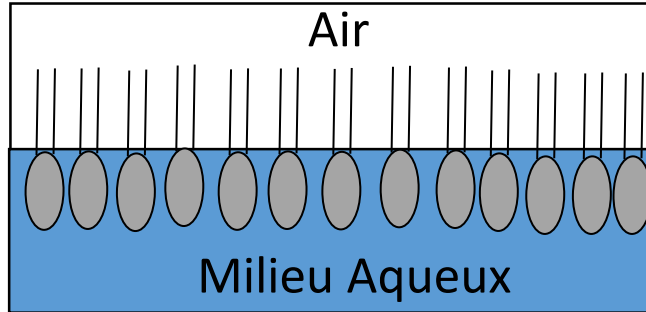
Fluorescence de la calcéine

La perméabilité membranaire – effet du Rh2



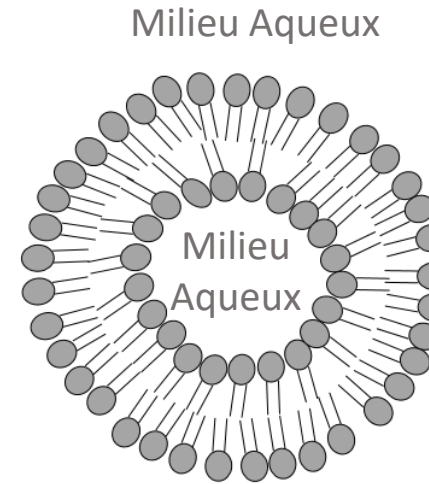
- Le Rh2 induit une perméabilité membranaire plus rapide et plus importante en présence de **sphingomyéline** et en absence de **cholestérol**

Modèles membranaires – 3 types



Monocouches lipidiques
à l'interface eau/air

- Tension de surface



Bicouches lipidiques (liposomes)

Vésicules larges unilamellaires
(LUVs) ± 150 nm



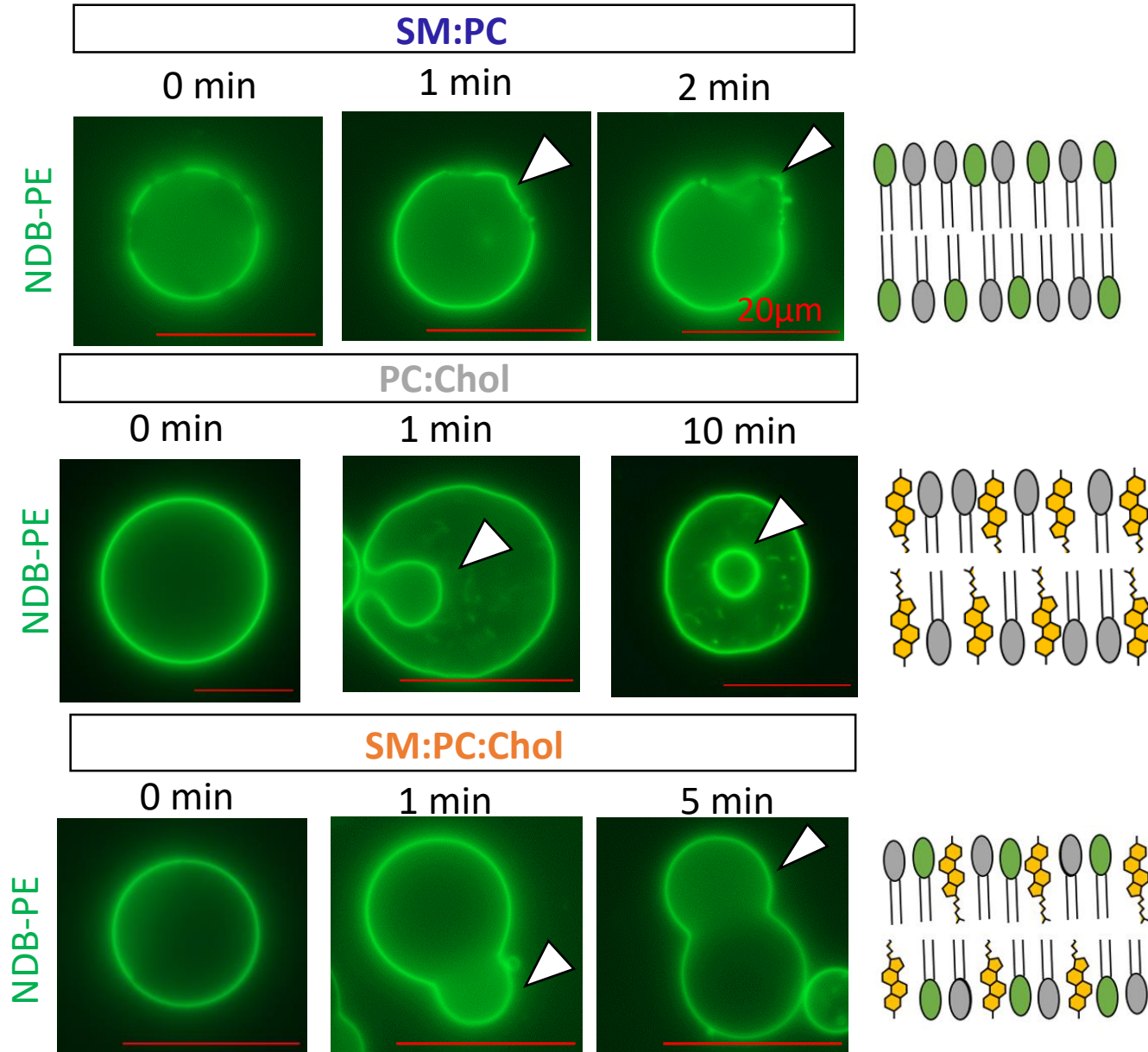
- Rigidité
- Perméabilité

Vésicules géantes unilamellaires
(GUVs) ± 10 μ m



- Courbure & déformabilité

Morphologie des GUVs – effet du Rh2



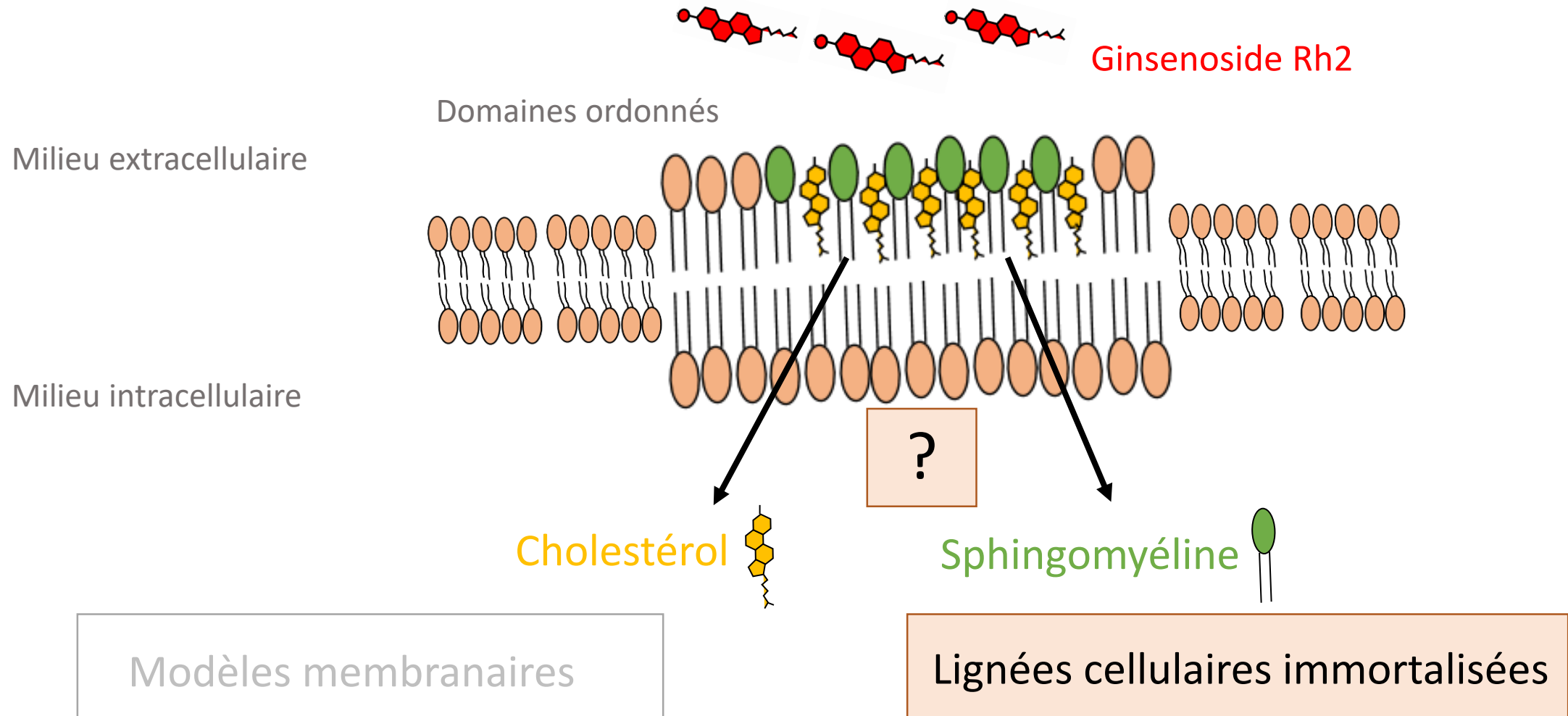
- Le Rh2 induit une courbure positive de membrane en présence de **sphingomyéline**
- Le Rh2 induit la formation de vésicules intraluminales en son absence

Activité membranaire du Rh2 - observations principales

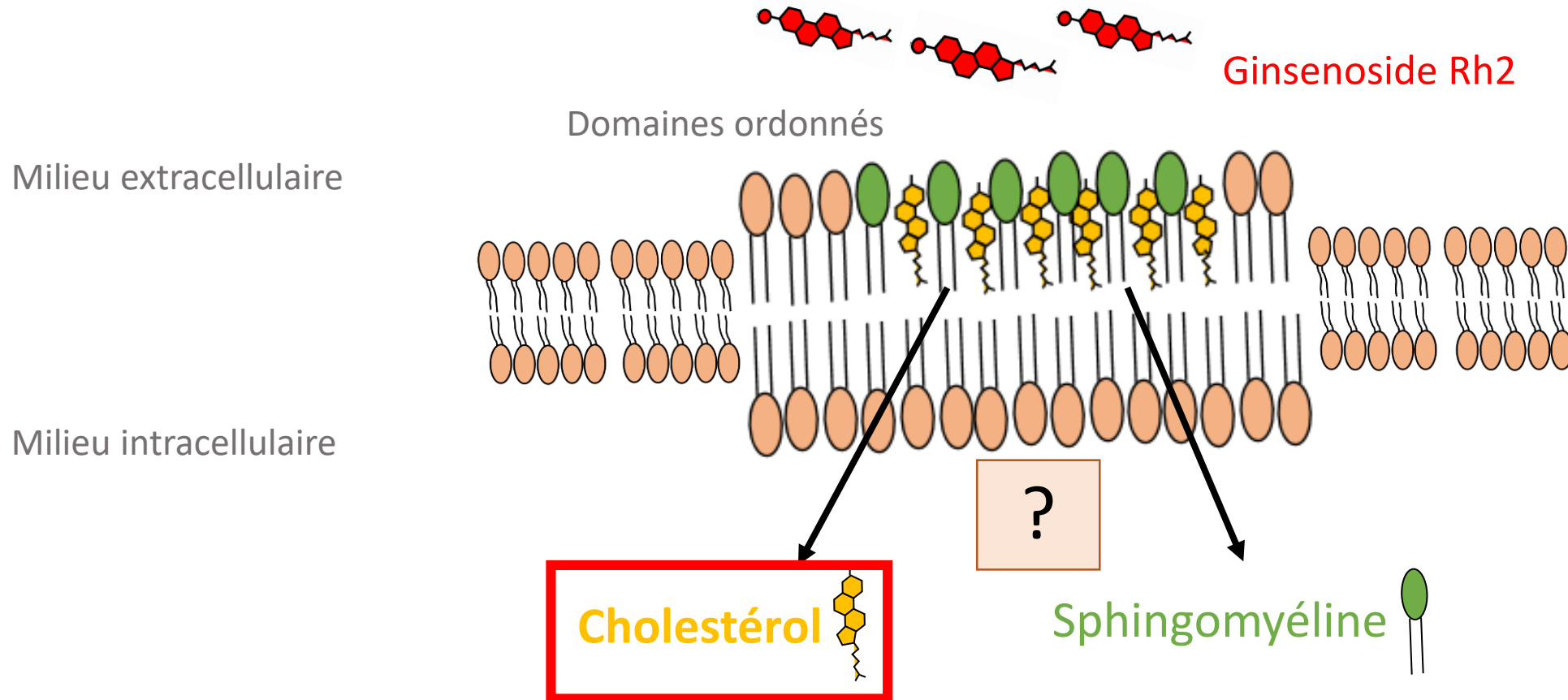
- Contrairement au **cholestérol**, la **sphingomyéline** favorise et/ou accélère les effets du Rh2 sur les membranes :
 - Tension de surface
 - Rigidité
 - Perméabilité
 - Courbure positive
- Renouvelle l'idée que l'activité de la plupart des saponines dépend de leur interaction avec le **cholestérol** membranaire

➔ Verstraeten SL et al, Scientific Reports, 2019

Importance respective du **cholestérol** et de la **sphingomyéline** pour l'activité apoptotique du Rh2 ?

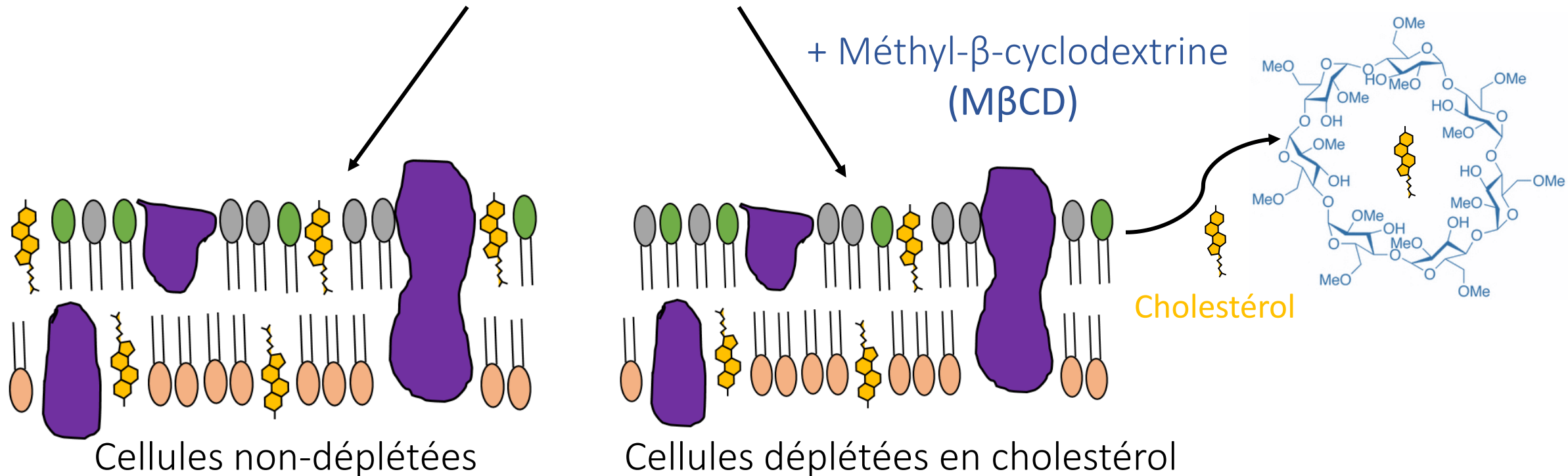


Importance respective du **cholestérol** et de la **sphingomyéline** pour l'activité apoptotique du Rh2 ?

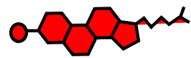


Importance du cholestérol ? - approche

Cellules leucémiques humaines (U937)



+ Ginsenoside Rh2



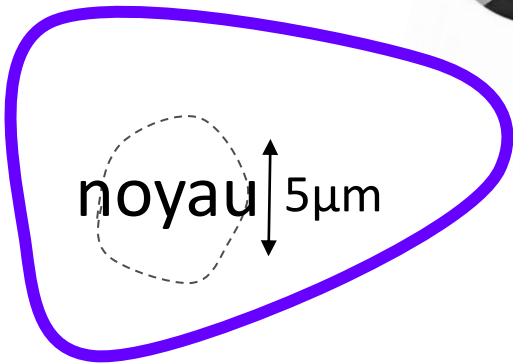
Mesure de l'apoptose

Comment ?

Mesure de l'apoptose - approche

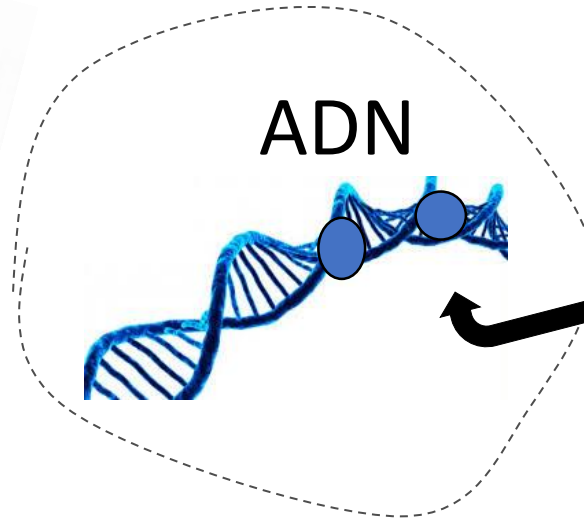
Cellule

10 μ m



noyau 5 μ m

Noyau

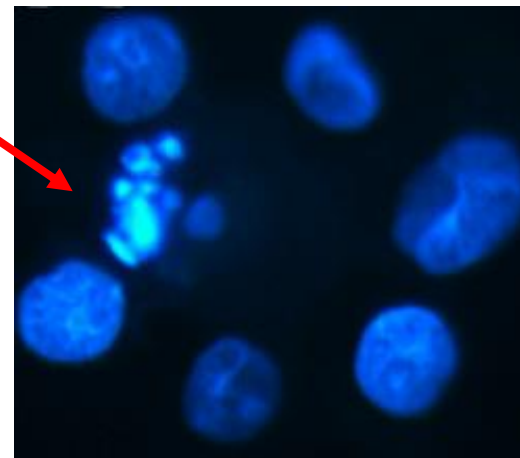


ADN

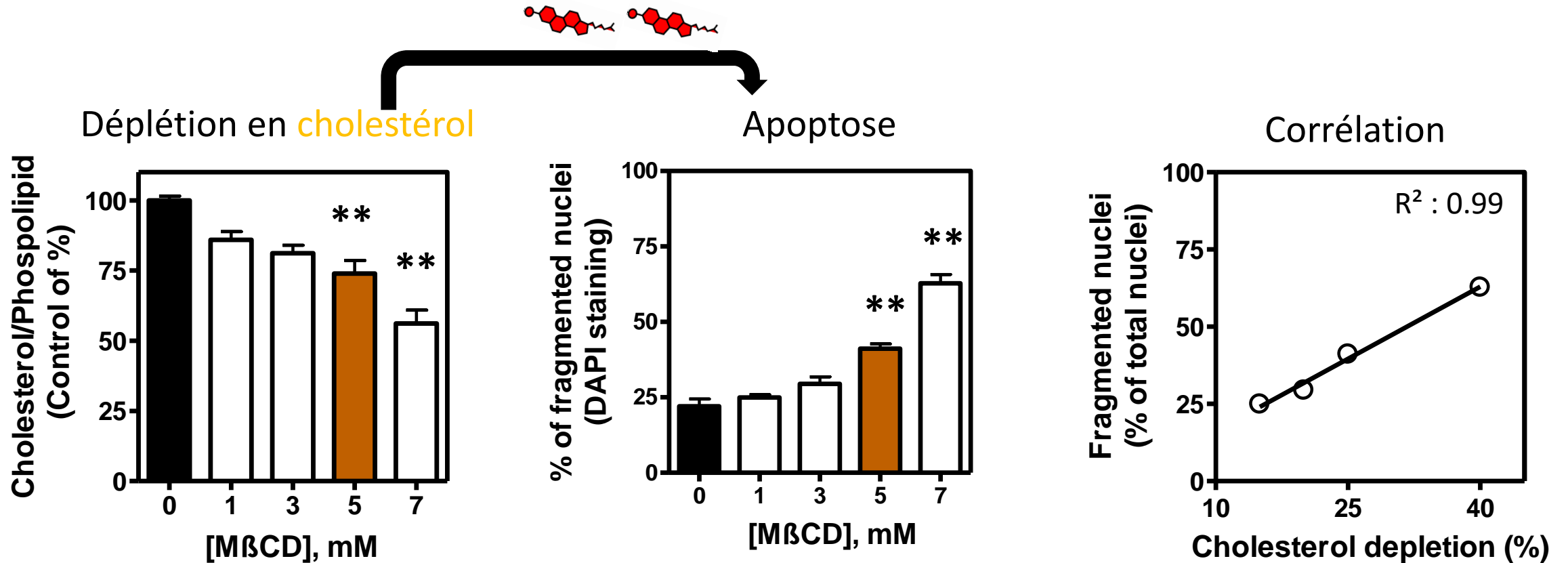
DAPI

Cellule en apoptose
avec noyau fragmenté

Cellule normale



Importance du cholestérol dans l'apoptose induite par le Rh2

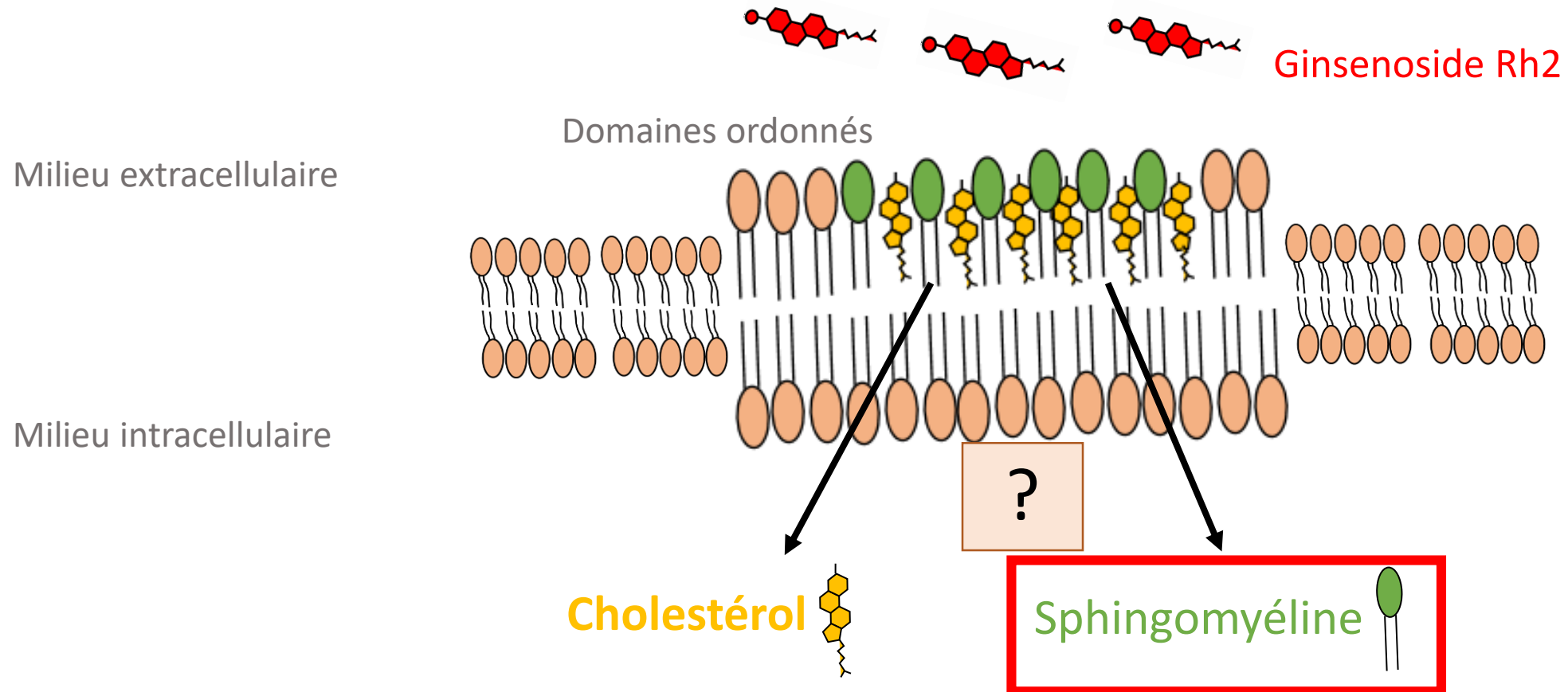


One way ANOVA with Dunnett's post test

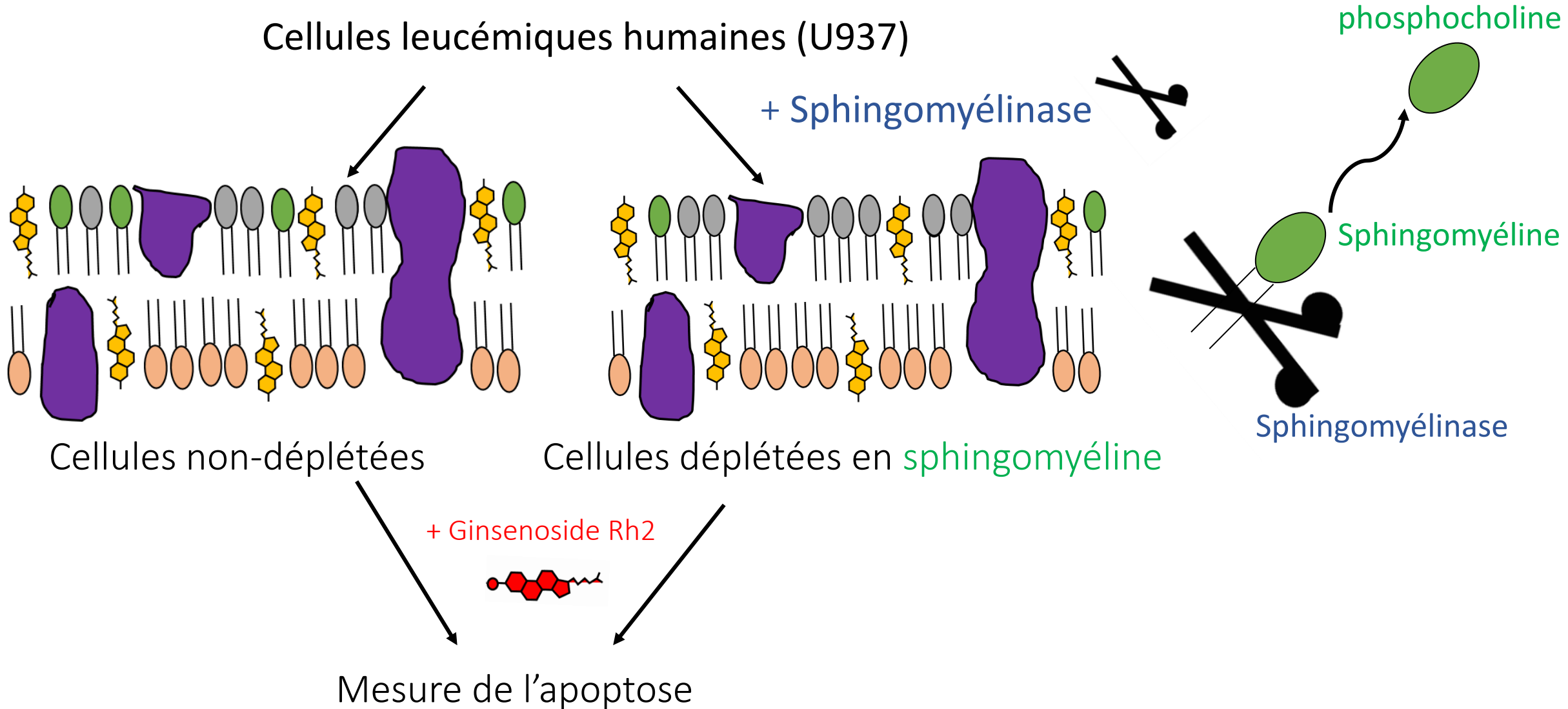
** , $p < 0.01$

➤ ↓ **cholestérol** corrèle avec une ↑ apoptose induite par le Rh2

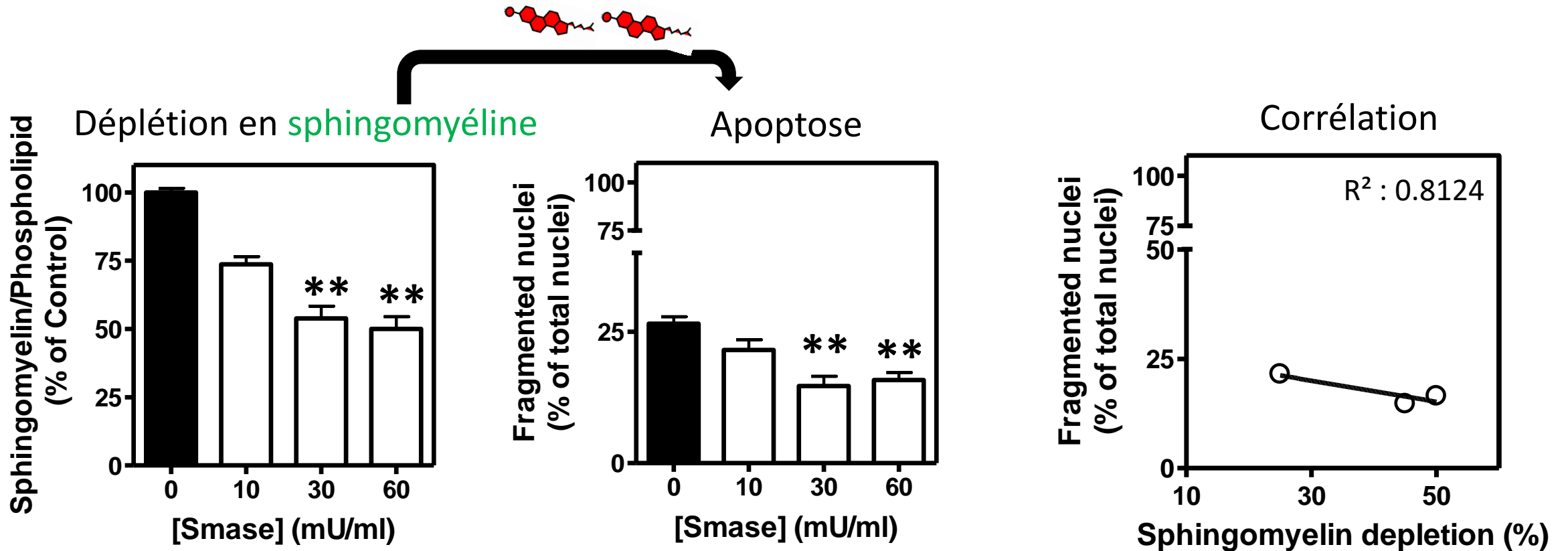
Importance respective du **cholestérol** et de la **sphingomyéline** pour l'activité apoptotique du Rh2 ?



Importance de la sphingomyéline ? - approche



Importance de la sphingomyéline dans l'apoptose induite par le Rh2

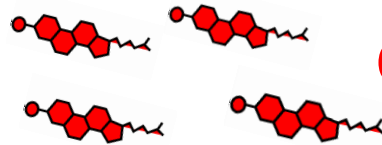


One way ANOVA with Dunnett's post test
**, $p < 0.01$

➤ ↓ sphingomyéline membranaire corrèle avec une ↓ apoptose induite par le Rh2

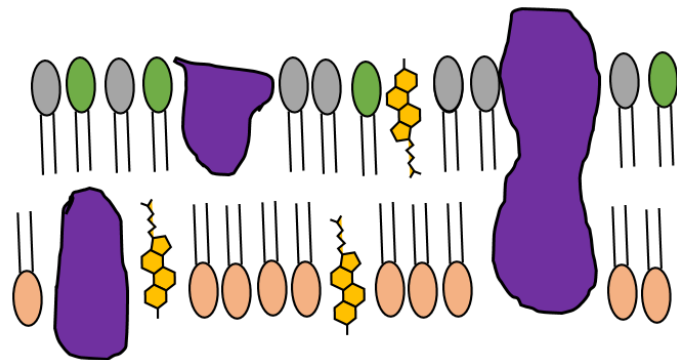
Activité apoptotique du Rh2 – conclusion intermédiaire

- Contrairement à une déplétion en **cholestérol**, la déplétion en **sphingomyéline** réduit l'apoptose induite par le Rh2

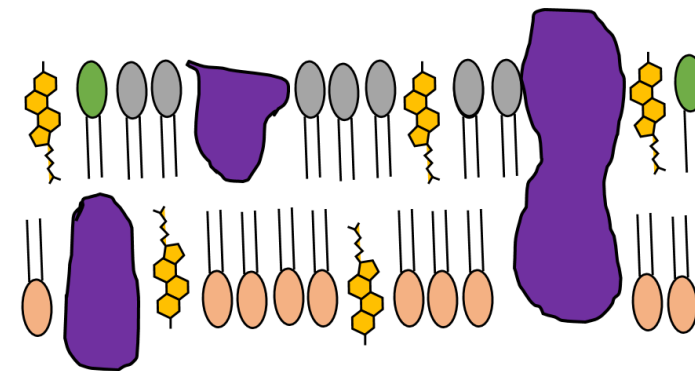


Ginsenoside Rh2

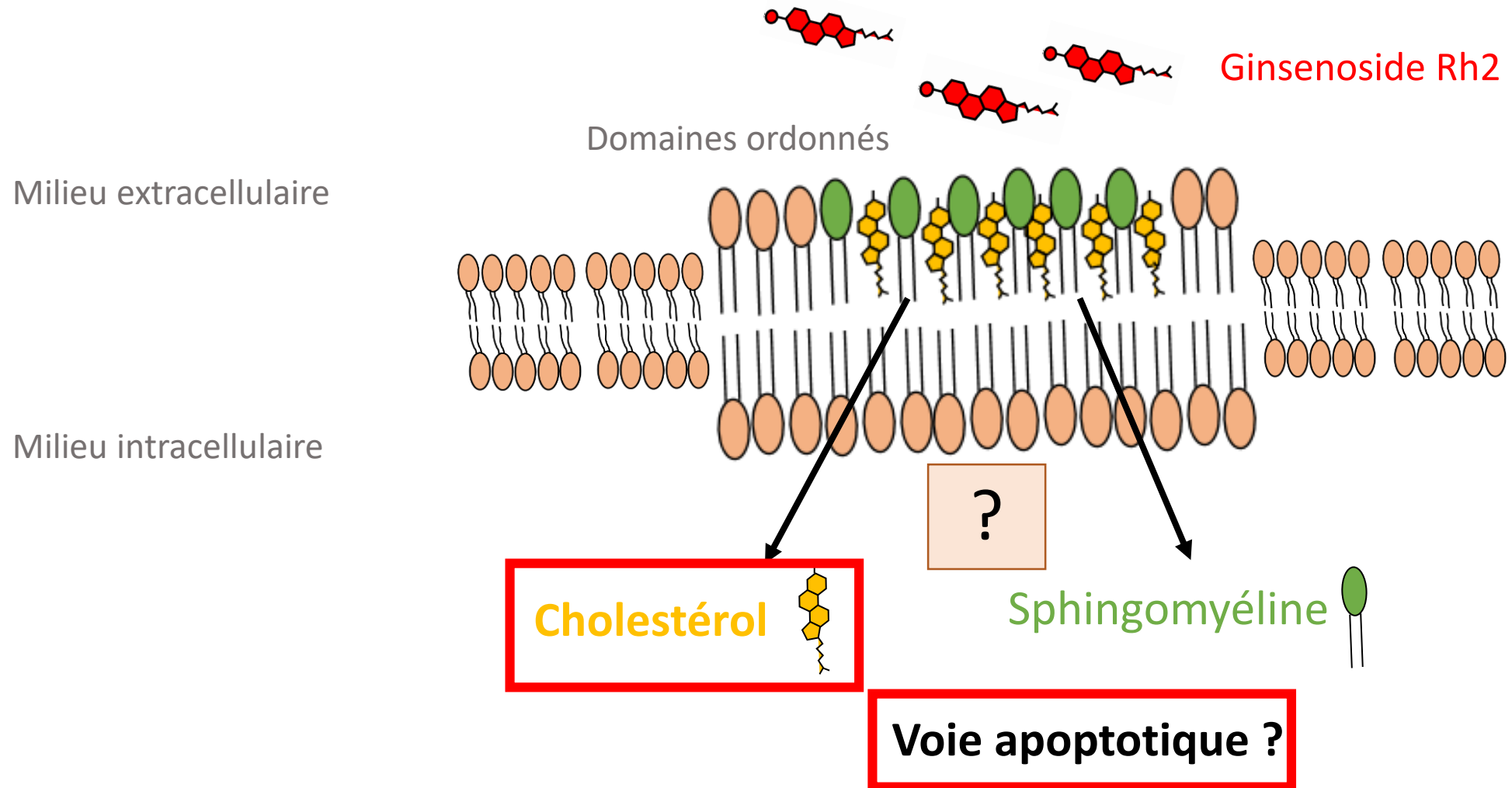
↓ **Cholestérol**  : ↑ Apoptose



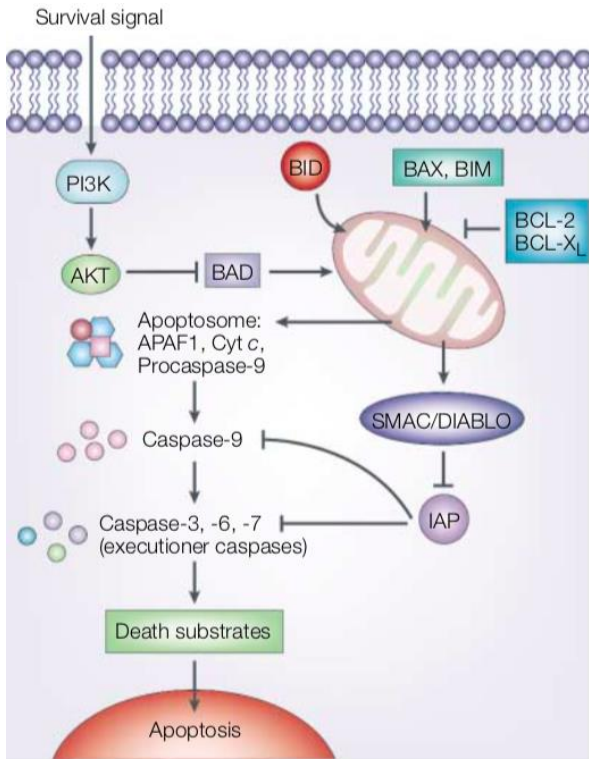
↓ **Sphingomyéline**  : ↓ Apoptose



Importance respective du **cholestérol** et de la **sphingomyéline** pour l'activité apoptotique du Rh2 ?

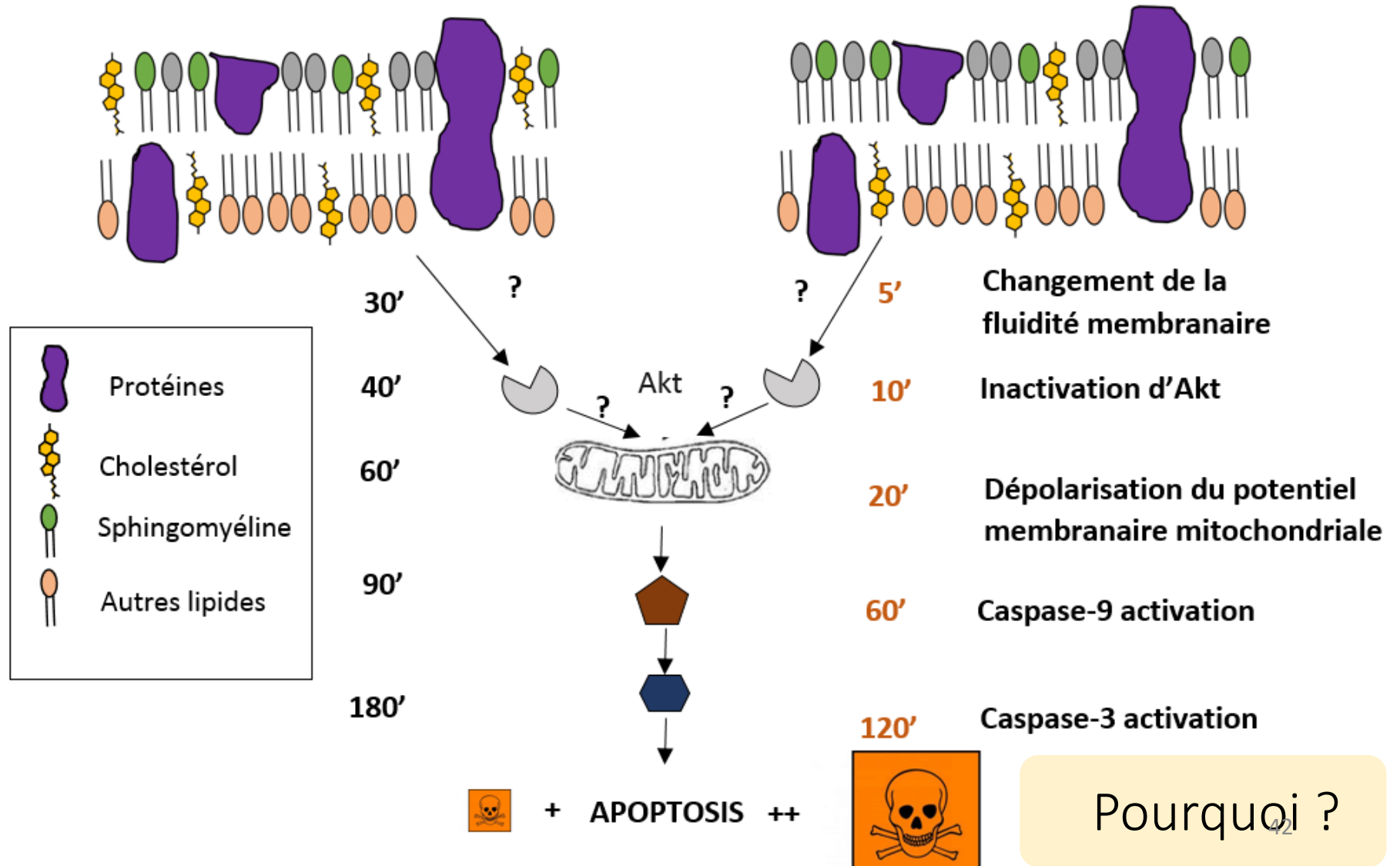


Influence du contenu en cholestérol sur la cinétique de la voie apoptotique intrinsèque induite par le Rh2

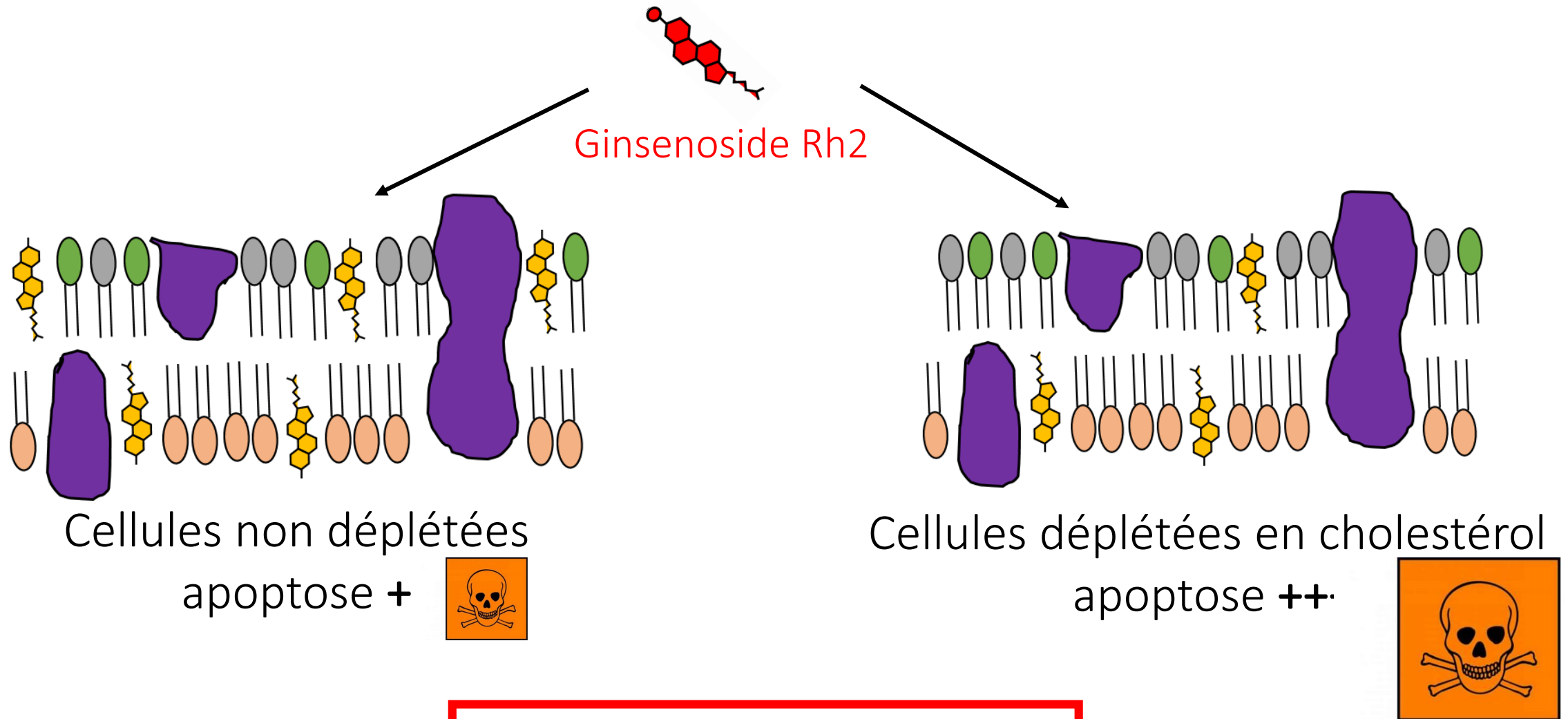


Cellules non-déplétées

Cellules déplétées en cholestérol



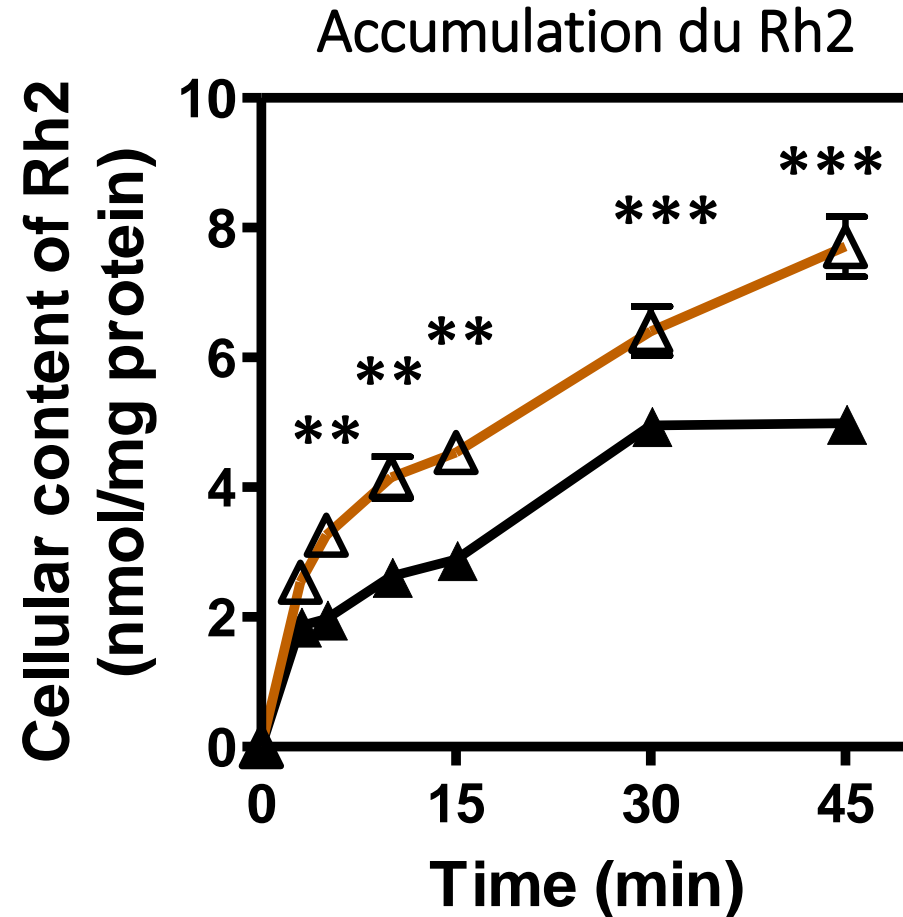
Influence du contenu en cholestérol sur l'accumulation cellulaire du Rh2



Contenu cellulaire du Rh2 ?

Influence du contenu en cholestérol sur l'accumulation cellulaire du Rh2

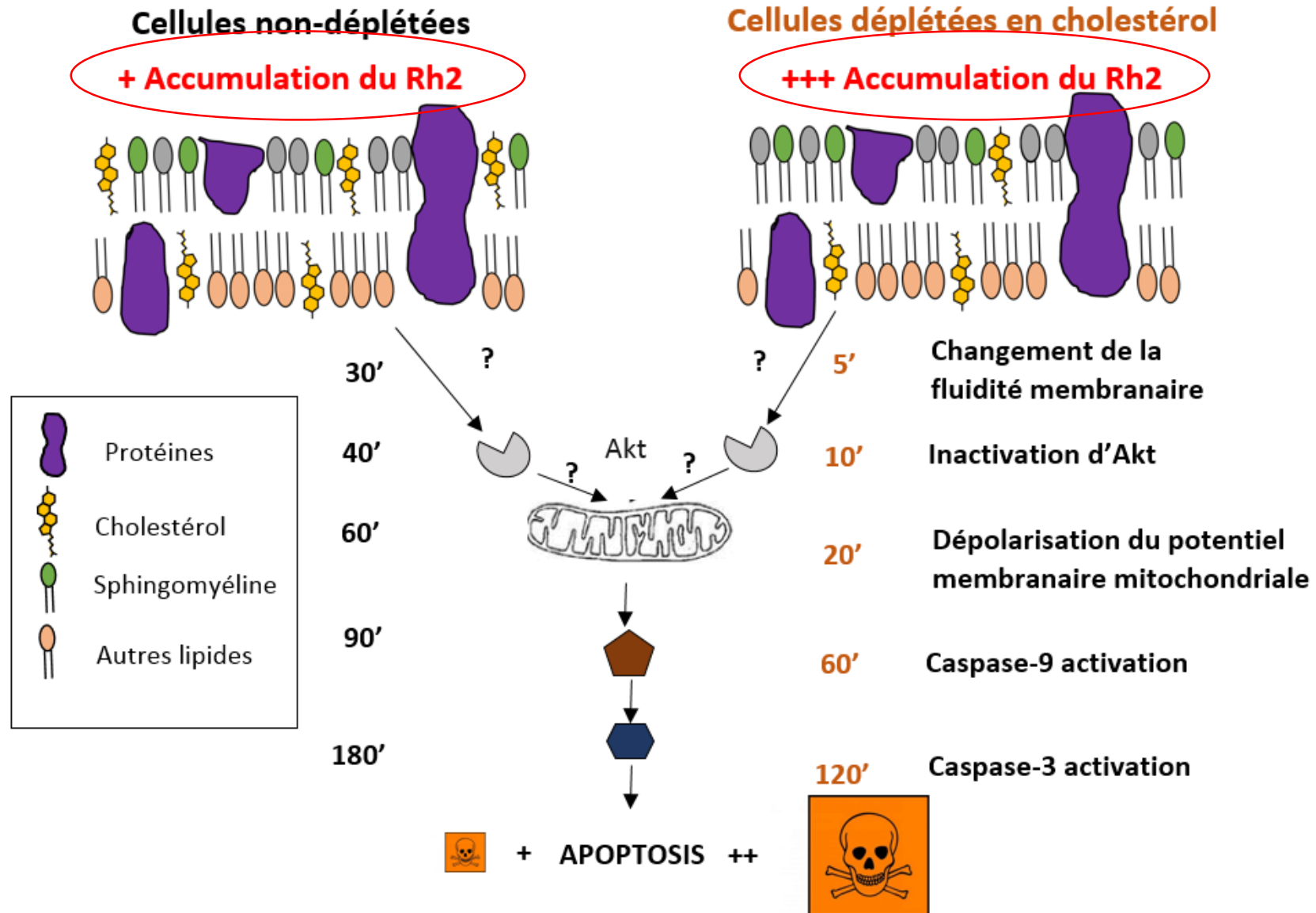
HPLC MS/MS
Coll. G. Muccioli &
A. Paquot
(UCL, BPBL)



Two-way ANOVA with
Bonferroni post-tests
** $p < 0.01$
*** $p < 0.001$

- L'accumulation cellulaire du Rh2 est plus élevée dans les cellules déplétées en cholestérol vs non-déplétées

L'accumulation plus importante du Rh2 dans les cellules déplétées en cholestérol pourrait expliquer une apoptose plus rapide

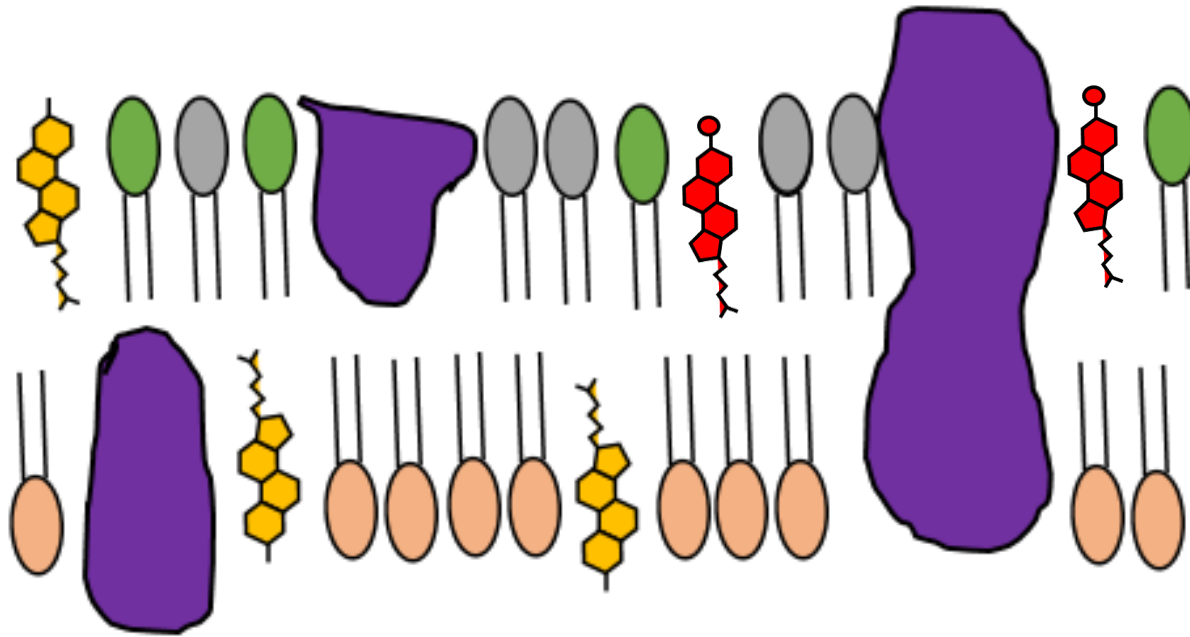


Activité apoptotique du Rh2 - observations principales

- Contrairement à une déplétion en **cholestérol**, la déplétion en **sphingomyéline** réduit l'apoptose induite par le Rh2
- Le Rh2 induit une déphosphorylation de l'Akt et l'activation de la voie apoptotique intrinsèque
- L'accumulation plus importante du Rh2 dans les cellules déplétées en cholestérol pourrait expliquer une apoptose plus rapide

➔ Verstraeten SL et al, Toxicology and Applied Pharmacology, 2018

Le Rh2 pourrait-il s'insérer plus facilement dans les membranes déplétées en cholestérol en prenant la place du **cholestérol** et en interagissant plus facilement avec la **sphingomyéline**?

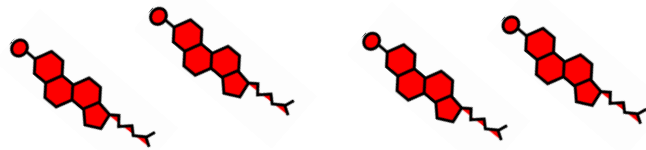


Perspectives à court terme

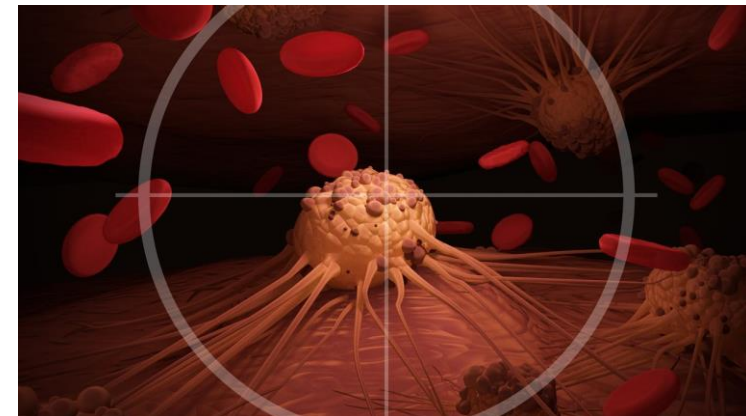
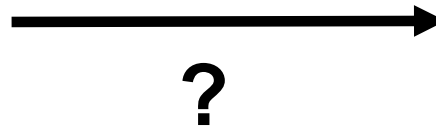
- Etude de l'influence d'autres lipides membranaires
- Détermination de la localisation (intra)cellulaire du Rh2
- Caractérisation de l'activation ou inactivation d'autres voies/protéines liées à la membrane plasmique

Perspectives à long terme

- Le Rh2, une molécule potentiellement intéressante dans le traitement de certains types de cancer?
 - Etape 1: Composition lipidique membranaire des cellules cancéreuses ?
 - Etape 2: Implication potentielle de certains lipides membranaires pour la déformation cellulaire, mécanisme essentiel pour les métastases ?
 - Etape 3: Interaction du Rh2 avec la membrane plasmique & effet sur la déformation durant l'invasion cellulaire ?



Ginsenoside Rh2



Métastase

A fluorescence microscopy image showing a complex network of biological structures. The image is dominated by green and red signals against a dark background. The green signal forms a dense, interconnected web of fine fibers and larger, irregularly shaped structures. The red signal highlights specific components, appearing as thin, branching lines and small, bright spots. The overall appearance is that of a highly organized, porous network, possibly representing a tissue or a specific cellular component.

Merci !