HAL
open science

Hétérogénéité des membranes lipidiques et propriétés mécaniques : des bicouches modèles aux membranes des globules gras du lait

Oumaima Et Thakafy

To cite this version:

Oumaima Et Thakafy. Hétérogénéité des membranes lipidiques et propriétés mécaniques : des bicouches modèles aux membranes des globules gras du lait. Alimentation et Nutrition. Agrocampus Ouest, 2017. Français. NNT : 2017NSARB299 . tel-01814738

HAL Id: tel-01814738

https://theses.hal.science/tel-01814738v1

Submitted on 13 Jun 2018

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.

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

AGRO
CAMPUS
OUEST

Oumaima ET-THAKAFY • 25 octobre 2017

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Sciences des aliments

ÉCOLE DOCTORALE • Écologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation (EGAAL)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA-AO Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO)

Hétérogénéité des membranes lipidiques et propriétés mécaniques : des bicouches modèles aux membranes des globules gras du lait

Thomas.CROGUENNEC
Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UMR STLO / *Président*

Fernando LEAL-CALDERON
Professeur, directeur de l'ENSCBP, Bordeaux / *Rapporteur*

Karim EL-KIRAT
Professeur, UTC, Compiègne / *Rapporteur*

Grégory FRANCIUS
Chargé de recherche, CNRS, Nancy / *Examinateur*

Joëlle LEONIL
Directrice de recherche, UMR STLO / *Directrice de thèse*

Christelle LOPEZ
Chargée de recherche, UMR STLO / *Co-directrice de thèse*

Fanny GUYOMARC'H
Ingénieure de recherche, UMR STLO / *Membre invitée*

Nicolas DELORME
Professeur, Le Mans Université / *Membre invité*

THÈSE/AGROCAMPUS OUEST

Sous le sceau de l'université Européenne de Bretagne

Pour le grade

Docteur de l'AGROCAMPUS OUEST

Mention : biophysique

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Et-thakafy Oumaima

Préparée à l'unité mixte de recherche

Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (UMR 1253 STLO)

UFR Sciences de la vie et de l'environnement

Hétérogénéité des membranes lipidiques et propriétés mécaniques : *Des bicouches modèles aux membranes des globules gras du lait*

Membre de jury :

Fernando LEAL-CALDERON
Professeur, directeur de l'ENSCBP, Bordeaux /Rapporteur
Karim EL-KIRAT
Professeur, UTC, Compiègne/Rapporteur
Grégory FRANCIUS
Chargé de recherche, CNRS, Nancy/Examinateur
Thomas.CROGUENNEC
Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO STLO, Rennes/Président
Joëlle LEONIL
Directrice de recherche, UMR INRA-AO STLO, Rennes/Directrice de thèse
Christelle LOPEZ
Chargée de recherche, UMR INRA-AO STLO, Rennes/Co-directrice de thèse
Fanny GUYOMARC'H
Ingénieur de recherche, UMR INRA-AO STLO, Rennes/Membre invité
Nicolas DELORME
Professeur, Le Mans Université, /Membre invité

Remerciements

A l'issue de cette rédaction, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Il est certain que je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes.

En premier lieu, je souhaiterais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de thèse Joëlle Léonil, qui malgré ses nombreuses occupations, a accepté d'en prendre la direction et d'assurer son bon déroulement. Ces remerciements sont aussi adressés à ma co-directrice Christelle Lopez et ma co-encadrante Fanny Guyomarc'h pour leur patience, leur rigueur scientifique et le partage du savoir. J'ai particulièrement apprécié la confiance qu'elles ont su garder en ma capacité à conduire ce projet à terme. J'adresse un grand merci à Nicolas Delorme pour son appui et son investissement. Je remercie également Cédric Gaillard pour sa disponibilité, sa contribution à la réalisation de ce projet.

Je remercie bien sûr les financeurs de ma thèse, la région Bretagne et l'INRA au travers du département Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture (CEPIA).

Je remercie également les membres de comité de thèse pour le suivi de cette thèse et notamment ma tutrice Gaëlle Boudry.

Un grand merci à toutes les personnes de l'INRA STLO pour leur accueil et leur gentillesse. Merci à l'équipe ISFPL dont je faisais partie et en particulier à Saïd Bouhallab pour son soutien. Enfin, je remercie Joëlle Léonil et Yves Le Loir (ex-directrice et directeur actuel du STLO) de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Merci aux amis que j'ai eu la chance de rencontrer en France et avec lesquels j'ai passé de très bons moments. Je m'abstiens de les nommer tellement la liste est longue. Je nommerai tout de même ma chère amie Houem, mon frère chinois Song, Natayme, Floriane, Rayana, Alexia, Carlos, Fanny, Fillipe….

Mes remerciements les plus chaleureux vont particulièrement à mes parents, à ma sœur et à mes deux frères qui ont cru en moi et m'ont constamment encouragée tout au long de mon parcours universitaire. Un merci d'amour à Amine pour son soutien indéfectible et d'avoir supporté mes mauvaises humeurs, pardonne-moi !

Table des matières

Remerciements **2**

Symboles et abréviations **5**

Introduction générale **8**

Chapitre 1: Synthèse Bibliographique **16**

1.1. Les membranes biologiques 16

1.1.1. Composition et structure des membranes biologiques 16

1.1.2. Propriétés physiques des lipides polaires 20

1.1.3. Séparation de phases des lipides dans les membranes : formation des domaines 23

1.2. Le lait: une émulsion naturelle huile dans eau avec des globules gras recouverts d'une membrane biologique 25

1.2.1. Les globules gras du lait 25

1.2.2. La membrane du globule gras du lait (MFGM) 27

1.2.3. Les lipides polaires laitiers : ingrédients fonctionnels 35

1.3. Propriétés élastiques des membranes 37

1.3.1. Aspects théoriques de la mécanique de la membrane lipidique 37

1.3.2. Mesure expérimentale des propriétés élastiques des membranes : 42

Chapitre 2: Objectifs et stratégie **54**

2.1. Question de recherche 54

2.2. Objectifs et Stratégie 54

Chapitre 3: Matériels et méthodes **58**

3.1. Matériels 58

3.1.1. Laits 58

3.1.2. Lipides polaires 58

3.1.3. Autres matériels 61

3.2. Méthodes expérimentales 63

3.2.1. Formation des bicouches lipidiques 63

3.2.2. Méthodes de caractérisation 66

Chapitre 4: Quel est l'effet de la température et du temps sur la dynamique de la structure des domaines dans la membrane du globule gras du lait ? **88**

4.1. Introduction 88

4.2. Article 1 : Domaines lipidiques dans la membrane des globules gras du lait: étude de la dynamique in situ dans le lait en fonction de la température et du temps 90

4.3. Bilan du chapitre 4 et perspectives 103

Chapitre 5: Travaux préliminaires à la caractérisation des propriétés mécaniques des membranes lipidiques **105**

5.1. Introduction et objectifs 105

5.2. Stratégie 105
5.3. Conditions expérimentales pour la fabrication de vésicules 107
5.3.1. Sélection de la phase aqueuse pour l'obtention de vésicules individualisées 107
5.3.2. Sélection de la composition lipidique pour visualiser une séparation de phases 111
5.3.3. Diamètre et unilamellarité des vésicules 120
5.4. Conditions expérimentales pour l'immobilisation des vésicules sur un support pour l'indentation par AFM 121
5.5. Conclusions 125
Chapitre 6: Quelle est l'hétérogénéité d'élasticité générée par la coexistence et le type de phases dans un modèle de la membrane du globule gras du lait ? 127
6.1. Introduction 127
6.2. Article 2: Élasticités des membranes de milk SM dans une phase liquide ordonné, gel ou fluide: investigation de l'effet de la température en absence ou présence du cholestérol 129
6.3. Bilan du chapitre 6 et perspectives 154
Chapitre 7: Comment l'état de phase des phospholipides (gel vs fluide) et l'hétérogénéité de composition de milk SM affectent les propriétés élastiques des membranes ? 156
7.1. Introduction 156
7.2. Article 3: Propriétés élastiques des membranes composées de phospholipides laitiers en phase gel ou en phase fluide: indentation de liposomes par AFM 158
7.3. Article 4: Propriétés élastiques de bicouches de sphingomyéline du lait (milk SM) en phase gel: effets de l'hétérogénéité de la composition naturelle en longueur et saturation des chaînes acyles, étudiée par indentation de liposomes par AFM 169
7.4. Bilan du chapitre 7 et perspectives 201
Chapitre 8: Existe-t-il une hétérogénéité mécanique sur la surface du globule gras natif en lien avec la composition et la présence des domaines ? 206
8.1. Introduction 206
8.2. Méthodes expérimentales 208
8.2.1. Matériels 208
8.2.2. Couplage AFM /Fluorescence 208
8.3. Résultats et discussion 210
8.4. Conclusion 218
Conclusion générale et perspectives 221
Référence 226
Liste des tableaux 243
Liste des figures 244
Annexe 254

Symboles et abréviations

AFM Microscopie à force atomique (*atomic force microscopy*)

Chol Cholestérol

CLSM Microscopie confocale à balayage laser (*confocal laser scanning microscopy*)

DPPC 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

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

DLS Diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scatter*ing)

DIC Contraste interférentiel différentiel (*differential interference contrast*)

DSC Calorimétrie différentielle à balayage (*di erential scanning calorimetry*)

GUV Liposome unilamellaire géant (*giant unilamellar vesicle*)

LUV Liposome unilamellaire de grande taille (*large unilamellar vesicle*)

MFGM Membrane du globule gras du lait (*milk fat globule membrane*)

MLV Vésicule multi lamellaire (*multilamellar vesicle*)

PC Phosphatidylcholine

PE Phosphatidylethanolamine

PS Phosphatidylserine

PI Phosphatidylinositol

SM Sphingomyéline

SUV Small unilamellar vesicles

SLB Bicouche de lipide supportée (*supported lipid bilayer*)

TEM Microscopie électronique en transmission (*transmission electron microscopy*)

TAG Triacylglycérols

XRD Diffraction de rayons X (*X ray di raction*)

H Hauteur (*height*)

W Largeur (*width*)

D_h Diamètre hydrodynamique (*hydrodynamic diameter*)

d	Epaisseur de la membrane
δ	Distance d'indentation
R_c	Rayon de courbure
R_{tip}	Rayon de la pointe AFM
E	Module de Young/ Elasticité
k_C	Rigidité de courbure
Tm	Température de fusion (*melting temperature*)
Ld	Liquide désordonné (*liquid desordred*)
Lo	Liquide ordonné (*liquid ordred*)
L_α	Fluide
L_β	Gel
$L_{\beta'}$	Ripple/gel tilté
s_o	Solide ordonné (*solid-ordered*)
λ	Longueur d'onde
q	Vecteur d'onde
ν	Coefficient de Poisson

Remarque : Dans ce manuscit, nous avons opté pour une annotation anglaise des valeurs.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Le lait est un liquide physiologique sécrété par les femelles mammifères pour nourrir leur nouveau-né. Il représente aussi un élément essentiel dans l'alimentation quotidienne de nombreuses populations humaines à différents âges. Le lait est généralement considéré comme un aliment complet du point de vue nutritionnel, en particulier pour le petit allaité dont il constitue l'alimentation exclusive. Il est riche en eau, en protéines, en matières grasses, en sucres mais aussi en vitamines et minéraux comme le calcium. Du point de vue structural, le lait est une émulsion naturelle de type huile dans eau comprenant une phase aqueuse dans laquelle la phase grasse est dispersée sous forme de gouttelettes appelées globules gras. La phase aqueuse présente un pH de 6.7. On retrouve dans cette phase des éléments dissous comme les sels, le lactose ou les protéines, et d'autres à l'état de suspension colloïdale comme les micelles de caséines. La composition globale du lait est relativement bien connue et a été décrite dans plusieurs ouvrages (Alais and Linden, 1997; Jensen and Newburg, 1995; MacGibbon and Taylor, 2006; Mulder and Walstra, 1974; Walstra et al., 2006; Walstra and Jenness, 1984). Sa composition globale est présentée en Figure 1. Cette composition peut varier finement en fonction de facteurs tels que : la race pour les animaux de rente, le stade de lactation, l'alimentation, l'environnement, etc... Le lait de vache reste le lait le plus consommé et le plus répandu au niveau mondial (85% en volume), et donc le plus étudié.

La France produit chaque année plus de 24 milliards de litres de lait ce qui fait de la filière laitière l'un des secteurs les plus actifs de l'agroalimentaire et dont le chiffre d'affaires dépasse 20 milliards d'euros (31.9 milliards € en 2014). En France, le lait de vache représente 97% du lait collecté en volume. Il vient ensuite, par ordre d'importance, le lait de chèvre et de brebis (données CNIEL-AFIL 2016). Les élevages laitiers sont présents sur l'ensemble du territoire français mais l'exploitation est la plus importante dans le Grand Ouest de la France. La Bretagne est la première région productrice de lait en France et près d'un tiers des vaches laitières françaises y sont élevées, ce qui explique l'implantation de presque tous les grands groupes laitiers. Le lait collecté est utilisé à environ 70% (volume) pour fabriquer des produits laitiers de consommation (laits liquides, yaourts, desserts lactés, fromages, beurre, crème…) et à 30 % pour des produits intermédiaires, utilisés dans l'alimentaire, les secteurs pharmaceutiques et chimiques (CNIEL-2015). Comme le montre la Figure 2, la majorité des produits laitiers mis sur le marché est issue d'une transformation technologique. C'est la raison pour laqelle la plupart des industries laitières françaises accordent une grande importance au développement des connaissances sur les différents composants du lait, sur leurs propriétés fonctionnelles et sur les procédés alimentaires afin de satisfaire la demande en termes de qualité et de quantité des produits laitiers.

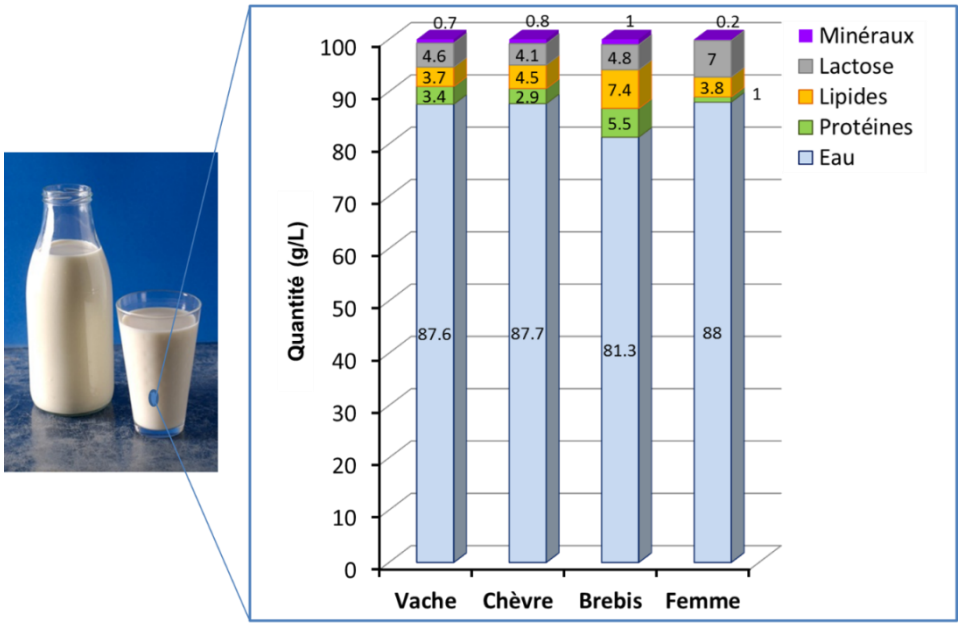


Figure 1: Composition globale du lait de différentes espèces (Jenness et al,,1988; Gómez-Cortés, Viturro, Juárez, & de la Fuente, 2015)

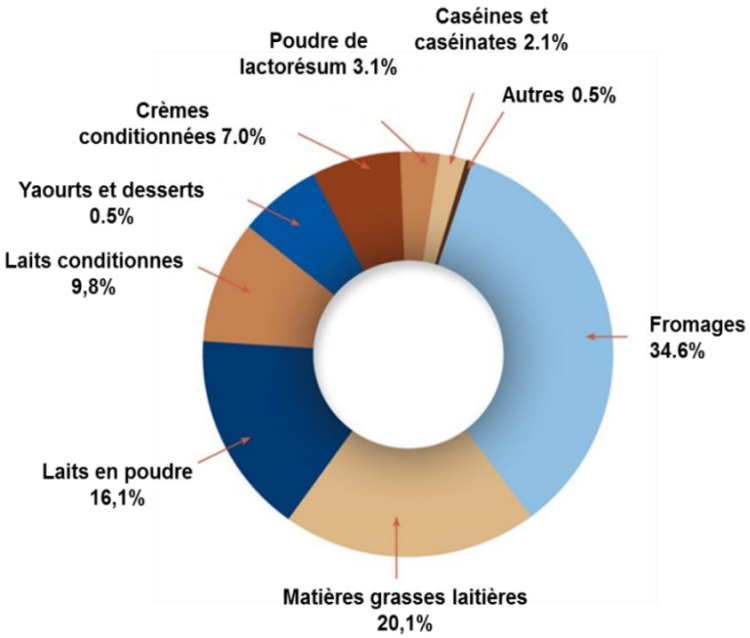


Figure 2: Utilisation du lait pour la fabrication de produits laitiers en France (CNIEL-2015). Les données sont en % de la matière sèche unifiée totale.

Dans l'industrie laitière, de la collecte jusqu'à la commercialisation, le lait passe par de nombreuses étapes de transformation et de stockage. Au cours de ces nombreux procédés alimentaires, les traitements de nature physique sont omniprésents, qu'ils soient thermiques ou mécaniques (Figure 3). Par exemple, lors de la fabrication du beurre, le lait subit une pasteurisation

à 70-75°C afin d'éliminer les microorganismes nuisibles à la santé humaine, puis la crème est séparée de la phase aqueuse par centrifugation et sera par la suite soumise à un fort barattage à basse température pour l'inversion de phase. La majorité des produits laitiers nécessite ainsi plusieurs opérations technologiques impliquant des contraintes mécaniques et des cisaillements, comme le pompage, la centrifugation, l'homogénéisation ou le barattage ; et/ou des contraintes thermiques, comme la pasteurisation, le stockage à froid ou la congélation.
Comme toutes les émulsions, l'émulsion laitière est thermodynamiquement instable en particulier en raison du diamètre micrométrique des globules gras et de leur densité significativement plus faible que celle de la phase aqueuse (Figure 4).

La stabilité physique des globules gras du lait reste un point sensible en technologie laitière car les différents traitements technologiques peuvent l'impacter. Par exemple, l'homogénéisation est utilisée pour améliorer la stabilité des émulsions. Ce traitement physique consiste à réduire la taille des globules gras en fines particules. Ainsi, celles-ci ne remontent pas à la surface, mais se répartissent de façon homogène dans la phase aqueuse du lait. Au contraire, le refroidissement provoque la cristallisation de la matière grasse, peut endommager la membrane entourant le globule gras et altérer sa stabilité physique. La congélation/décongélation, pratiquée pour le stockage des crèmes sur de longues durées, accélère les mécanismes de coalescence des globules gras et par conséquent déstabilise l'émulsion laitière. En résumé, les traitements physiques affectent d'une manière importante la stabilité des émulsions laitières via l'altération de la composition ou/et la structure des globules gras. **La résolution de nombreux problèmes technologiques s'appuiera ainsi sur une meilleure connaissance du globule gras en tant que constituant majeur du lait et des différents facteurs impliqués dans sa stabilité.**

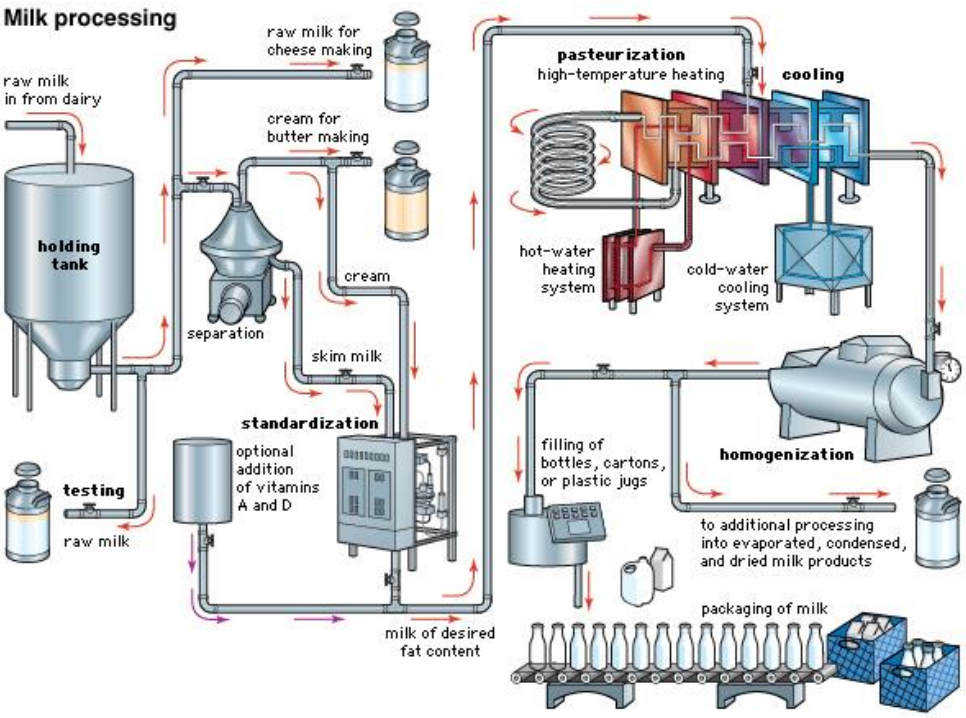


Figure 3 : Procédés technologiques utilisés en industrie laitière. Exemple de la fabrication de lait pasteurisé standardisé. (http://marcustech.in/index.php/milk-processing-flow-chart/)

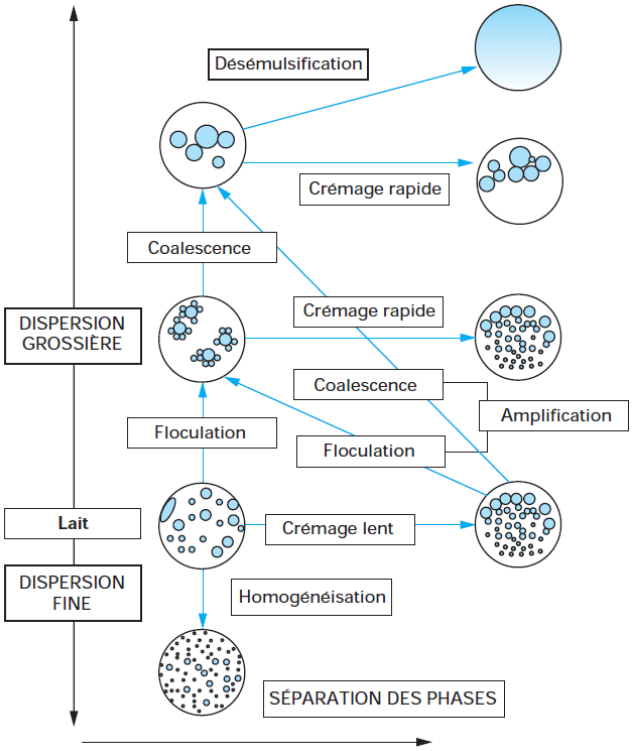


Figure 4: Les mécanismes d'instabilité des émulsions laitières (phase aqueuse en blanc, phase grasse en bleu) (http://www.techniques-ingenieur.fr/matiere-grasse-laitiere,2006).

Les globules gras sont constitués par un cœur de triglycérides enveloppé par une membrane biologique appelée la membrane des globules gras du lait (*Milk Fat Globule Membrane*, MFGM).

Cette dernière est riche en lipides polaires et en protéines et se présente sous la forme d'une tricouche : une première monocouche, au contact du cœur de triglycérides, est produite au niveau du réticulum endoplasmique granuleux, tandis qu'une bicouche externe est constituée lors de la sécrétion du globule gras dans la lumière de la glande mammaire (Heid and Keenan, 2005; Keenan et al., 1988a; Keenan and Patton, 1995; Mather, 1978). Ainsi, la bicouche externe du globule gras provient de la membrane plasmique des cellules lactifères (Keenan et al., 1970). Les lipides polaires laitiers sont constitués de phospholipides dont l'état physique change en fonction de la température et qui sont donc caractérisés par une température de transition de phase Tm (pour *melting temperature* ou température de transition gel /fluide). Les lipides polaires insaturés présentent des Tm basses et sont généralement fluides à des températures positives voire légèrement négatives. Les lipides polaires saturés, en particulier la sphingomyéline du lait (milk SM ; 30%wt des lipides polaires laitiers), présentent des Tm dans la gamme des températures ambiantes voire physiologiques. La Tm de la sphingomyéline du lait est par exemple établie aux alentours de 34°C (Murthy et al., 2015). L'état physique de la sphingomyéline du lait est donc susceptible de changer en fonction de la température de sécrétion, de stockage, ou de transformation du lait. L'organisation des lipides polaires du lait dans le plan de la MFGM a longtemps été considérée comme homogène (Dewettinck et al., 2008). Cependant, une hétérogénéité structurale interprétée comme la présence de domaines ordonnés, majoritairement composés de sphingomyéline, dispersés dans une phase continue fluide a été mise en évidence dans la membrane des globules gras, à température ambiante (Lopez et al., 2010). La présence de cette hétérogénéité structurale dans le plan de la membrane, en lien avec sa composition en lipides polaires, pourrait affecter les propriétés mécaniques de la MFGM. Cependant, ces relations restent peu connues ce qui limite la valorisation des lipides polaires et leur bénéfice dans plusieurs applications (encapsulation dans des liposomes, stabilité des émulsions…). En effet, les lipides polaires du lait représentent une source unique de molécules ayant des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles intéressantes.

Dans ce contexte, les travaux de thèse ont pour objectif d'accroître la compréhension des propriétés biophysiques des lipides polaires laitiers, en particulier leur capacité d'organisation et leurs propriétés mécaniques en fonction de leur état physique et de leur composition, en répondant à cette question de recherche principale : **Comment l'organisation des lipides polaires, en lien avec leur composition, module-t-elle les propriétés mécaniques des membranes ?**

Le manuscrit de thèse est présenté sous forme de chapitres, qui rendront compte des étapes successives réalisées pour répondre à la question de recherche :

- Le **chapitre 1** fait l'état de l'art des données bibliographiques portant sur la composition et la structure des membranes biologiques, y compris celle des globules gras. Une attention particulière a été donnée aux propriétés physiques des lipides polaires et aux propriétés élastiques des membranes lipidiques. Ce chapitre sera complété par une revue des approches permettant d'évaluer ces propriétés.

- Le **chapitre 2** est focalisé sur la question de recherche, les objectifs et la stratégie adoptée dans la thèse.

- Le **chapitre 3** est consacré à la présentation du matériel et des méthodes expérimentales utilisés. Les différentes techniques physiques utilisées pour caractériser ou mesurer les propriétés structurales, thermotropiques ou mécaniques des membranes seront présentées.

Les chapitres suivants présentent les travaux et les résultats obtenus au cours de la thèse. Ils s'articulent dans une boucle reliant le système réel (le globule gras) et les systèmes modèles (les bicouches lipidiques de composition contrôlée).

- Le **chapitre 4** a pour objectif de répondre à la question suivante : **Quel est l'effet de la température et du temps sur la dynamique de la structure des domaines dans la membrane des globules gras du lait ?** Dans ce chapitre, nous avons exploré *in-situ* dans le lait l'organisation des lipides polaires dans la membrane des globules gras du lait de trois espèces : brebis, chèvre et vache. Les observations ont été réalisées par microscopie confocale en fonction de cinétiques en température et du temps pour mimer la thermodynamique des procédés industriels.

- Dans le **chapitre 5** sont présentés les travaux préliminaires à la caractérisation des propriétés mécaniques des membranes lipidiques. Cette partie du travail a été nécessaire pour mettre en place les différentes conditions expérimentales telles que la composition lipidique des membranes étudiées, la composition de la phase aqueuse ou les types de bicouches modèles (vésicules, bicouches supportées), qui permettront l'investigation mécanique des membranes à l'échelle micro- et nanométrique par AFM.

- Le **chapitre 6** s'attache à répondre à la question suivante : **Quelle est l'hétérogénéité d'élasticité générée par la coexistence et le type de phases dans un modèle de la membrane du globule gras du lait ?** Suite à l'observation d'une séparation de phases à la surface des globules

gras, nous avons utilisé un modèle sans protéines de la MFGM pour mesurer les différences d'élasticité entre les phases fluide, gel et liquide ordonné.

- Le **chapitre 7** répond à la question suivante : **Comment l'état de phase des phospholipides (gel vs fluide) et l'hétérogénéité de composition de la milk SM affectent les propriétés élastiques des membranes?** Dans cette partie de la thèse, nous avons identifié des principaux facteurs déterminant l'élasticité des phases potentiellement présentes sur la membrane du globule gras, à partir de liposomes modèles. Une attention particulière a été apportée à la sphingomyéline du lait, qui est le composant principal des domaines observés sur la surface des globules gras.

- Le **chapitre 8** aborde la question de recherche suivante : **Existe-t-il une hétérogénéité mécanique sur la surface du globule gras natif en lien avec la composition et la présence des domaines ?** Dans le souci d'appliquer nos nouvelles connaissances à l'objet réel, nous avons mis en œuvre la cartographie des propriétés élastiques de globules gras natifs et comparé nos résultats aux grandeurs obtenues sur les membranes modèles.

Enfin, ce travail se termine par une **conclusion générale** et des **perspectives** destinées à proposer de nouvelles voies de poursuite à ce projet de thèse.

Dans cette étude, nous verrons qu'une réponse positive peut être donnée à notre question de recherche principale, mais que la membrane du globule gras recèle encore bien des inconnues, comme le rôle des protéines membranaires sur ses propriétés élastiques.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Synthèse Bibliographique

1.1. Les membranes biologiques

1.1.1. Composition et structure des membranes biologiques

Les membranes biologiques ont une structure complexe composée majoritairement de lipides polaires organisés en bicouche, et de protéines insérées (Figure 5). Leur rôle fondamental est de préserver l'intégrité des cellules et d'isoler leur contenu du milieu extérieur tout en autorisant des échanges transmembranaires. Les membranes sont des systèmes très dynamiques qui interviennent dans plusieurs processus biologiques comme la conversion d'énergie, la transduction signalétique, le transport, etc. La composition chimique d'une membrane est l'élément clé qui assure sa structure ainsi que ses différentes fonctions. Les lipides et les protéines représentent chacun environ 50 % de la masse membranaire mais leurs proportions peuvent varier en fonction de la nature du système biologique. Le premier modèle ayant décrit l'organisation de ces composants au sein d'une membrane a été établi en 1972 par Singer et Nicolson (Singer and Nicolson, 1972). Ce modèle fondateur supposait que la membrane se présente sous forme d'une mosaïque fluide, formée par une bicouche de lipides polaires, dans laquelle les protéines sont distribuées de manière aléatoire et libre (Figure 5A). Le caractére dynamique et fluide des membranes s'explique par l'agencement parallèle des lipides polaires qui leur permet des déplacements intermoléculaires, par diffusion latérale dans le plan de la membrane. Elle s'explique aussi par la grande capacité des lipides polaires à effectuer des mouvements intramoléculaires, en particulier les lipides polaires insaturés. Ce modèle a été ensuite repris et amélioré par d'autres chercheurs afin de mettre en évidence le rôle des lipides qui ne se limite pas à la solubilisation des protéines membranaires. Une évolution importante de ce modèle a été apportée par la proposition du concept de « rafts » ou « radeaux », par Simons et Ikonen (Simons, 2000; Simons et al., 1997)(Figure 5B). Selon ce nouveau modèle, on considère que la distribution des lipides polaires dans le plan de la membrane est hétérogène en raison de l'immiscibilité de lipides polaires présentant des propriétés physico-chimiques et des états de phase différents. Par séparation de phases de lipides à haute température de transition de phase, en particulier les shingolipides en interaction avec le cholestérol, l'organisation latérale des lipides polaires créerait ainsi des radeaux, dispersés au sein d'une phase continue (Simons et al., 1997). Ainsi, la complexité de la nature des lipides et leur organisation peuvent créer une hétérogénéité, ce qui peut être mis en jeu dans plusieurs fonctions biologiques (Glaser, 1993; Jain and White, 1977; Simons and Gerl, 2010; Simons and Ikonen, 1997; Vaz and Almeida, 1993).

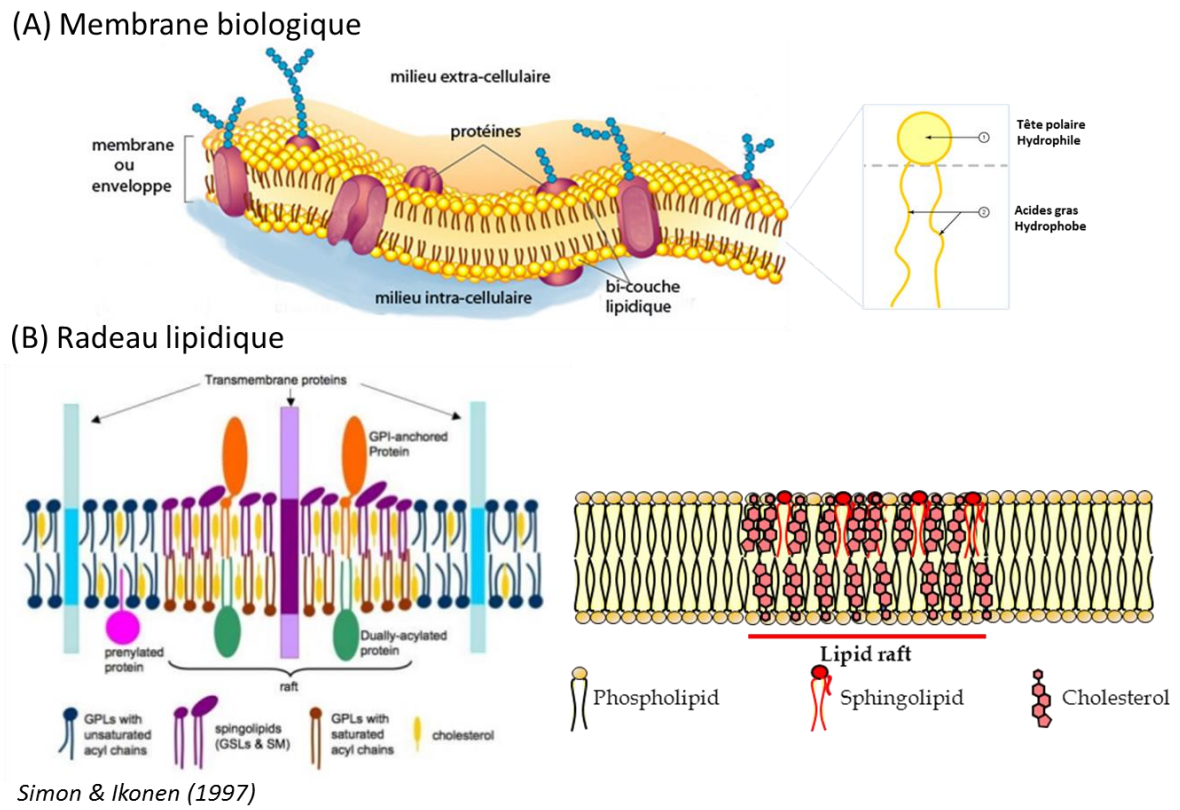


Figure 5 : Représentation schématique de la membrane biologique. La membrane est principalement constituée d'un double feuillet de lipides et de protéines. Les lipides polaires sont composés d'une tête polaire hydrophile liée à des chaines hydrophobes constituées d'acides gras. Image extraite de (http://www.acpfg.com.au/blog/?p=143).

Les lipides polaires sont des molécules amphiphiles composées d'une partie hydrophile constituée par la tête polaire et une partie hydrophobe dans laquelle se trouvent les chaînes hydrocarbonées des acides gras (Figure 5). Cette propriété particulière conduit à un auto-assemblage spontané des molécules en bicouches (de 4 à 8 nm d'épaisseur environ selon les lipides constitutifs) afin de minimiser l'énergie du système et favoriser la stabilité (Robertson, 1959). Les têtes hydrophiles se placent en contact avec le milieu aqueux alors que les chaines hydrophobes se retrouvent arrangées parallèlement au cœur de la membrane. Cet assemblage est maintenu par des forces d'interaction établies sur toute la longueur des molécules, par des interactions de nature stérique, ionique ou d'hydratation au niveau de la tête, et des interactions hydrogènes, de van der Waals et surtout hydrophobes au niveau des chaines. Les lipides polaires peuvent être distingués par leur structure moléculaire, leur charge et leur degré d'insaturation. On retrouve trois classes principales de lipides dans les membranes biologiques : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols.

Les glycérophospholipides constituent la famille de lipides polaires la plus répandue dans les membranes biologiques, particulièrement dans le feuillet interne. Les différentes structures de glycérophospholipides sont représentées dans la Figure 6. Ils sont composés d'une partie hydrophobe définie par deux chaînes hydrocarbonées, les plus fréquentes ayant 16 ou 18 atomes de carbones, et une partie hydrophile représentée par une tête polaire. Leur squelette est à base de glycérol, sur lequel les fonctions alcool des carbones 1 et 2 sont estérifiées par des acides gras, constituant les chaînes hydrocarbonées hydrophobes, dont une est généralement insaturée. La tête polaire est constituée d'un groupement phosphate rattaché sur le carbone 3 du glycérol, et associé par estérification à un groupement alcool déterminant la classe du glycérophospholipide (e.g., choline, éthanolamine, sérine, inositol). Les phosphatidylcholines (PC) restent la classe de phospholipides la plus abondante dans les membranes, représentant plus de 50 % mol des lipides membranaires (van Meer, 2005). Les autres glycerophospholipides sont les phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositiol (PI).

Les sphingolipides (Figure 6) sont des molécules amphiphiles dérivant cette fois d'un amino-alcool à longue chaîne, la base sphingoïde, dont la plus fréquente à l'état naturel est la sphingosine possédant une chaîne hydrocarbonée insaturée à 18 atomes de carbone (C18:1). Plus rarement, on trouve aussi la sphinganine (C18:0) ou des versions à 16 carbones. Cette base peut être liée à un acide gras par une liaison amide pour obtenir une molécule appelée céramide. L'acide gras est le plus souvent saturé à longue chaine (16 à 24 atomes de carbone), ce qui confère aux sphingolipides des propriétés physiques particulières et notamment une température de transition de phase Tm proche de la température physiologique. Le greffage d'un groupement phosphocholine PC sur la fonction alcool forme la sphingomyéline (SM). On trouve généralement la SM dans le feuillet externe des membranes plasmatiques de mammifères (Brown and London, 1998). Les sphingolipides sont impliqués dans la formation des radeaux lipidiques dans les membranes biologiques (Figure 5B). Les sphingomyélines naturelles comme la SM de l'œuf, du lait, du cerveau ou de la couche cornée de la peau contiennent plusieurs espèces moléculaires de sphingomyélines longueurs de chaines et de degré d'insaturation différents.

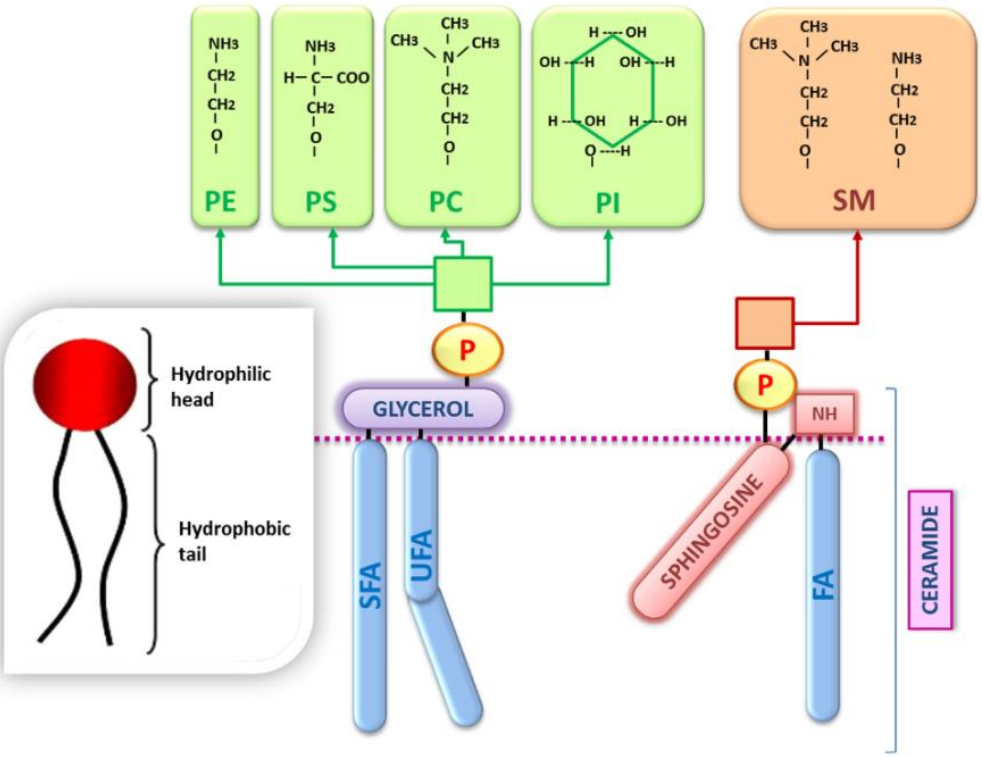


Figure 6: Les structures chimiques des molécules des lipides polaires. Les glycérophospholipides sont composés de deux acides gras saturé ou insaturé (SFA: saturated fatty acid, UFA: unsaturated fatty acid, FA: fatty acids) relié à une tête polaire (PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine) par un glycérol. Les sphingolipides sont caractérisés par la présence d'un seul acide gras (céramide) connecté à une base de sphingosine par une liaison amide NH et à une tête polaire phosphocholine par un groupement phosphate(Castro-Gómez et al., 2015).

De par leur caractère hydrophile, les têtes PC, PE, PI, PS sont sensibles aux conditions de milieu telles que le pH ou la composition en ions. A basse force ionique, les têtes PC ou PE qui sont zwitterioniques, avec le groupement phosphate et un N^+ (pour les PC) ou une amine NH_3^+ (pour les PE) présentent une charge théorique nette proche de zéro sur une large gamme de pH (https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/ionization-constants/). Au contraire, les têtes PS et PI sont nettement électronégatives pour des pH > 2-4. La PS notamment présente un groupement carboxyle en plus du phosphate et de l'amine. La présence de co-ions dans le milieu est susceptible d'écranter les charges présentes à la surface de la bicouche. Ainsi, des têtes PC peuvent devenir électropositives en présence de calcium qui viendra écranter le groupement phosphate (Redondo-Morata et al., 2014; Sinn et al., 2006). L'interaction du calcium avec les bicouches peut également impacter leur densité (aire moléculaire) ou leur épaisseur (Melcrová et al., 2016).

Le cholestérol est le composant majeur des stérols (Figure 7). Il présente un squelette hydrocarboné constitué par quatre cycles plans et rigides. La seule partie polaire est le groupement

hydroxyle ce qui confère à cette molécule un caractère amphiphile. Ceci permet au cholestérol de s'insérer entre les phospholipides de façon à ce que sa partie hydrophile soit en contact avec les têtes polaires, et la partie hydrophobe avec les chaines d'acides gras. Le cholestérol est un élément structurant très important des membranes biologiques.

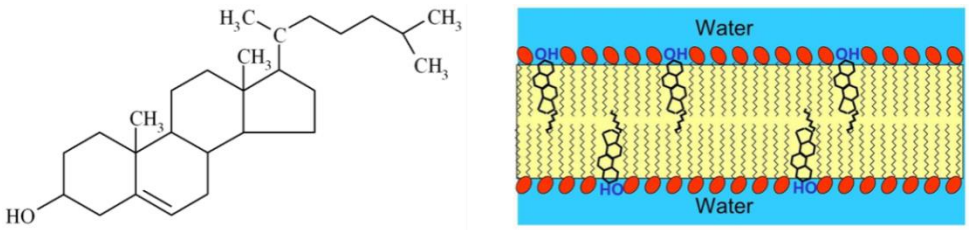


Figure 7: Structure chimique de la molécule cholestérol et son emplacement au sein d'une bicouche lipidique (http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/ph/ph709_basiccellbiology/PH709_BasicCellBIology4.html).

1.1.2. Propriétés physiques des lipides polaires

Chaque lipide est caractérisé par une température de transition de phase appelée température de fusion (melting temperature ; Tm) à laquelle il passe d'un état gel ou solide ordonné (L_β) à un état fluide ou liquide désordonné (L_α). L'état de phase d'une membrane est déterminé par la mobilité des molécules lipidiques et leur degré d'ordre au sein de la bicouche. Une membrane est fluide lorsque la diffusion des molécules est élevée ainsi que leur niveau d'entropie. En phase gel, la diffusion et la mobilité conformationnelle des lipides sont très réduites et les interactions intermoléculaires (hydrophobe, van der Waals, hydrogène) sont favorisées, ce qui réduit l'aire moléculaire et augmente l'ordre. Comme le montre la Figure 5, les chaînes des acides gras sont orientées perpendiculairement au plan de la bicouche (phase gel, L_β), mais elles peuvent être également légèrement inclinées (phase tiltée L_β'). La transition gel(L_β)/fluide (L) est associée à la quantité d'énergie nécessaire pour rompre la haute cohésion moléculaire caractéristique d'un système membranaire dans un état ordonné. La Tm varie en fonction de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acide gras, ainsi que de la nature du groupement polaire (i.e. PC, PE, PI, PS). La température de fusion s'élève avec la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras (Marsh, 2010). Par contre, pour une longueur de chaîne donnée, la température de fusion diminue avec le nombre d'insaturation. La baisse de cette valeur est plus importante pour les isomères *cis* que pour les isomères *trans*, car les doubles liaisons *cis* introduisent une courbure dans la queue hydrophobe du phospholipide, ce qui perturbe l'organisation parallèle des molécules en augmentant l'aire moléculaire et en réduisant la portée des interactions entre molécules voisines.

On donne ici l'exemple de quelques phospholipides ayant la même tête polaire (phosphatidylcholine, PC) mais avec des acides gras différents : DOPC (oleic acid, O ; C18:1n-9), Tm = -22°C ; DMPC (myristic acid, M ; C14:0), Tm = 24°C ; DPPC (palmitic acid, P ; C16:0), Tm = 41°C ; DSPC (stearic acid, S ; 18:0), Tm = 55°C (Epand and Epand, 1980; Fa et al., 2006; Mabrey and Sturtevant, 1976). La Tm peut être déterminée par calorimétrie, fluorescence ou diffraction des rayons X, en conditions hydratées et sur des structures lipidiques organisées. Le meilleur objet étant les vésicules multilamellaires pour augmenter la coopérativité du système et améliorer la précision de la transition.

Avant d'atteindre la phase fluide, certains lipides tels que DPPC (Figure 8) subissent plusieurs types de transition. A basse température, la membrane de DPPC passe d'abord d'une phase très ordonnée où la diffusion transversale est quasi inexistante appelée cristalline (Lc ou L_β), à une phase tiltée moins ordonnée (L_β'). Ensuite, en augmentant la température, la structure de la membrane change de nouveau pour former une phase ondulée (*ripple*) qui correspond à des arrangements périodiques entre phase fluide et phase gel. Cette phase de pré-transition est caractérisée par des ondulations périodiques à la surface de la bicouche. Enfin intervient la transition de phase proprement dite, marquée par la Tm, pour aboutir à une phase totalement désordonnée L .

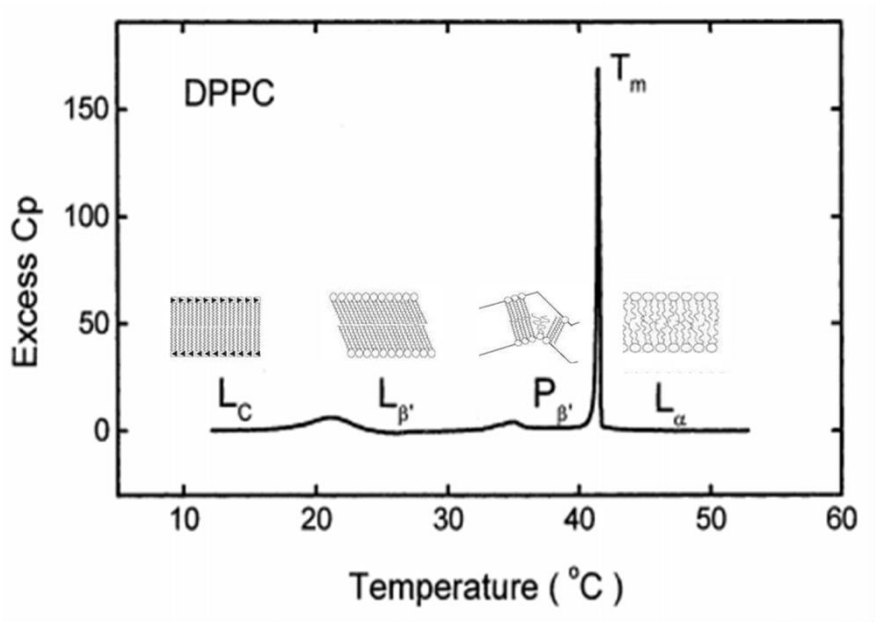


Figure 8: Thermogramme typique de DPPC obtenu par la calorimétrie différentielle à balayage qui exprime l'excès de la capacité calorifique en fonction de la température. L'analyse thermique montre les différentes transitions de phase que DPPC peut subir au cours de chauffage : Une subtransition Lc (liquide cristallin) /$L_{\beta'}$ (gel tilté), et une prétransition $L_{\beta'}$ (gel tilté)/$P_{\beta'}$(ripple), et une transition principale de fusion $P_{\beta'}$(ripple)/L_α (liquide désordonné/fluide) caractérisée par la Tm (Chiu and Prenner, 2011).

L'existence d'un état physique ayant des caractéristiques des deux phases gel et fluide est possible. Par exemple, L'introduction du cholestérol dans une membrane donne naissance à une nouvelle phase appelée « liquide ordonné » (Lo; Figure 9; Carravilla et al., 2015). Le cholestérol « condense » les chaînes hydrocarbonées des phospholipides, c'est-à-dire qu'il contribue à réduire leur aire moléculaire en s'intercalant entre les chaînes et en contribuant aux interactions hydrophobes (Simons and Vaz, 2004). La phase Lo est intermédiaire entre la phase gel et la phase fluide. En effet, l'addition de cholestérol dans une bicouche composée de lipides saturés en phase gel permet de créer des espacements intermoléculaires ce qui aide à fluidifier les membranes tout en gardant un certain degré d'ordre grâce à la condensation. Au contraire, une membrane en phase fluide devient plus ordonnée suite à la réduction de l'aire moléculaire des lipides en présence du cholestérol (Figure 9). Cette structure liquide ordonné Lo n'évolue pas en fonction de la température, ce qui signifie que la présence de cholestérol dans la membrane abolit la transition de phase gel(L_β)/fluide (L)(Chemin et al., 2008).

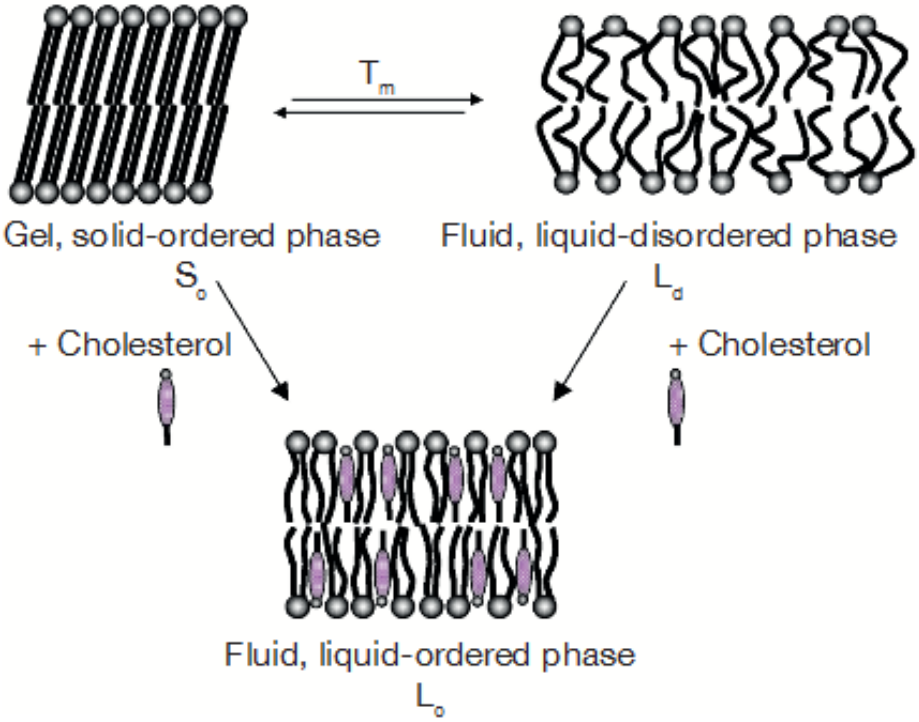


Figure 9: Effet du cholestérol sur l'organisation des lipides en phase gel et fluide. A la température de fusion (Tm), les membranes peuvent changer de phase en passant d'un état solide-ordonnée (S_o), encore appelée phase gel (L_β) à un état liquide-désordonnée (L_α ou L_d) également appelé fluide. En présence de Chol, la membrane indépendamment de son état d'origine, adopte une nouvelle phase appelée liquide-ordonnée (L_o) qui présente à la fois des caractéristiques de la phase fluide (mobilité des lipides) et de la phase gel (ordre) (figure adaptée de Eeman and Deleu, 2010).

1.1.3. Séparation de phases des lipides dans les membranes : formation des domaines

Dans un milieu aqueux, les lipides s'auto-assemblent de manière à minimiser les contacts de leur partie hydrophobe avec l'eau. Cependant, leur arrangement dans une bicouche varie en fonction des conditions extérieures comme la température, le pH, l'hydratation, etc (Marsh, 2012). Dans une bicouche de composition complexe, chaque espèce de lipide polaire présente une Tm distincte, en fonction en particulier de la nature de ses chaînes d'acides gras. A une température T donnée, certains lipides polaires saturés et présentant une Tm > T, peuvent coexister avec des lipides polaires insaturés ayant une Tm < T ce qui crée une coexistence de phases gel et fluide pouvant induire une séparation plus ou moins marquée selon la miscibilité des phases. Cette problématique est posée par exemple lors de variation de la température physiologique (liée à une maladie), lors des opérations de transformation ou de stockage de tissus et fluides biologiques (traitement thermique, réfrigération…). Dans une moindre mesure, la séparation de phases peut être induite lorsque différents types de têtes de lipide polaire présentent une interaction distincte avec le milieu aqueux (hydratation, interactions ioniques). La présence de calcium par exemple peut conduire à une ségrégation de phases mais cette fois-ci induite par la différence des charges des têtes polaires (Figure 10; Binder et al., 2003; Ross et al., 2001).

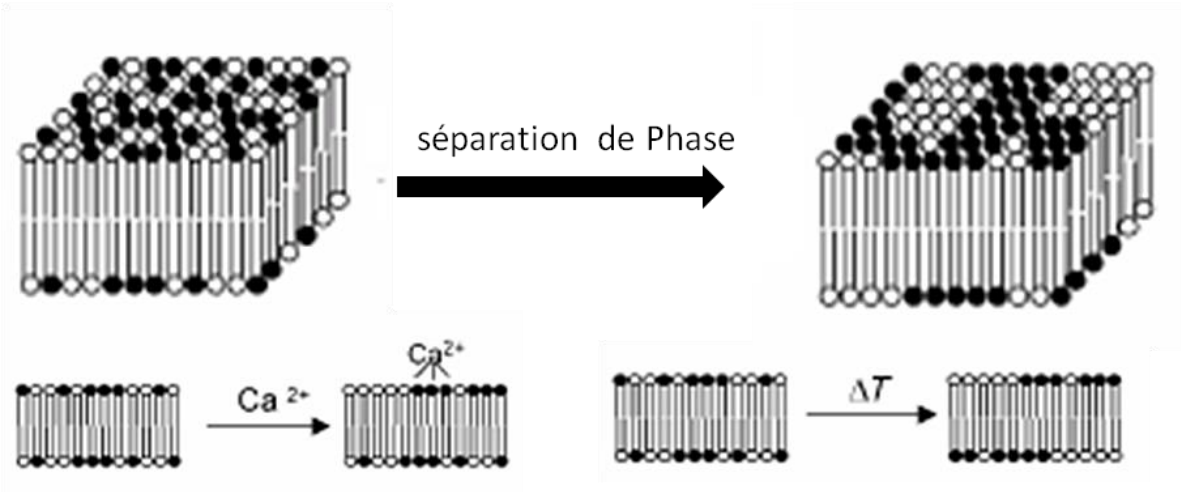


Figure 10: Séparation de phase latérale induite par l'effet de charge (ions) ou l'effet d'état de phase dû à une variation thermique (figure adaptée de Binder et al., 2003).

De nombreux mélanges binaires ou ternaires de lipides ont été étudiés pour déterminer leur organisation en fonction du rapport molaire ou de la température, sous la forme de diagrammes de phases. Des membranes modèles composées de trois types de lipides insaturé/saturé/stérol comme par exemple DOPC/SM/cholestérol ou DOPC/DPPC/cholestérol (Bhatia et al., 2014) ont été généralement utilisées afin de mimer les membranes biologiques. Ainsi, Baumgart et al., (2003)

ont pu visualiser une coexistence de phases grâce à la microscopie à deux photons qui a été interprétée par une ségrégation d'une phase liquide ordonné Lo riche en SM d'œuf (Tm = 35°C) et en cholestérol dans une seconde phase liquide désordonné Ld riche en DOPC (Tm = -20°C). Le diagramme de phases de ce mélange ternaire de lipides montre une grande région de coexistence binaire de Lo et Ld. La construction d'un diagramme de phase permet de prévoir, pour un mélange donné, le comportement physique des lipides, leur miscibilité en fonction de la composition et de la température et la composition théorique des phases. Ces diagrammes sont obtenus par différentes approches : anisotropie de fluorescence (De Almeida et al., 2003; Veatch and Keller, 2003), résonance magnétique nucléaire (Bunge et al., 2008; Filippov et al., 2006; Leung et al., 2007; Veatch, 2007; Veatch et al., 2007), microscopie à force atomique (Connell et al., 2013) ou d'autres techniques comme la calorimétrie ou la diffraction des rayons X (Goñi et al., 2008).

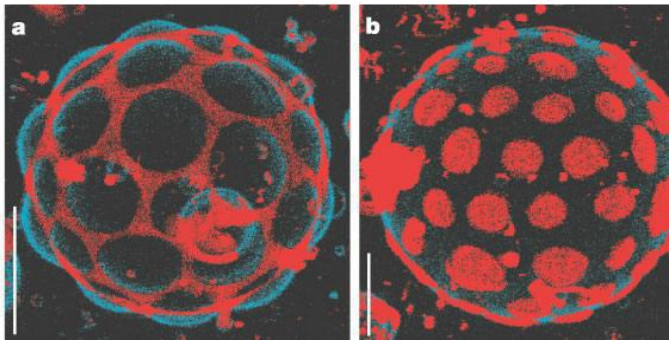


Figure 11: Images de GUV, obtenues par microscopie bi-photonique, composées d'un mélange ternaire de lipide Egg SM/DOPC /Chol une coexistence des phases Lo (bleu) et Ld (rouge) à 25°C. Barre d'échelle est 5 µm (d'après Baumgart et al., 2003).

Dans les membranes biologiques, la formation de « radeaux » ou de domaines lipidiques est généralement interprétée par la séparation de phases des lipides polaires en fonction de leur Tm dans des conditions de température données et des interactions lipides – lipides (e.g. sphingolipides – cholestérol). Quand cette séparation de phase existe, les sphingolipides sont généralement identifiés comme appartenant à la phase ordonnée (gel ou Lo en présence de cholestérol), du fait de leurs chaînes acyl longues et majoritairement saturées (Figure 5). Dans les domaines ordonnés, l'assemblage des sphingolipides est maintenu par des liaisons hydrogène grâce aux fonctions amide et hydroxyle du squelette sphingoide qui peuvent agir à la fois comme donneurs et accepteurs d'hydrogène. En revanche, les glycérophospholipides avec deux groupes carbonyle, ne possèdent que des caractéristiques d'accepteurs de liaisons hydrogènes (Ramstedt and Slotte, 2002). Cependant, certains glycérophospholipides à Tm élevée, comme le DPPC ou le DMPC,

vont également se ségréger en domaines ordonnés s'ils sont en mélange avec des lipides polaires de plus basse Tm et si la température le permet, i.e. T < Tm (Veatch et al., 2007).

Le cholestérol est un composant membranaire important, impliqué dans la constitution des domaines et leur organisation en phase liquide-ordonnée Lo (Figure 9). Les interactions entre le cholestérol et les phospholipides sont très sensibles à la nature du lipide, à la longueur et au degré d'insaturation de ses chaînes acyles. Ainsi, le cholestérol a une plus grande affinité pour les sphingolipides que pour les glycérophospholipides, préférentiellement ayant des chaînes acyl longues et saturées, au détriment des phospholipides à chaînes insaturées et/ou plus courtes, ce qui favorise les SM (Simons and Vaz, 2004; Smaby et al., 1996). De plus, le groupe hydroxyle du cholestérol et le groupement NH des sphingolipides peuvent mettre en place des liaisons hydrogène ce qui favorise cette préférence d'association (Ramstedt and Slotte, 2002; Slotte, 2016). Parmi les glycérophospholipides, le cholestérol s'associe préférentiellement aux PC qui sont plus riches en acides gras saturés, puis aux PS et aux PE. Dans les membranes plasmatiques comme dans les modèles, on suppose alors qu'une grande partie du cholestérol se trouve préférentiellement dans les domaines lipidiques.

1.2. Le lait: une émulsion naturelle huile dans eau avec des globules gras recouverts d'une membrane biologique

1.2.1. Les globules gras du lait

Le lait est un fluide biologique composé de lipides, de protéines, de sucres, de vitamines et de minéraux (Figure 1). D'un point de vue structural, le lait est une émulsion naturelle du type huile dans eau dans laquelle les lipides sont organisés sous la forme de gouttelettes appelées globules gras du lait dispersées au sein d'une phase aqueuse (Figure 12). Dans le lait, on peut trouver de 1.5 à 3.10^{12} globules gras dont la surface estimée est de $160m^2$. /L Leur taille varie entre 0.1 à 20 µm avec un diamètre moyen de 2-5 µm (Huppertz and Kelly, 2006; Lopez et al., 2011; Michalski et al., 2002; Mulder and Walstra, 1974).

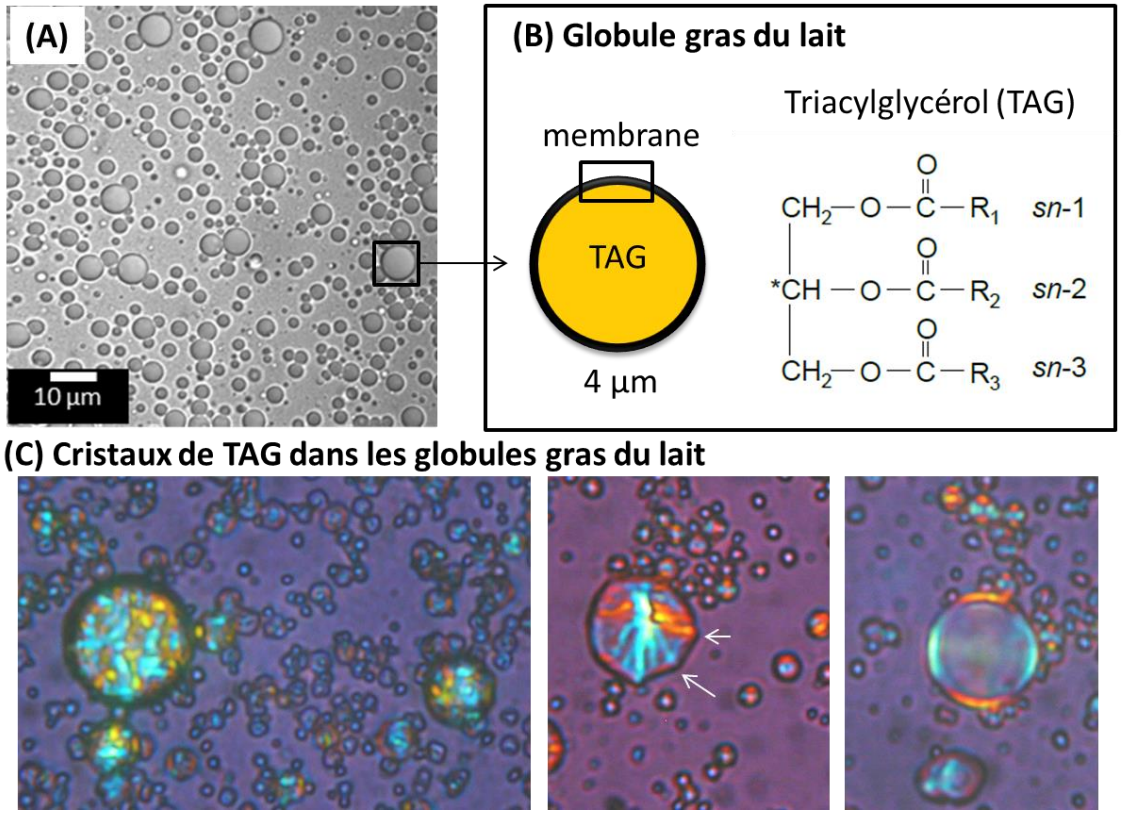


Figure 12: (A) image de microscopie d'un lait montrant les globules gras, (B) schématisation d'un globule gras : cœur de TAG recouvert par une membrane biologique, formule générale d'un triacylglycérol. R1, R2 et R3 représentent des chaînes aliphatiques d'acides gras. * : centre de chiralité. (C) images de microscopie en lumière polarisée montrant les cristaux de TAG dans les globules gras formés à 4°C après un refroidissement rapide (gauche), à vitesse intermédiaire (centre) et lent (droite), (Adapté d'après Lopez, 2011; Lopez et al., 2015).

Parmi les composants importants du lait, les lipides sont les plus variables en proportion et en composition (Lopez et al., 2015, 2011). Les lipides sont constitués d'un cœur de triacylglycérols (TAG) représentant 97-98% de la matière grasse laitière totale, de phospholipides et sphingolipides (0.6%), diglycérides (0.36%), cholestérol (0.31%), d'acides gras (0.027%) et de monoglycérides (0.027%) (Christie and Anne Urwin, 1995; Jensen, 2002; MacGibbon and Taylor, 2006; Mulder and Walstra, 1974). Les TAG sont des triesters d'acides gras sur une molécule de glycérol dont le carbone central est chiral (Figure 12). Les acides gras peuvent varier en longueur de chaine ou en degré d'insaturation. Ainsi, plus de 400 acides gras différents ont été identifiés parmi les lipides du lait. Cette complexité en composition attribue au cœur de TAG des propriétés physiques uniques, en particulier des propriétés de cristallisation (Figure 12C). Les TAG ont la capacité de changer d'état au cours des variations thermiques. La plage de fusion des TAG du lait s'étend de -40 à 40°C. Au cours de la cristallisation, les TAG du lait peuvent adopter différentes formes cristallines thermodynamiquement métastables selon les conditions opératoires et la composition en acides gras (Hagemann, 1988; Ollivon et al., 1992; Wesdorp, 1990). Les cristaux

de TAG peuvent également avoir des tailles et des orientations différentes en fonction des cinétiques thermiques appliquées au lait (Figure 12C).

1.2.2. La membrane du globule gras du lait (MFGM)

La membrane du globule gras est une frontière entre le cœur interne de TAG à caractère hydrophobe et la phase aqueuse du lait (Figure 12B). Malgré sa faible quantité (2 à 6% de la masse totale du globule gras), le rôle de la membrane est primordial dans la stabilité physique des globules et par conséquent dans ses fonctionnalités technologiques et probablement aussi biologiques (Dewettinck et al., 2008; Lopez, 2011; Mather, 2011).

1.2.2.1. Origine de la MFGM

Le processus impliqué dans la formation et la sécrétion des globules gras a attiré l'attention des chercheurs depuis plus de cinquante ans, dans le but de comprendre la structure du globule gras et de sa membrane protectrice (Bargmann and Knoop, 1959; Franke et al., 1981; Heid and Keenan, 2005; Keenan, 2001; Keenan and Patton, 1995; Mather, 1978; Mather and Keenan, 1998; Patton and Jensen, 1975). La formation du globule gras commence lorsqu'une gouttelette de TAG est sécrétée par le réticulum endoplasmique granaire dans le cytoplasme d'une cellule lactogène (Mather and Keenan, 1998; Figure 13). Cette gouttelette s'enveloppe d'une première monocouche composée de phospholipides et de protéines, pour adopter une structure proche d'une gouttelette d'émulsion. Les chaînes hydrophobes des lipides polaires sont alors en contact avec les TAG et leur partie hydrophile avec le milieu aqueux. Cette gouttelette de TAG se dirige ensuite vers la membrane plasmatique apicale de la cellule sécrétrice. Durant ce transit, le globule gras mature et grossit, par coalescence avec d'autres gouttelettes. Au contact de la membrane plasmatique apicale, le globule gras est excrété dans la lumière de l'alvéole sécrétrice, par un mécanisme de bourgeonnement. Suite à cette expulsion, la gouttelette de TAG recouverte d'une première couche de lipides polaires sera donc enveloppée par une bicouche lipidique externe issue de la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales mammaires. Entre la première monocouche et la bicouche externe de lipides polaires, un film de cytosol est emprisonné, pouvant contenir du matériel cytoplasmique. L'ensemble de l'enveloppe est appelé membrane du globule gras du lait (Milk fat globule membrane ; MFGM) et présente une épaisseur d'environ 10-20 nm (Walstra, 1999).

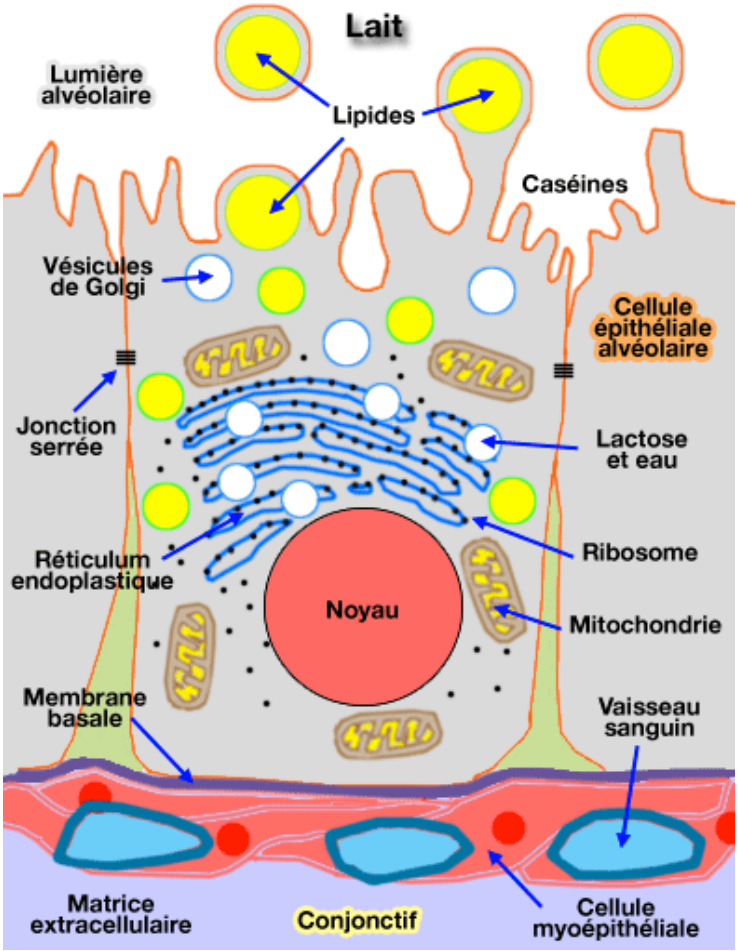


Figure 13: Sécretion des globules gras par les cellules épithéliales mammaires (http://www.vetopsy.fr/reproduction/lactation/allaitement-lait.php).

1.2.2.2. Composition chimique de la MFGM

La MFGM est principalement composée de lipides polaires tels que les glycérophospholipides et les sphingolipides, de cholestérol, et de protéines, dont des glycoprotéines et des enzymes (Fong et al., 2007). Elle présente une composition proche de celle de la membrane plasmatique des cellules sécrétrices de la mère (Keenan et al., 1970). Dans la littérature, l'analyse de la composition chimique de la MFGM est variable en fonction de la méthode d'isolement, ou de la technique d'analyse (Huang and Kuksis, 1967; Le et al., 2009; Mather, 2011; Patton and Huston, 1986; Ye et al., 2002). Comme celle des TAG, la composition de cette membrane varie suivant la race, l'âge, le stade de lactation ou encore l'alimentation de l'animal. Chez la vache, la MGFM contient 1 à 2 % des protéines du lait, qui représentent 20–60% de la masse membranaire (Lopez, 2011; Mather, 2011). Le Tableau 1 liste les principales protéines membranaires recensées dans le lait de vache.

Tableau 1: La composition des protéines de la MFGM en masse moléculaire (Da). CD (Cluster of differentiation); PAS (periodic acid Schiff), BRCA I (Breast cancer type 1 susceptibility protein). Les données sont obtenues à partir de Fox and McSweeney, 2003; Jenness et al., 1988; Keenan and Mather, 2006; Keenan et al., 1988b.

Protéines	Masse moléculaire (kDa)
Mucine I (MUC1)	160-200
Xanthine oxydase	150
PAS III	95-100
CD36 ou PAS IV	76-78
Butyrophiline (BTN)	67
Adipophiline (ADPH)	52
PAS 6/7	48-54
Protéines liées aux acides gras	13
BRCA I	210

Les lipides polaires, glycérophospholipides et sphingolipides, représentent environ 0,5% - 1% de la matière grasse du lait. Parmi les glycérophospholipides, les phosphatidylcholines (PC) représentent 19.2–37.3% des lipides polaires, les phosphatidylethanolamines (PE) 19.8–42%, les phosphatidylinositols (PI) 0.6–13.6% et les phosphatidylsérines (PS) 1.9–16%. Les sphingolipides sont quant à eux majoritairement composés de sphingomyéline (SM) représentant 18.0–34.1% des lipides polaires (Avalli and Contarini, 2005; Bitman and Wood, 1990; Lopez et al., 2008; Ménard et al., 2010; Rombaut et al., 2005; Rombaut and Dewettinck, 2006; Sanchez-Juanes et al., 2009). Dans les lipides polaires du lait, les acides gras sont généralement constitués de longues chaines hydrocarbonées, avec des nombres de carbones allant de 10 à 24, où les degrés d'insaturation peuvent varier de 0 à 5 double liaisons (Sanchez-Juanes et al., 2009). Fong et al. (2007) ont pu déterminer une petite quantité d'acides gras à chaîne supérieure à 20 carbones dans les glycérophospholipides PE, PC, PI et PS (Figure 14). Dans la SM du lait, les longueurs des chaines vont de 16 à 24 atomes de carbone avec environ 20% de C16:0, de C22:0 ou de C24:0 et plus de 30% de C23:0 (Fong et al., 2007; Sanchez-Juanes et al., 2009). Cette composition spécifique confère à la SM un point de fusion relativement élevé, Tm = 34.3°C (Murthy et al., 2016a). Parmi les composants importants de la MFGM, il y a aussi les stérols qui représentent 0.3 à 2% des lipides associées à la membrane (Mather, 2011). On retrouve principalement le cholestérol qui est considéré comme stérol majeur avec un pourcentage de 95% (molaire).

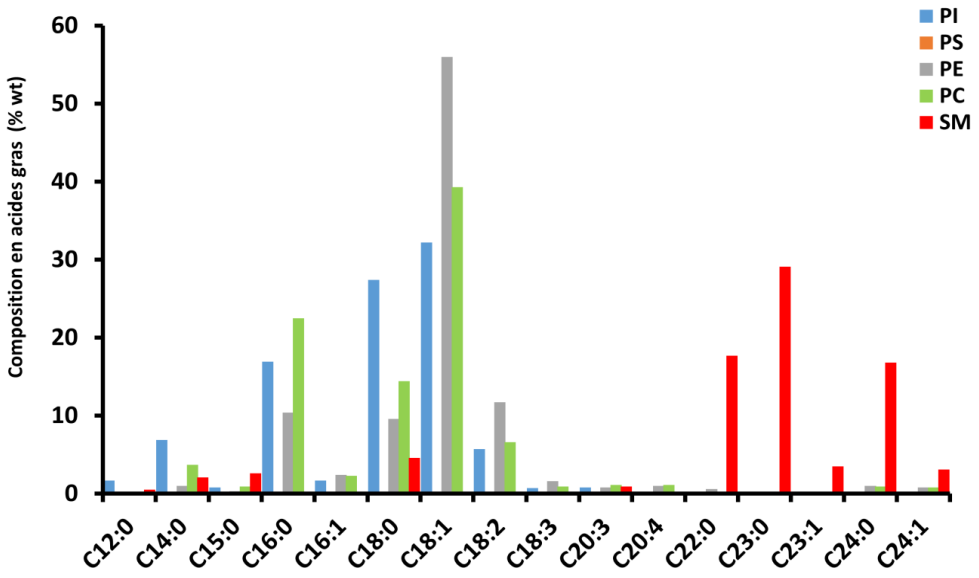


Figure 14: La composition des acides gras des lipides polaires de la MFGM déterminée par chromatographie en phase gazeuse (GC). PI : phosphatidylinositol, PS : Phosphatidylsérine, PE :phosphatidylethanolamine, PC : Phosphatidylcholine, SM :Sphingomyéline (D'après Fong et al., 2007)

1.2.2.3. Structure de la MFGM

La communauté scientifique travaillant sur la structure de la membrane des globules gras du lait s'accorde sur le fait que, à l'issue de la sécrétion du globule gras, la MFGM est composée d'une tricouche de lipides polaires : une monocouche de lipides polaires et de protéines en contact avec le cœur gras du globule et une bicouche externe complexe avec une couche protéique dense en électron située sur la face externe de la monocouche (Dewettinck et al., 2008; Keenan and Mather, 2002; Figure 15).

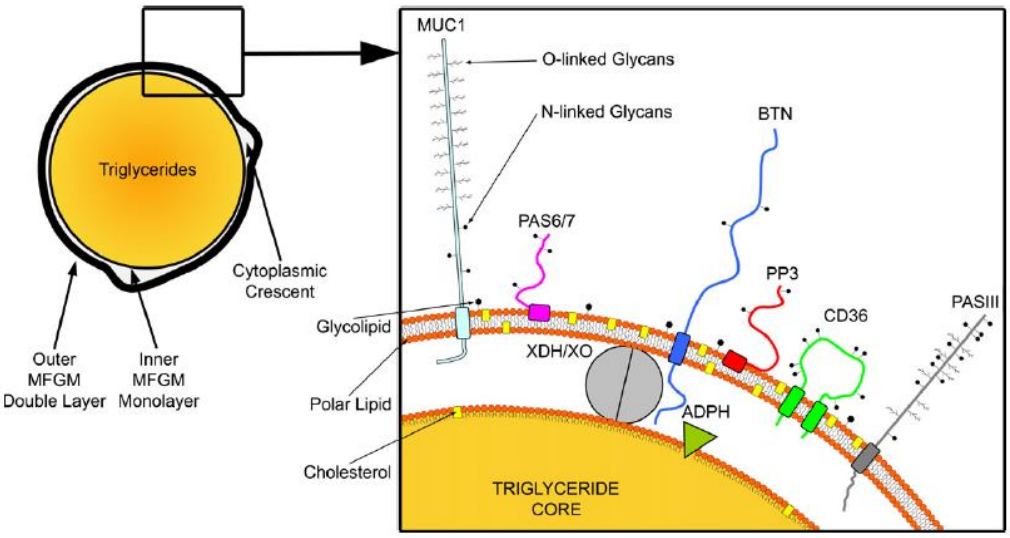


Figure 15 : Schéma représentatif de la structure de la MFGM (Dewettinck et al., 2008).

Les protéines de la MFGM sont réparties de manière hétérogène (Figure 15 ; Figure 16). Elles peuvent être soit intégrales ou périphériques selon leur nature chimique. L'adipophiline (ADPH), qui a une affinité très élevée pour les TAG, est située dans la monocouche lipidique polaire interne. XDH / XO sont plutôt localisées entre la monocouche et la bicouche externe. MUC1, BTN, CD36, PASIII, PAS6/7 et PP3 sont toutes des protéines situées dans la partie externe de la MFGM et plus ou moins insérées. Les protéines XDH/ XO, ADPH et BTN sont étroitement associées, formant un complexe supramoléculaire qui permet de connecter les différentes couches de lipides entre elles et de maintenir la stabilité de la MFGM (Mather, 2000). Les protéines glycosylées de la MFGM sont distribuées sur la surface de la MFGM en orientant leurs groupements glucidiques vers le solvant (Dewettinck et al., 2008; Heid and Keenan, 2005). Les différents composants lipidiques de la MFGM, lipides polaires et cholestérol, sont probablement répartis d'une manière asymétrique dans les trois feuillets constituant MFGM, en raison de leur polarité et de leur hydrophobicité respective, et pour les lipides polaires en raison aussi de la géométrie conique ou cylindrique du volume moléculaire. Dans les membranes plasmatiques, la SM est ainsi majoritairement localisée dans le feuillet externe de la bicouche, avec des PC et une minorité de PE, tandis que feuillet interne est le siège de la majorité des PS, PI et PE (Quinn, 2004). Selon les travaux de Deeth (1997) ou Heid and Keenan (2005), les PC et la SM seraient localisées dans le feuillet externe de la bicouche externe de la MFGM, tandis que la PE, la PI et la PS seraient plutôt dans la face interne. Ainsi, la répartition des phospholipides de la MFGM reflèterait celle de la membrane plasmatique. PI et PS font aussi partie de la monocouche lipidique polaire interne (Heid and Keenan, 2005). Le cholestérol pourrait être localisé dans les 3 feuillets de lipides polaires de la MFGM, et préférentiellement colocalisé avec la SM en lien avec sa grande affinité pour les sphingolipides saturés. Alors que les membranes plasmatiques sont des bicouches, la MFGM est une tricouche dont les éléments peuvent s'être réagencés au cours de la sécrétion. De plus, on ignore si l'asymétrie initiale de la membrane apicale de la cellule épithéliale mammaire est maintenue après la sécrétion du globule gras dans le lait.

L'organisation des lipides polaires dans les 3 feuillets de la MFGM a longtemps été considérée comme une armature fluide sans organisation latérale (Dewettinck et al., 2008; Figure 15). Des travaux réalisés par microscopie confocale ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité structurale des protéines et des lipides polaires dans la MFGM (Evers et al., 2008; Lopez et al., 2010; Figure 16A). Le marquage de la phase fluide de la MFGM par un phospholipide fluide hexogène (rhodamine-dioleoylphophatidylethanolamine, Rh-DOPE) a révélé des hétérogénéités interprétées comme la présence d'une séparation de phase avec formation de

domaines de taille micrométrique (Lopez et al., 2010; Figure 16). Ces résultats ont été interprétés par la coexistence de phases, induites par la présence de lipides polaires ayant des propriétés physico-chimiques, et en particulier des Tm, différentes (Evers et al., 2008; Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2010; Zou et al., 2015). Ainsi, les domaines lipidiques observés à température ambiante (20°C), sont suspectés d'être riches en lipides polaires ayant des températures de transition de phase élevées (Tm > 20°C), tels que la SM (Tm= 35°C ; (Malmsten et al., 1994; Murthy et al., 2016a) ou le DPPC (Tm= 41°C ; Nagle et al., 1996). Il est également possible que ces domaines soient composés de lipides polaires à haute Tm en interaction avec le cholestérol pour former une phase liquide ordonné Lo. Leur état de phase ordonné et dense n'a pas permis l'incorporation de la sonde fluorescente Rh-DOPE contrairement à la phase continue riche en lipides polaires insaturés qui est fluide à 20°C. Ces domaines révélés à la surface des globules gras *in situ* dans le lait diffusent dans le plan de la membrane (Lopez et al., 2010; Nguyen et al., 2015). Dans la MFGM, les protéines glycosylées semblent localisées uniquement dans la phase continue fluide, alors que dans les membranes plasmatiques elles seraient localisées dans les domaines, cette co-ségrégation étant à la base du concept des « rafts » cellulaires (Figure 5). Le concept de «raft lipidique » a donc été proposé pour ces domaines riches en SM et en cholestérol formés dans la MFGM à la surface des globules gras du lait (Lopez et al., 2010).

La MFGM est donc un système dynamique caractérisé par une hétérogénéité de structure à la fois transversale (tricouche de lipides polaires) et planaire (domaines formés par séparation de phase des lipides polaires dans la bicouche externe) qui est principalement liée à son hétérogénéité de composition en lipides polaires et à la présence de cholestérol. Ces domaines pourraient avoir des propriétés fonctionnelles et biologiques, par analogie avec les rafts dans les membranes cellulaires. Il est donc nécessaire d'accroitre la connaissance de leurs conditions de formation, leur dynamique dans le plan de la MFGM et de leurs propriétés physiques.

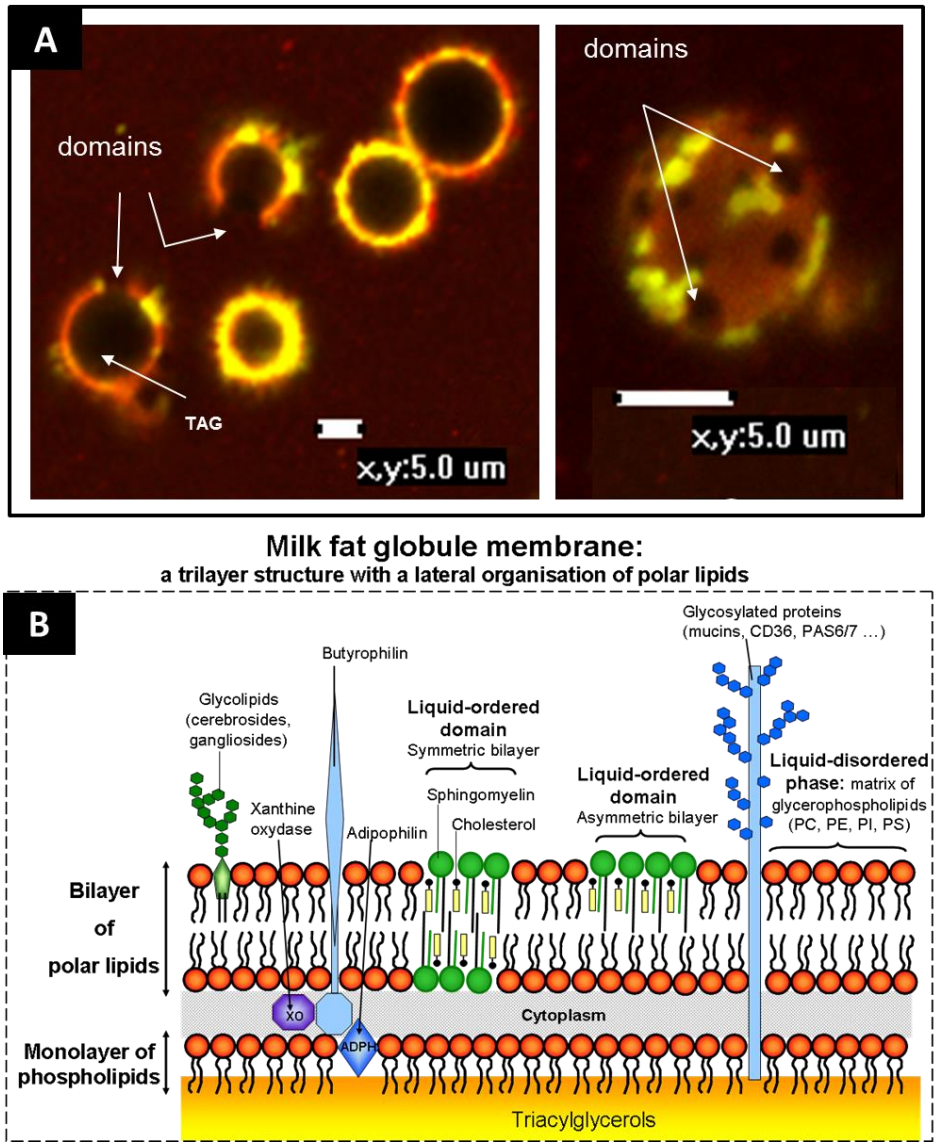


Figure 16 : A) Image du globule gras obtenue par microscopie confocale montrant la répartition hétérogène des protéines (couleur jaune) et des lipides polaires, avec la phase fluide des phospholipides insaturés (couleur rouge) les domaines riches en sphingomyéline (couleur noir) dans le plan de la membrane (MFGM). Les protéines ont été marquées en utilisant la lectine fluorescente WGA-488 tandis que les phospholipides ont été marqués par un phospholipide exogène fluorescent Rh-DOPE. B) représentation bidimensionnelle de la structure de la MFGM en trois couches. L'organisation des protéines et des lipides polaires dans le plan de la MFGM montrant une ségrégation latérale des lipides saturés (Tm élevée) formant des domaines en phase gel ou en liquide ordonné en présence du cholestérol (Lopez, 2011).

1.2.2.4. Effet des traitements technologiques sur la MFGM

Les traitements appliqués au lait liquide avant sa commercialisation sont de nature physique, qu'ils soient thermiques, comme la pasteurisation ou le traitement UHT (ultra haute température) et le stockage au froid, ou mécaniques comme l'écrémage ou l'homogénéisation. Suite à ces traitements, la composition et la structure de la MFGM peuvent être modifiées étant donné que la membrane est directement exposée à l'environnement (Jaap M. Evers, 2004; Jukkola and Rojas,

2017). L'altération de la membrane a aussi des conséquences sur la stabilité de la phase grasse du lait (Deeth, 1997). On donne ici quelques exemples des traitements technologiques utilisés en industrie laitière et leurs effets sur la membrane du globule gras:

Traitement mécanique: Ce type de traitement est basé sur le cisaillement, durant lequel la membrane peut être altérée et déstructurée par abrasion mécanique (Mulder and Walstra, 1974). Par exemple, le foisonnement, le fouettage ou le barattage sont des traitements mécaniques qui provoquent une rupture de la MFGM. En conséquence, des fragments membranaires seront libérés vers le plasma. La centrifugation, générant des forces de cisaillement avec parfois l'incorporation d'air, entraîne des phénomènes de variations de pression et d'abrasion nuisibles à l'ensemble membranaire, avec migration des phospholipides des globules gras vers le plasma (Miller and Puhan, 1986; Stannard, 1975). Enfin, l'homogénéisation sous pression est un processus qui consiste à déstructurer les globules gras pour les diviser en gouttelettes plus petites, ce qui augmente de 6 à 10 fois la surface globulaire (Jukkola and Rojas, 2017; Lopez et al., 2015). Durant ce processus, des protéines de la phase aqueuse du lait, notamment des micelles de caséines, s'adsorbent sur les globules gras et augumentent la tension de surface (Michalski et al., 2001; Phipps and Temple, 1982). Dans le cas des émulsions concentrées, telles que les crèmes riches en matière grasse, les distances interglobulaires sont réduites et les globules gras peuvent se toucher, ce qui accélère les altérations de la MFGM. En exemple, l'agitation ou l'homogénéisation de la crème vont provoquer un déphasage voire une inversion des phases, à l'origine de la fabrication du beurre (Britten et al., 2008; Stone and Rowlands, 1952).

Traitement thermique : Les processus de chauffage et de refroidissement utilisés dans le but d'éliminer ou de limiter le développement des micro-organismes (bactéries) peuvent déstabiliser la MFGM suite à la perte de phospholipides et de certaines protéines, à un changement brusque d'état de phase des lipides, à la dénaturation des protéines, ou à l'oxydation des lipides insaturés (McPherson and Kitchen, 1983; Mulder and Walstra, 1974). A l'occasion d'un traitement thermique supérieur à ~60°C, les protéines sériques du lait sont susceptibles d'interagir avec les protéines de la MFGM et d'y former de petits agrégats protéiques (Saffon et al., 2011; Ye et al., 2002). Le refroidissement induit plusieurs changements, souvent une perte de matériel membranaire, qui paraissent irréversibles (Baumrucker and Keenan, 1973; Mulder and Walstra, 1974; Patton et al., 1980). La congélation et la décongélation, parfois pratiquées dans le cadre du stockage prolongé des crèmes, induisent, de manière importante, des mécanismes de coalescence

des globules gras et, par conséquent, une accélération de la déstabilisation de l'émulsion globulaire.

En conclusion, la stabilité des globules gras dépend largement des propriétés structurales et physiques de la membrane. L'existence d'hétérogénéités de composition et de structure dans les différentes dimensions de la MFGM induit autant de plans ou de lignes possibles de fracture lors d'une contrainte thermique ou physique. La caractérisation des propriétés mécaniques de la membrane est donc nécessaire afin de mieux contrôler la stabilité des globules gras lors des procédés technologiques.

1.2.3. Les lipides polaires laitiers : ingrédients fonctionnels

Certains composants de la membrane des globules gras et leur métabolites formés au cours de la digestion peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine et peuvent ainsi être considérés comme des nutraceutiques potentiels (Chatterton et al., 2013; Spitsberg, 2005). Durant la dernière décennie, un nombre croissant de travaux a démontré que les lipides polaires laitiers possèdent d'excellentes qualités nutritionnelles et fonctionnelles. Les lipides polaires ont montré des effets bénéfiques sur la santé concernant les maladies cardiaques, l'inflammation et le cancer. La consommation du lait riche en lipides polaires par les nouveaux nés a un effet protecteur contre les infections gastro intestinales, traduit par une diminution significative du nombre des crises fébriles (Contarini and Povolo, 2013; Veereman-Wauters et al., 2012). Les lipides polaires laitiers et les fragments de la MFGM possèdent aussi d'excellentes propriétés fonctionnelles qui leur permettent de jouer un rôle prépondérant que ce soit au niveau des interfaces (globule gras, émulsion) ou dans la fabrication des systèmes dispersés (liposomes). La nature amphiphile des phospholipides leur permet d'agir comme émulsifiants dans les systèmes eau/huile et huile/eau ainsi que comme épaississant, dispersant ou agent mouillant. Suite à l'ajout de fragments membranaires riches en lipides polaires, des émulsions recombinées de lait ont aussi montré une bonne stabilité en fonction du pH (Lopez et al., 2017) et au cours des traitements thermiques (Kasinos et al., 2014). Les phospholipides extraits de la MFGM peuvent également être utilisés dans d'autres applications comme la conception de liposomes dédiés à l'encapsulation (Figure 17; Bangham, 1992; Bezelgues et al., 2009; Farhang et al., 2012; Gülseren and Corredig, 2013; Thompson and Singh, 2006). L'intérêt de cette structure réside principalement sur la possibilité de vectoriser des substances d'intérêt soit au niveau de la membrane du liposome (pour des molécules hydrophobes) soit dans la cavité interne (molécules hydrophiles). Ils ont le principal avantage d'être à la fois non toxiques et biodégradables ce qui élargit leur domaine d'applications: agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique, etc. Etant un bon modèle membranaire, les

liposomes sont aussi couramment employés pour comprendre les mécanismes intervenant au niveau des membranes biologiques, comme la perméabilité, la fluidité, l'ancrage de protéines ou encore la fusion de deux membranes (Singh et al., 2012; Vesper et al., 1999).

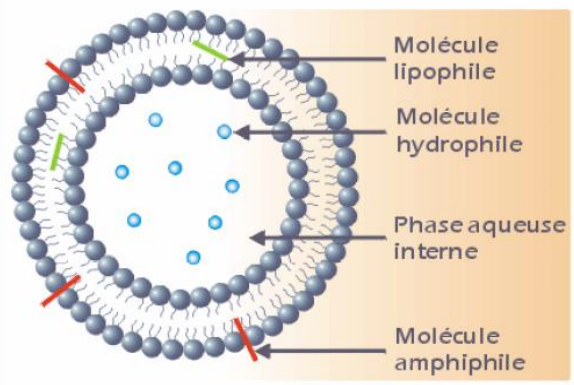


Figure 17: Encapsulations de molécules d'intérêt dans une bicouche de liposome en fonction de leur solubilité (Devoiselle, 1997).

Les propriétés physico-chimiques des phospholipides formant le liposome ont un fort impact sur sa stabilité physique et ses fonctionnalités (Shimanouchi et al., 2009; Yoshimoto and Todaka, 2014). Or, les différentes sources naturelles de phospholipides n'ont pas toutes la même composition et en conséquence pas les mêmes propriétés physiques. C'est une spécificité des lipides polaires du lait de contenir une proportion importante de SM saturée (i.e. 20-35%), la lécithine de soja qui est très utilisée est riche en PC (Figure 18). L'origine des phospholipides utilisés pour fabriquer des liposomes (e.g. lait, œuf, soja), notamment pour des applications alimentaires, doit donc être considérée en fonction des applications ciblées. Les liposomes préparés à partir d'une fraction lipidique de la membrane globulaire de lait (MFGM) ont montré une température de transition de phase significativement plus élevée, une membrane plus épaisse et une perméabilité plus faible que ceux préparés à partir de lécithine de soja (Bezelgues et al., 2009; Farhang et al., 2012; Gülseren and Corredig, 2013). Ils ont également montré une meilleure stabilité au cours du stockage à différentes températures et dans différents milieux (pH, concentration en sel (Thompson et al., 2009). Ceci a été interprété par la différence en composition chimique, et en particulier en SM, entre les phospholipides de MFGM et les phospholipides de soja (Thompson et al., 2006) (Figure 18).

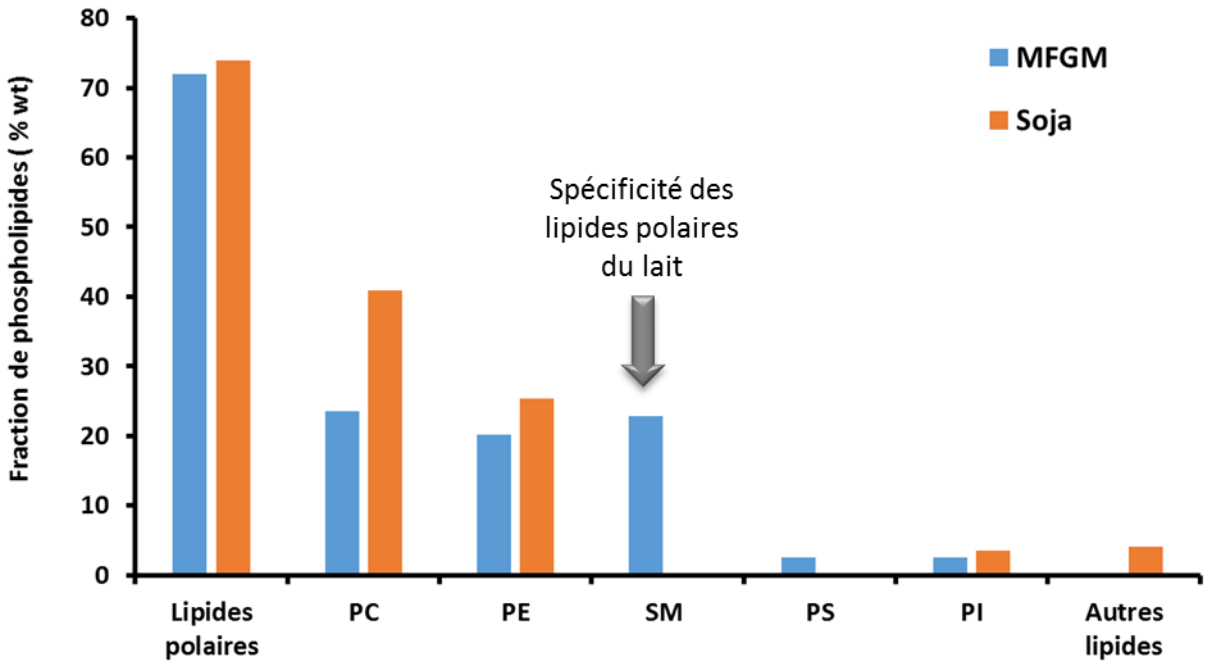


Figure 18: Les classes des phospholipides de la MFGM et du soja avec leur pourcentage en masse (d'après Thompson et al., 2006).

Le degré de saturation de la SM du lait ainsi que la longueur des chaînes d'acides gras (de 16 à 24 atomes de carbone) permettent aux membranes de liposomes à base de lipides polaires laitiers d'être en phase gel pour T < Tm = 34°C et plus structurée ce qui augmenterait leur stabilité et limiterait leur perméabilité en comparaison avec ceux de PCs (Barenholz and Thompson, 1999; New, 1990; Yoshimoto and Todaka, 2014).

Les propriétés mécaniques des membranes ont une incidence sur de nombreuses propriétés évoquées des objets biologiques tels que le globule gras, comme sa stabilité. La caractérisation des propriétés mécaniques des membranes lipidiques permettra de mieux contrôler la stabilité des liposomes, ainsi que sa perméabilité et par conséquent ses fonctionnalités (technologique, physique ou biologique). Ainsi, on pourra aussi comprendre le rôle de lipides polaires laitiers et leur organisation au sein de la membrane, dans la stabilité des globules gras ou encore dans d'autres systèmes dispersés comme par exemple les émulsions.

1.3. Propriétés élastiques des membranes

1.3.1. Aspects théoriques de la mécanique de la membrane lipidique

Les propriétés mécaniques des membranes sont principalement gouvernées par la composition et la géométrie des objets étudiés. Les bicouches lipidiques font partie de la catégorie

des matériaux appelés « matière molle ». Ces bicouches sont des phases condensées qui possèdent de nombreuses caractéristiques de liquides mais qui sont simultanément structurées. Les interactions intermoléculaires qui provoquent l'agrégation spontanée des molécules lipidiques en bicouches fluides en présence d'eau, confèrent également un degré de « raideur » à ces bicouches par rapport aux liquides conventionnels. Cette raideur lui permet de résister à différents types de déformations telles que la courbure, le cisaillement ou la dilatation/compression. Tout type de matériau possède des propriétés mécaniques intrinsèques qui lui permettent de résister à une contrainte (force exercée par unité de surface). La résistance d'une membrane se manifeste dans sa capacité à recouvrer sa forme initiale après une déformation élastique. Lorsque la contrainte dépasse la résistance du matériau, l'objet est déformé et il s'ensuit un changement irréversible dans la forme et/ou le volume. Dans ce cas, la déformation plastique peut aller jusqu'à la rupture (Figure 19).

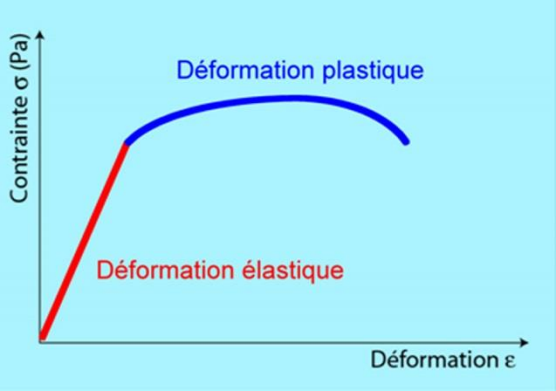


Figure 19 : Exemple de comportement d'un solide sous contrainte.

L'élasticité d'une membrane peut être quantifiée en fonction de la nature de la contrainte par différents paramètres appelés modules élastiques. On distingue ainsi le module de compression/dilatation (KA), le module de cisaillement (μ) et le module de courbure (KC) (Figure 20).

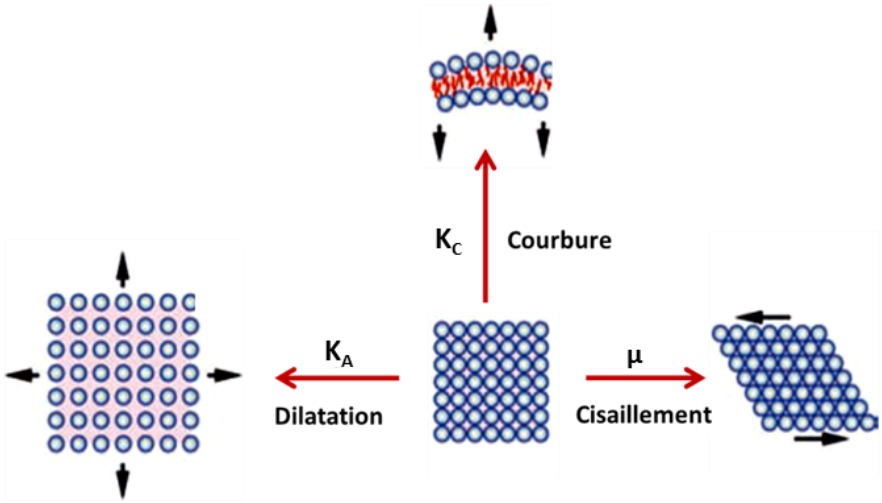


Figure 20: Les principales contraintes subies par les membranes lipidiques.

Pour de faibles déformations élastiques, ces différents modules peuvent s'exprimer par la «thin shell theory» qui relie la contrainte et la déformation uniaxiale d'un matériau élastique en fonction du module d'Young (E). Le module de Young est la pente initiale de la courbe de déformation-contrainte (Figure 19), exprimée par la loi de Hooke :

Où σ est la contrainte (en unité de pression ou de contrainte Pa, ou $J.m^{-3}$) ; E est le module de Young (en unité de pression Pa) ; ε est l'allongement relatif, ou déformation (adimensionnel). Un matériau dont le module de Young est très élevé est dit rigide.

Cisaillement de la membrane

La densité d'énergie E_{cis} associée au cisaillement de la membrane est obtenue par la loi de Hooke (Landau and Lifshitz, 1986) et s'écrit :

Où $\lambda = (L_0 + \Delta L)/L_0$ est le taux d'extension latérale *avec* L_0 est la longueur avant la déformation et μ est le module de cisaillement ($J.m^{-2}$). Ce paramètre a été mesuré expérimentalement pour le globule rouge en utilisant différentes techniques comme l'aspiration par micropipette (Mohandas and Evans, 1994), ou les pinces optiques (Hénon et al., 1999). Le module de cisaillement peut s'exprimer en fonction du Young E, selon l'hypothèse de la « thin shell theory » (Flügge, 1973):

où ν est le coefficient de Poisson.

Le module de cisaillement pour un fluide peut être négligé (proche de 0)

Dilatation-compression des membranes lipidiques

La dilatation en deux dimensions consiste à augmenter l'aire de la membrane par étirement ce qui correspond à écartement des molécules dans le plan (Figure 20). La compression est son opposée. La mesure de la densité surfacique d'énergie E_A d'une telle déformation pour membrane d'une aire A variant de ΔA s'écrit :

Où K_A est le module de compression qui est de l'ordre de 0.2 $J.m^{-2}$ pour des membranes lipidiques (Evans and Rawicz, 1990; Olbrich et al., 2000). La variation relative A ne peut dépasser 8%, pour une tension limite appelée "tension de lyse". Au-delà de cette valeur, l'étirement qui écarte les lipides affaiblit les forces intermoléculaires, conduisant à la destruction de la membrane (Rawicz et al., 2000; Sandre et al., 1999). La dilatation locale de la membrane et la formation d'un trou est une des composantes à la base de la mesure de la force de rupture (breakthrough force ou F_B) par indentation avec un nano-indenteur ou une pointe AFM (Butt and Franz, 2002a). Le module de Young tridimensionnel E d'une membrane est lié au module de dilatation/compression K_A bidimensionnelle, selon :

Où d est l'épaisseur de la membrane et le coefficient de Poisson.

Courbure

La courbure est décrite par une asymétrie de tension entre les feuillets d'une bicouche qui peut provenir soit d'une différence dans le nombre de molécules amphiphiles pour une aire donnée, soit de la différence entre les espèces moléculaires. Du point de vue des espèces, le rapport de diamètres entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe détermine la géométrie du volume moléculaire et ainsi la structure des assemblages lipidiques (Israelachvili et al., 1980, 1977; Lipowsky, 1991). Si les parties hydrophile et hydrophobe des lipides ont des tailles équivalentes de telle sorte que la forme globale de la molécule est proche d'un cylindre, ces molécules auront tendance à former des bicouches planes (cas des PE). Les molécules lipidiques ayant une forme de cône tronqué (tête un peu plus large que la queue) ont tendance à former des bicouches flexibles qu'on retrouve généralement dans les vésicules (cas de PC ou SM). Du point de vue de la densité, le feuillet le plus peuplé se trouve comprimé, tandis que le moins peuplé est dilaté par rapport à son état d'équilibre. Pour ces raisons, il peut exister un gradient de pression latérale dans la direction normale à la membrane. Energétiquement, cette asymétrie entre les pressions des deux monocouches génère une courbure spontanée de la membrane qu'on note H_0. En présence d'une contrainte, la déformation de la membrane nécessite une énergie afin de maintenir une géométrie stable. La densité d'énergie est exprimée en fonction des invariants du tenseur de courbure de la

surface : la courbure moyenne H et la courbure de Gauss K et qu'on détermine à partir de deux courbures principales C_1 et C_2 de la membrane (Figure 21).

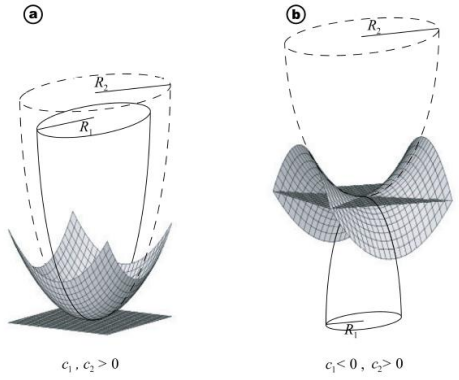


Figure 21 : Courbures principales pour deux surfaces courbées ;a) de même signe, b) signe opposés (Girard, 2004).

Où k_C *et* k_G sont les constantes élastiques, exprimées en Joules ou en en énergie thermique ($k_BT \sim 4.11 \times 10^{-21}$J). k_G est la rigidité élastique gaussienne qui caractérise l'énergie élastique associée à la courbure intrinsèque de la membrane. Il est invariant et n'intervient que lors d'un changement de la topologie de la membrane. Ce module peut être mesuré lors d'une transition de phase (Baumgart et al., 2005). k_C est la rigidité de courbure et traduit l'énergie des déformations élastiques de la bicouche. Il dépend de la structure des molécules (degré de saturation) ainsi que des interactions intermoléculaires assurant leur assemblage (Rawicz et al., 2000). Sa valeur varie aussi en fonction de la composition de la membrane et des conditions extérieures (température, pH, force ionique…). Pour les bicouches lipidiques, les rigidités k_C et k_A sont reliées par l'équation $k_C = K_A d^2$ où d est l'épaisseur de la membrane (Marsh, 2006). Cette relation dépend du couplage entre les monocouches et la distribution de la pression latérale qui doit être uniforme dans la bicouche.

Dans le cas de l'approximation de la « thin shell theory », le module de Young peut être déterminé à partir des rigidités élastiques k_C et k_G.

1.3.2. Mesure expérimentale des propriétés élastiques des membranes :

La caractérisation des propriétés physiques des échantillons biologiques est actuellement un domaine de recherche très actif, particulièrement en ce qui concerne leurs comportements dynamiques et mécaniques. Les recherches s'articulent notamment autour de l'objet "membrane", caractérisé par certaines propriétés élastiques, à partir desquelles on espère prédire le comportement en équilibre ou en présence de contraintes mécaniques. Plusieurs techniques de haute résolution ont été mises en œuvre afin d'étudier ces propriétés mécaniques à l'échelle micrométrique ou nanométrique, pertinentes pour des objets tels que des cellules, des liposomes ou des globules gras. Les premiers travaux sur la caractérisation mécanique des membranes ont été réalisés en observant les variations de forme de vésicules par analyse d'image à l'aide de la microscopie optique (Duwe and Sackmann, 1990; Evans, 1983; Niggemann et al., 1995). Le suivi des déformations des vésicules de lipides permet d'extraire les paramètres géométriques qui peuvent ensuite servir à calculer des modules mécaniques. La membrane peut être déformée en utilisant des méthodes sans contacts : agitation thermique, pression osmotique, cisaillement ; ou par contact : aspiration par micropipette, spectroscopie de force par AFM, compression entre deux plaques (Neubauer et al., 2014). Les objets membranaires peuvent être typiquement des bicouches planes, supportées ou non (par exemple au niveau de la fente d'un support, ou sur des « tethers » polymériques), ou des capsules ; i.e. des vésicules dans le cas des lipides. Les objets plans sont intéressants pour explorer de grandes surfaces, mais les vésicules présentent le double intérêt d'être plus proche des objets biologiques, et d'être déformables pour accéder à la courbure.

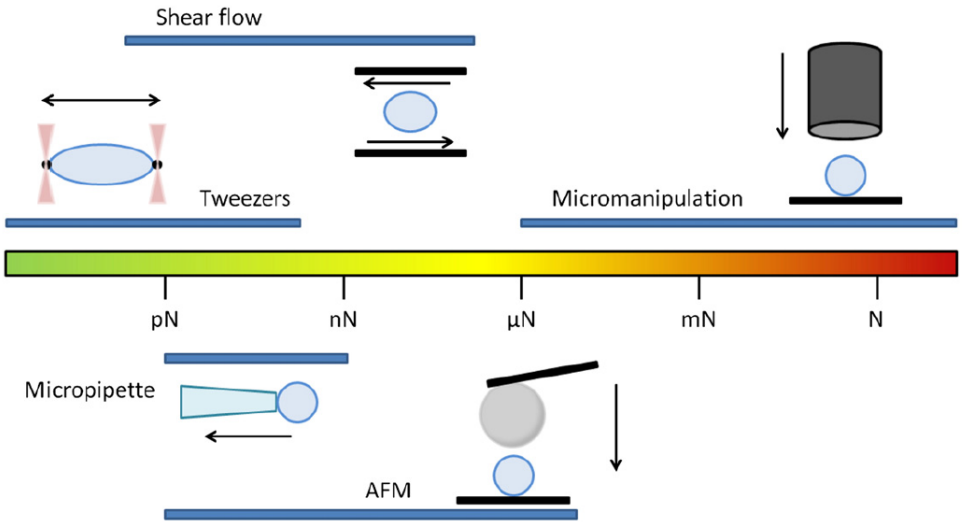


Figure 22 : Les techniques utilisées pour la caractérisation mécanique des vésicules à différentes échelles de forces. Les flèches représentent les directions d'application de la force (d'après Neubauer et al., 2014).

Dans ce paragraphe, nous allons décrire brièvement quelques techniques et méthodes expérimentales fréquemment utilisées pour mesurer les propriétés élastiques des membranes (Figure 22).

Flux de cisaillement:

Les propriétés mécaniques des membranes lipidiques peuvent être évaluées en analysant le comportement de vésicules soumises à des cisaillements par écoulement. Cette technique consiste à exposer une vésicule, suspendue dans un liquide, à un flux de cisaillement créé par le mouvement deux cylindres concentriques tournant dans deux directions opposées (Figure 23). Sous l'effet du cisaillement croissant, la membrane de la vésicule fluctue autour de sa position d'équilibre jusqu'à ce qu'elle adopte une nouvelle forme elliptique (longueur L, largeur B) inclinée d'un angle θ (~ 45°) par rapport à l'axe ne passant pas son barycentre. Si le taux de cisaillement noté γ continue à augmenter, la vésicule peut finir par se briser (Koleva and Rehage, 2012; Neubauer et al., 2014). Les changements de forme sont à suivis à l'aide d'un microscope optique. La déformation D de la vésicule est décrite par le modèle de Taylor (Van Houtte et al., 2005) :

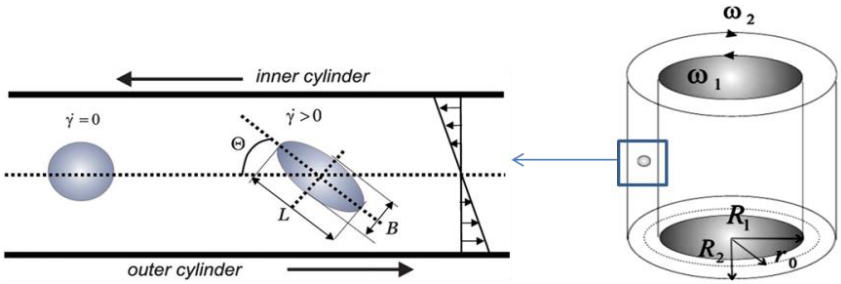


Figure 23 : Particule soumise à un cisaillement dans un rhéoscope dont les cylindres de rayons différents R1 et R2 tournant avec deux vitesses opposées 1 et 2 (Koleva and Rehage, 2012).

La réponse d'une vésicule aux cisaillements dépend de principalement de trois paramètres : la forme et la rigidité de la vésicule, le ratio de viscosité entre la phase fluide interne et externe, la vitesse du flux et le nombre capillaire C_a. Ce nombre (C_a) représente l'effet relatif des forces visqueuses par rapport à la tension de surface agissant sur une interface. Les modules d'élasticité ou de cisaillement de la membrane sont déterminés, à partir de l'observation de la déformation de la vésicule. Pour des membranes élastiques, le modèle théorique de Barthès –Biesel considère que la déformation varie linéairement avec le nombre capillaire C_a (Barthes-Biesel, 1998, 1991). Le module de Young E d'une surface membranaire est calculé à partir de la pente de la fonction linéaire qui lie la déformation D au taux de cisaillement γ :

où η_a est la viscosité de la phase externe, r est le rayon de la vésicule, E est l'élasticité de la membrane. Cette méthode est appropriée pour étudier finement les effets respectifs des milieux interne et externe de la vésicule, s'ils varient. Par contre, elle est réservée à des objets micrométriques, observables à la résolution de la microscopie optique.

Aspiration par micropipette:

La méthode d'aspiration par micropipette, mise au point par le groupe d'Evans (Evans and Needham, 1987; Kwok and Evans, 1981), se base sur la mise en relation de la variation de l'excès d'aire déployée par l'aspiration et de la tension membranaire que cette même aspiration impose. Cette technique consiste à adsorber l'extrémité d'une pipette à la surface d'une vésicule puis à appliquer une dépression afin de déformer la membrane par aspiration. Au fur et à mesure qu'on augmente la surpression dans la vésicule, la membrane pénètre dans la micropipette. La longueur aspirée augmente proportionnellement avec la dépression appliquée jusqu'à ce qu'elle finisse par se tendre et que son aire totale augmente. La mesure de cette dilatation en fonction de la tension

exercée sur la membrane permet de déduire la rigidité et la résistance des vésicules à l'étirement et par conséquent sa compressibilité. La réalisation de cette expérience nécessite la mise en place d'un système de pression hydrostatique qui sera combiné avec un microscope optique, le tout étant thermostaté. Les images seront analysées afin d'extraire les paramètres géométriques qui seront ensuite utilisés pour le calcul des modules mécaniques (Evans, 1990; Mabrouk et al., 2009). Les rigidités de dilatation k_A et de courbure k_c peuvent être déterminées à partir du rayon de la pipette (R_p), le rayon de la vésicule (R_v), la longueur d'aspiration (L) et la pression d'aspiration appliquée (P) (Figure 24).

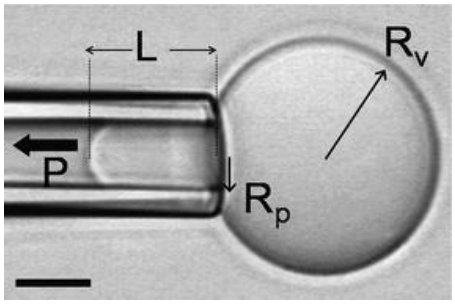


Figure 24 : Aspiration d'une vésicule par micropipette. L est la longueur aspirée, P la pression, Rv et Rp sont les rayons de la vésicule et de pipette respectivement (Mabrouk et al., 2009).

Par développement, le module d'Young est calculé en fonction de k_C, le coefficient de Poisson ν et l'épaisseur de la membrane d, selon l'équation 7. Cette méthode expérimentale précise et directe a beaucoup contribué à faire avancer les connaissances sur les propriétés élastiques des membranes. Cependant, là encore, elle nécessite des vésicules de grande taille, adaptées à la micropipette et à la résolution du microscope optique. L'appareillage et la manipulation sont très délicats.

Spectroscopie de force par AFM

La spectroscopie de force par AFM consiste à évaluer la réponse mécanique des membranes en se basant sur des interactions physiques entre un échantillon et une pointe utilisée comme un nano-indenteur. Très souvent, ces expérimentations sont menées sur des membranes planes supportées (SLB), bien adaptées au balayage de la surface par une pointe AFM (absence de relief). Dans ce cas, les données mécaniques sont acquises en courbe de force (Figure 25). A partir des courbes de force-distance générées, de nombreux paramètres peuvent être calculés : à l'approche, on a accès au module de Young ou élasticité (E) et au module de rigidité de courbure (k_C,) au niveau du régime élastique de l'indentation ; à la force de rupture (F_B) lorsque la pointe perfore la membrane, et à l'adhésion (F_{adh}), lors du mouvement de retrait de la pointe.

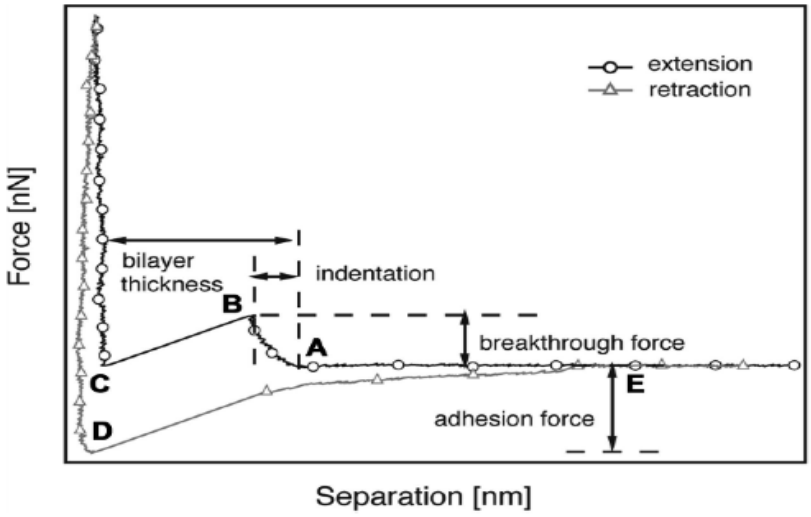


Figure 25: Courbes de force (approche-retrait) exprimant la force (nN) en fonction de la distance de séparation (nm) entre la pointe et l'échantillon. Les paramètres physiques extraits sont : le module de Young, la force de rupture et l'épaisseur de la bicouche lipidique, et la force d'adhésion. A, Point de contact ; B, début de rupture ; C, contact avec le substrat; D, adhésion maximale; E, retour à la position initiale à distance de l'échantillon (Li et al., 2010).

Les SLBs sont généralement formées sur un support hydrophile (mica, verre, oxyde de silicium). L'avantage de ces systèmes bidimensionnels réside dans leur bonnes résolutions spatiales XYZ, en couplage avec les mesures mécaniques, et la grande surface potentiellement examinée (jusqu'à plusieurs centaines de μm^2), ce qui est intéressant dans le cas de bicouches multiphasiques. En revanche, leur épaisseur étant faible, la présence du substrat peut affecter les mesures mécaniques, ce qui n'est pas le cas pour des membranes non supportées, telles que des vésicules immobilisées. Les mesures d'indentation de vésicules par AFM sont ainsi plus exactes, mais leur mise en œuvre est délicate. On ne connaît que quelques études publiées sur des vésicules de petites tailles (Chapitre 7), et une seule sur des vésicules géantes (Schäfer et al., 2015). Par contre, la mesure des propriétés élastiques de grands objets membranaires est très attendue en biologie, où les équipes réalisent déjà des mesures de module d'Young « apparent » en indentant des cellules ou des bactéries et en appliquant des modèles simples.

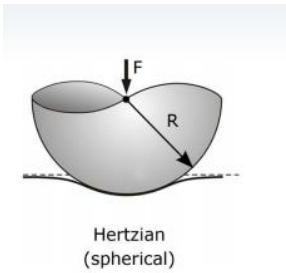
En effet, le calcul de l'élasticité des membranes nécessite l'usage d'un modèle théorique adapté à la mécanique contact pointe/échantillon. Les modèles théoriques les plus utilisés sont celui de Hertz et ses développements Johnson-Kendall-Roberts (JKR) et Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) ; Sneddon, Dimitradis et Reissner (Derjaguin et al., 1975; Dimitriadis et al., 2002; Hertz, 1882; Johnson et al., 1971; Reissner, 1947; Sneddon, 1965). Comme toutes autres méthodes, les mesures de force par spectroscopie AFM nécessitent l'utilisation d'un modèle théorique adapté.

Le choix du modèle dépend essentiellement de la forme et des dimensions de la pointe ainsi que de l'objet indenté.

L'approche AFM pour la mesure des propriétés élastiques des membranes est donc prometteuse pour la diversité des objets que l'on peut étudier. Elle permet notamment d'explorer des objets qui sont inabordables avec des techniques ayant recours à la microscopie optique (comme les bicouches planes ou les vésicules sub-micrométriques). Sur les grandes vésicules, plus proches des cellules ou des bactéries, des développements sont en revanche encore nécessaires.

i) Module de Young :

Modèle de Hertz: Le modèle de contact Hertzien repose sur deux hypothèses: (1) la relation de la force et l'indentation n'est pas linéaire et (2) un échantillon homogène et d'épaisseur infinie. Dans le cas d'un indenteur paraboloïdal en contact avec une surface plane, le modèle s'exprime par :



F est la force appliquée, la distance d'indentation et R_t le rayon de la pointe. La rigidité de courbure peut donc être calculée en appliquant l'équation 7.

Compte-tenu de leur faible épaisseur, le modèle de Hertz est mal adapté aux bicouches et le module d'Young est souvent calculé comme « apparent ». Sur des bicouches lipidiques biphasiques gel/fluide, Picas et al., (2012) établissent que le modèle s'applique de façon satisfaisante pour des déformations inférieures ou égales à 20% de l'épaisseur totale de la bicouche, soit de l'ordre de 1 nm. Sur des films minces de polysaccharides, Schoeler et al., (2006) démontrent également que pour des déformations de l'ordre de 10% de l'épaisseur du film, le modèle de Hertz ne requiert pas de corrections, telles qu'on peut en trouver dans les modèles disponibles de la littérature.

Modèle de Reissner: Les faibles déformations de l'ordre de l'épaisseur de la paroi, obtenues par l'indentation d'une pointe colloïdale, montrent une relation linéaire de l'indentation avec la force

appliquée, qui correspond à un aplatissement local de la calotte sphérique près du point de contact (Reissner, 1947). Le module d'Young de la membrane peut alors être estimé par l'équation :

Où R est le rayon de courbure de la membrane, k la raideur de la membrane (pente de la relation force-distance), ν coefficient de Poisson, et d l'épaisseur de la membrane. À partir de cette élasticité, on peut également calculer le module de la rigidité k_C en utilisant l'équation 7.
Etant donné que ce modèle néglige la force retro-exercée par le support sur la vésicule, Glaubitz et al.,(2014) ainsi que Berry et al.,(2017) supposent que le module d'Young obtenu par le modèle de Reissner est sous-estimé. Dans leurs travaux, un facteur correcteur a été introduit afin de tenir compte des deux déformations induites sur la membrane par le substrat et par la pointe (Figure 26). La valeur de ce facteur est déterminée en fonction des paramètres géométriques de la bicouche de la membrane (épaisseur, rayon de la vésicule) ainsi que de la pointe (rayon).

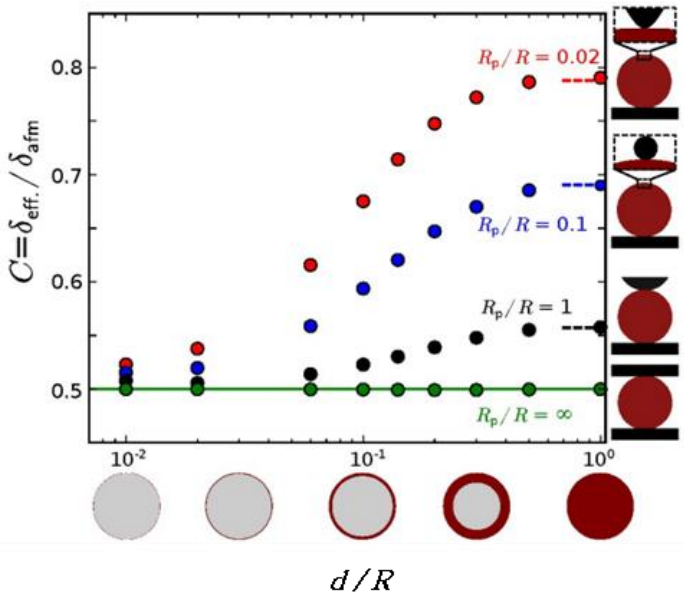


Figure 26: Diagramme permettant la détermination du coefficient de correction C en fonction des rapports Rp/R et d/R où Rp est le rayon de la pointe, R rayon du liposome, et d l'épaisseur de la membrane lipidique (figure adaptée de Berry et al., 2017)

ii) Force de rupture

Au-delà du régime élastique, la déformation d'une membrane peut conduire à l'accentuation d'un gradient de pression sous la pointe, pouvant aller jusqu'à la rupture par la formation d'un

trou. Selon le matériau, la rupture peut se produire plus ou moins tôt en fonction des propriétés élastiques ou plastiques intrinsèques. La force de rupture peut être considérée comme un indicateur du degré de résistance ou de stabilité d'une membrane lipidique. Cette mesure est généralement réalisée sur des bicouches planes supportées, la présence du support permettant sa compression et sa rupture sous la pointe.

Tenant compte de l'épaisseur des membranes ainsi que de sa structure organisée en molécules parallèles en constantes agitation les unes par rapport aux autres, une théorie développée a décrit la rupture d'une bicouche de lipides comme étant un processus cinétique basé sur la probabilité P(t) que des molécules s'écartent, par agitation, sous la pointe AFM, suffisamment pour créer un trou (Butt and Franz, 2002b; Franz et al., 2002). Une barrière énergétique doit être surmontée afin de créer un trou dans la bicouche de lipide qui doit être suffisamment grand pour initier la pénétration de la pointe. Cette énergie d'activation diminue avec l'augmentation de la force appliquée, du fait que la pression appliquée modifie localement la structure du film confiné (compression et dilatation). Ainsi, on détermine une distribution gaussienne de forces de rupture et non pas une valeur définie. La constante de vitesse du mécanisme de pénétration de la pointe dans la bicouche obéit à la loi d'Arrhénius ; la probabilité de rupture du film confiné s'exprime par

Avec

Où k_BT est l'énergie thermique, U(t) est l'énergie d'activation nécessaire pour la formation d'un trou et A est la fréquence avec laquelle la pointe entre en contact avec la bicouche (inverse de la vitesse d'approche). Cette approche cinétique de la rupture de membranes par indentation explique que lorsque la vitesse d'approche de la pointe augmente, la probabilité qu'un trou se forme sous la pointe à un intervalle de force croissant F diminue, et par conséquent que la force de rupture F_B tende à augmenter.

En pratique, la force de rupture peut être déterminée à partir de la courbe de force-distance en projetant le point B (pénétration) de la **Figure 25** sur l'axe des y exprimant la force F en nN, ou par un calcul automatisé utilisant la dérivée de la région de la courbe où le contact pointe-échantillon est établi (Li et al., 2010).

Applications:

De nombreuses recherches ont pu déterminer les propriétés mécaniques de plusieurs petits objets grâce aux techniques de microscopie très avancées. Tableau 2 montre quelques exemples d'études réalisées sur différents systèmes et composition et pour lesquelles on a pu mesurer divers paramètres mécaniques. La spectroscopie de force par AFM fait partie des techniques les plus utilisées et les plus fiables en termes de précision. La résolution nanométrique à submicrométrique des déplacements de la pointe d'AFM, dans les trois dimensions de l'espace, permet de caractériser aussi bien les propriétés structurales complexes que les propriétés mécaniques, avec l'avantage de pouvoir les coupler. Dans la littérature, la détermination des paramètres physiques comme le module de Young, le module de rigidité ou la force de rupture de nombreux objets lipidiques ou non lipidiques a été possible à l'aide de différentes techniques (AFM, microscopie à contraste de phase, aspiration par micropipette). L'avantage d'utiliser l'AFM repose sur la possibilité de pouvoir caractériser les propriétés mécaniques des objets dans une large gamme de taille (10µm - 60 nm) d'organisation bidimensionnelle 2D (bicouches planes) ou tridimensionnelle 3D (vésicules sphériques ou facettées). En terme de précision, Dieluweit et al., (2010) ont réalisé une étude comparative entre l'aspiration par micropipette et l'AFM où ils ont montré que les propriétés mécaniques d'un composé (lipide/protéines), mesurées dans les mêmes conditions, étaient variables (Tableau 2). De plus, les écarts types estimés par aspiration par micropipette étaient remarquablement élevés comparés à ceux obtenus par spectroscopie de force AFM. Ils ont également remarqué que la technique d'aspiration par micropipette n'était pas capable de distinguer entre les réponses mécaniques de deux type de protéines alors qu'elles sont mécaniquement différentes (Csiszár et al., 2009). L'AFM a été récemment très utilisée en raison de ses nombreux avantages : (1) extraction de plusieurs paramètres mécaniques à la fois à partir d'une seule courbe de force ; (2) sa sensibilité prévient l'endommagement des échantillons, sauf parfois pour la mesure de la force de rupture (3) traçabilité de la déformation en se basant sur le profil des courbes de force et par conséquent, possibilité de reproduire les résultats.

Tableau 2: Ordre de grandeur des modules mécaniques E (module de Young) ou k_c (rigidité de courbure) mesurés pour différents objets (lipide ou non-lipidique) en utilisant plusieurs techniques. Les valeurs représentent des moyennes avec ou sans les écarts types selon les références. DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), milk SM (milk sphingomyéline) DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), SOPC (1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine).

Système	Référence	Composition	Objets	Technique	Paramètre mesuré
Lipidique	Evans and Rawicz, 1990	SOPC	GUV – 20 µm	Aspiration par micropipette	k_C $0.90 \pm 0.06\times10^{-19}$ J
	Picas et al., 2012	DOPC	SLB	AFM	E 19.3 MPa
	Meleard et al., 1997	DMPC	GUV-10 µm	Microscope à contraste de phase	k_C $1.30 \pm 0.08\times10^{-19}$J
	Duwe and Sackmann, 1990	DMPC	GUV-10 µm	Microscope à contraste de phase	k_C $1.15 \pm 0.15\times10^{-12}$ J
	Delorme and Fery, 2006	DPPC	SUV - 150 nm	AFM	E 110 ± 15 MPa
	(Liang et al., 2004a)	Egg PC	SUV-60 nm	AFM	k_C $0.27 \pm 0.15\times10^{-19}$ J
	Sullan et al., 2009	SM/Chol	SLB	AFM	E 140 MPa
Mixte: lipide/ protéine	Li et al., 2011	Lipide/virus influenza	SUV-100 nm	AFM	E 45 MPa
	Calò et al., 2014	Membrane native	Nanovesicle-80 nm	AFM	E 1.94 ± 1.57 GPa
	Dieluweit et al., 2010	Avidin-coated SOPC/capBio DOPE	GUV-10 µm	Aspiration par micropipette	E 12 MPa
	Dieluweit et al., 2010	Avidin-coated SOPC/capBio DOPE	GUV-10 µm	AFM	E 53 MPa
	Duwe and Sackmann, 1990	Erythrocyte	Globule -7µm	Microscope à contraste de phase	k_C $3\text{-}7\times10^{-13}$ J

Non lipidique : polymère	Chen and Vancso, 2011	Polystyrene-blockpoly (acrylic acid)	Vésicule -150 nm	AFM	E 46.8 ±1.6 MPa
	Delorme et al., 2006	Surfactant anionique et cationique	Polyhedron-3.5 µm	AFM	E 180 ± 20 MPa
	Kol et al., 2006	Virus de Murine Leukemia	Vésicule multilamellaire-5 µm	AFM	E 0.23 GPa

L'originalité de ce travail réside dans le fait que les propriétés mécaniques des membranes seront quantifiées à l'échelle nanométrique via des mesures de force non-invasives et via le calcul du module de Young. Cette démarche sera opérée prioritairement sur des objets tridimensionnels, pour s'approcher du globule gras, et ainsi obtenir des informations sur la rigidité de courbure. La mesure de ces deux grandeurs offre l'avantage de fournir des données sur la résistance des membranes lipidiques, tout en tenant compte de l'effet de la courbure. Ces mesures s'inscrivent bien dans la problématique du projet, qui envisage de comprendre et si possible prévoir la réponse mécanique de membranes sous l'effet d'une force et par conséquent éviter leur endommagement comme, par exemple, dans le cas des membranes entourant le globule gras lorsqu'elles sont soumises à des traitements technologiques. Pour cela, nous avons opté pour la technologie AFM qui permet de corréler des informations topographiques avec une ou plusieurs informations mécaniques, tout en contrôlant finement la force imposée localement. De plus, l'AFM s'applique facilement à une large gamme de taille d'objets, tandis que les méthodes optiques ne sont applicables que pour des vésicules micrométriques. Quelle que soit la méthode, les grandeurs mécaniques obtenues sont des valeurs relatives car elles dépendent des conditions de mesure et surtout du modèle théorique utilisé pour traiter les données. Pour en tenir compte, nous nous sommes basés dans ce travail sur une approche comparative entre les propriétés mécaniques de différents échantillons membranaires en utilisant la startégie et les mêmes conditions expérimentales.

CHAPITRE 2: OBJECTIFS ET STRATEGIE

Chapitre 2: Objectifs et stratégie

2.1. Question de recherche

Comme nous l'avons montré précédemment, les lipides polaires laitiers sont constitués de divers lipides polaires insaturés et saturés, et en particulier la sphingomyéline (30% des lipides polaires laitiers), dont l'état physique change en fonction de la température. Pour des températures ambiantes, l'organisation des lipides polaires du lait dans la MFGM génère une hétérogénéité structurale induite par la formation de domaines ordonnés riches en sphingomyéline (phase gel ou liquide ordonné en présence de cholestérol; Lopez et al., 2010). Selon notre hypothèse, il est probable que cette hétérogénéité d'organisation des lipides polaires module les propriétés physiques de la MFGM et notamment ses propriétés mécaniques. Cela pourrait avoir un effet sur la stabilité des globules gras, et notamment lorsqu'ils seront soumis à de fortes variations de température et/ou à des cisaillements au cours des procédés technologiques. Les lipides polaires représentent également une source unique de molécules avec des propriétés fonctionnelles et technologiques intéressantes (Spitsberg, 2005). Cependant, ces propriétés restent peu connues ce qui limite leur potentiel de valorisation dans divers champs d'application (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique…) (Contarini and Povolo, 2013).

La question de recherche principale, objet de la thèse, est donc la suivante : **l'hétérogénéité d'organisation des lipides polaires, en lien avec leur composition, module-t-elle les propriétés mécaniques des membranes ?**

2.2. Objectifs et Stratégie

Cette étude vise à déterminer les propriétés biophysiques de membranes de lipides polaires laitiers, en particulier leur capacité d'organisation et leurs propriétés mécaniques en fonction de leur état physique et de leur composition. La stratégie déployée se décline en plusieurs actions complémentaires qui ont été déclinées en plusieurs questions.

Pour aborder cette problématique, nous avons souhaité partir de l'objet réel, la membrane du globule gras, pour y faire le constat de cette hétérogénéité puis y revenir en fin de projet après avoir obtenu des informations précises sur les déterminants de l'élasticité des membranes à l'échelle nanométrique. L'organisation générale de ce projet, sous la forme d'un cycle alimentant les connaissances sur l'objet réel à partir de données expérimentales de référence obtenues sur des modèles, est présentée en Figure 27.

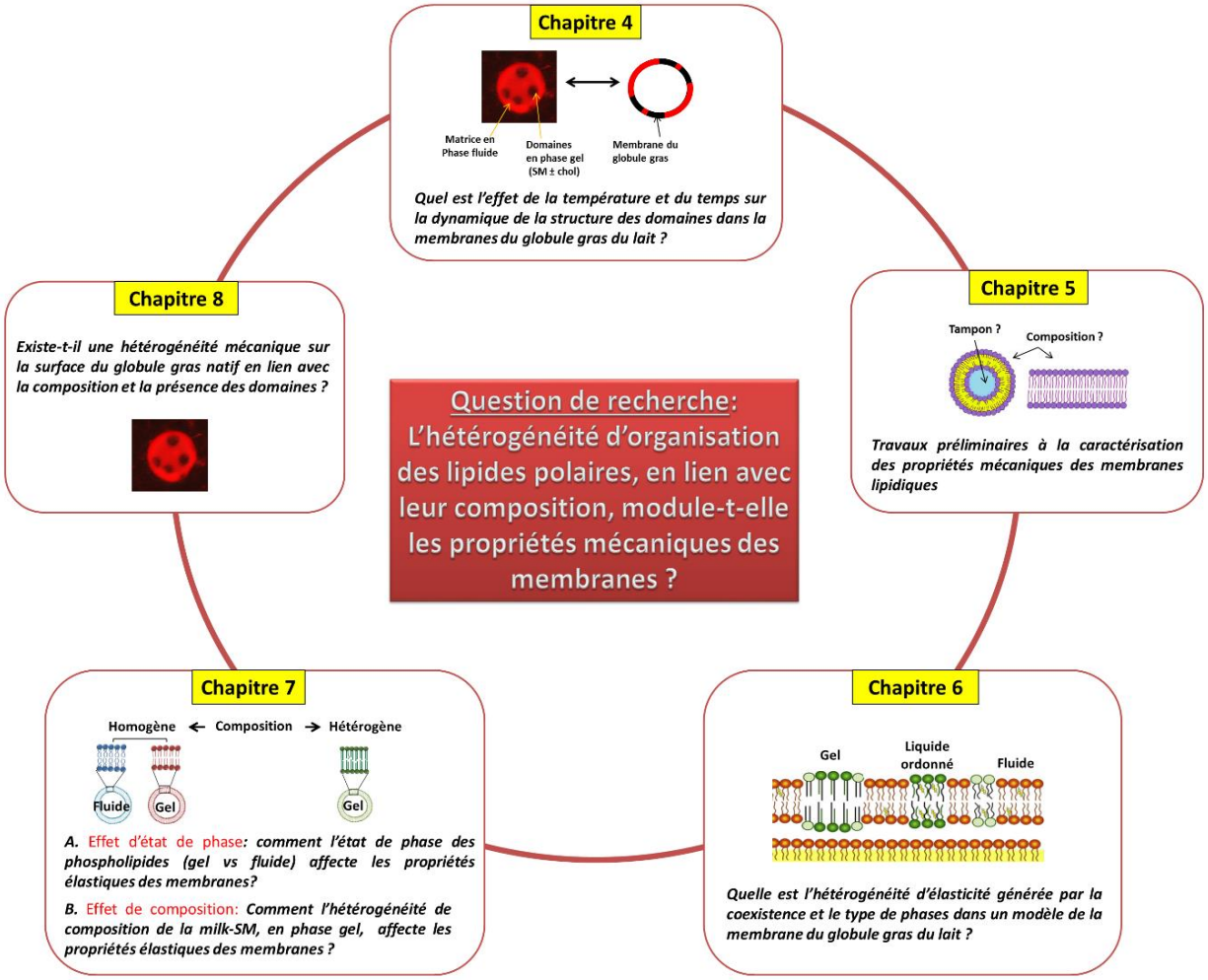


Figure 27: Stratégie générale du projet de thèse. La question de recherche principale (au centre) est articulée en questions intermédiaires (en périphérie) organisant un cycle entre objet réel et données de référence obtenues sur des objets modèles.

Dans un premier temps, nous avons souhaité répondre à la question suivante : **Quel est l'effet de la température et du temps sur la dynamique de la structure des domaines dans la membrane des globules gras du lait ?** Le premier objectif était ainsi de mieux connaitre l'hétérogénéité de structure de la MFGM et la dynamique des domaines lipidiques *in situ* dans des laits, en lien avec des variations de température pertinentes pour l'industrie laitière, mais aussi au regard des valeurs de Tm connues pour ses principaux constituants lipidiques de cette membrane. Nous avons réalisé des observations par microscopie confocale après un marquage fluorescent de la phase fluide de la MFGM ce qui permet de caractériser la microstructure des membranes à l'échelle d'objets micrométriques.

Dans une seconde étape du travail de recherche, nous avons cherché à faire le lien entre la microstructure hétérogène à la surface du globule gras, et les propriétés élastiques de la membrane

à l'échelle nanométrique, en répondant à la question : **Quelle est l'hétérogénéité d'élasticité générée par la coexistence et le type de phases dans un modèle de la membrane du globule gras du lait ?** Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une membrane modèle, exempte des protéines membranaires, pour permettre une meilleure interprétation des résultats. Nous avons utilisé une membrane supportée plane, afin de disposer de suffisamment de surface pour visualiser la séparation de phases. Pour la caractérisation mécanique des membranes, nous avons utilisé la microscopie à force atomique (AFM) en raison de sa haute résolution, adaptée aux objets nanométriques à micrométriques. En utilisant la nanoindentation, l'AFM permet en effet d'obtenir des informations locales sur les propriétés élastiques des objets comme la rigidité, le module de Young, la force de rupture…etc. De plus, il est possible de coupler ces mesures avec des informations spatiales de topographie des objets, et de corréler ainsi des motifs structuraux avec des propriétés mécaniques.

La troisième étape du travail de thèse a consisté àétudier plus finement les déterminants qui contribuent à la modulation des propriétés élastiques locales des membranes lipidiques, en recherchant le lien entre la structure des molécules de lipides polaires et les grandeurs élastiques que sont le module de Young et la rigidité de courbure. Cette étape du travail a été déclinée en 2 questions de recherches. Dans un premier temps, **nous avons analysé en quoi l'état de phase des phospholipides (gel vs fluide) affecte les propriétés mécaniques des membranes.** Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur le comportement de membranes de sphingomyéline de lait (milk SM), lipide majeur constitutif des domaines formés dans la MFGM. La question de recherche posée est la suivante : **comment l'hétérogénéité de composition de la milk-SM, en phase gel, affecte les propriétés mécaniques des membranes ?** Pour cette troisième étape du travail de thèse, nous avons fait le choix de travailler avec des liposomes de petite taille (small unilamellar vesicle ; 150 nm) pour la facilité et la répétabilité de leur fabrication, leur stabilité et surtout la garantie d'avoir des objets unilamellaires dans de nombreuses conditions de composition des vésicules et de tampon. De plus, la mesure mécanique se faisant sur le sommet d'un liposome immobilisé, la membrane sollicitée est à la fois courbée, comme le globule gras réel, et également non supportée ce qui éloigne les possibilités d'artefacts de mesure liés au support. Cette partie du travail de thèse nous a permis d'analyser certains facteurs importants dans la composition lipidique, qui conditionnent l'élasticité des membranes et en particulier, des membranes de milk SM (c'est-à-dire des domaines formés dans la MFGM). La caractérisation des propriétés mécaniques des membranes a été réalisée avec plusieurs compositions de liposomes (phospholipide insaturé DOPC, phospholipide saturé DPPC, sphingomyéline du lait et espèces moléculaires individuelles de sphingomyélines), en utilisant les mêmes conditions (pH,

concentration en sel, température), les mêmes méthodes de caractérisations de façon à pouvoir comparer les résultats obtenus avec les différents systèmes.

Dans une dernière étape, nous avons souhaité appliquer les connaissances nouvelles acquises dans les parties précédentes de la thèse qui étaient issues des travaux sur l'extrait de MFGM ou les liposomes de composition simple, sur le système réel complexe qu'est la membrane du globule gras du lait. Notre objectif était de confirmer que l'hétérogénéité de structure de la MFGM génère une hétérogénéité mécanique, comme il a été montré pour les systèmes modèles, en répondant à la question suivante : **existe-t-il une hétérogénéité mécanique sur la surface du globule gras natif en lien avec la composition et la présence des domaines ?** Pour atteindre cet objectif, nous avons opté pour un couplage entre microscopie de fluorescence, pour visualiser les domaines, et microscopie AFM, pour les mesures en indentation localement ciblées à l'aide de la pointe d'AFM. Pour l'interprétation des résultats, nous nous sommes basés sur les données mécaniques obtenues pour les systèmes simples de composition homogènes pour mieux comprendre la MFGM et interpréter le contraste mécanique observé.

Cette stratégie circulaire nous a permis d'alimenter nos connaissances sur le globule gras du lait, tout en mettant en œuvre des recherches exploratoires sur des objets modèles comme les liposomes.

Chapitre 3: Matériels et méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Laits

Les laits de vache, de brebis ou de chèvre utilisés durant la thèse correspondent à des laits entiers crus de grand mélange qui ont été produits dans la région Bretagne. Le lait bovin a été fourni par la société Entremont (Montauban de Bretagne, France). Les laits de brebis et de chèvre ont été fournis par la société Triballat (Noyal-sur-Vilaine, France). De l'azide de sodium (NaN_3, 0,02% p /v) a été ajouté aux différents laits pour empêcher la croissance des bactéries.

Les analyses de la teneur en lipides totaux et de composition en lipides polaires et en cholestérol réalisées sur ces laits sont détaillées dans l'article Et-Thakafy et al. (2017), Food *Chemistry*, 220, 352-361 (voir chapitre 4 de la thèse).

A partir de laits de vache de grand mélange fournis par la ferme laitière de Pacé (France), des globules gras lavés ont été préparés ; le protocole de préparation de ces échantillons est détaillé dans le chapitre 8.

3.1.2. Lipides polaires

3.1.2.1. Glycérophospholipides: DOPC et DPPC

Nous avons choisi d'utiliser deux glycérophospholipides synthétiques de structures différentes (Figure 28) :

- un insaturé qui est en phase fluide à température ambiante: le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine insaturé (DOPC ; 18:1*n-9*/18:1*n-9*; pureté > 99%)
- un saturé qui est en phase gel à température ambiante : le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine saturé (DPPC ; 16:0 /16:0; pureté > 99%).

Il s'agit de phospholipides zwitterioniques de même tête polaire phosphatidylcholine (PC), avec deux chaînes carbonées symétriques, mais de degré d'insaturation différent (Figure 28). Leur longueur de chaînes est également légèrement différente (2 atomes de carbone). Ils ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

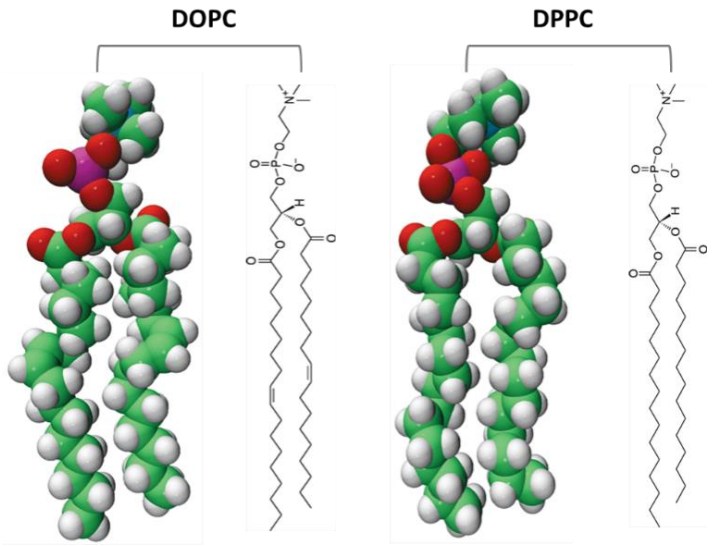


Figure 28: Structures chimiques des molécules de DOPC et de DPPC

3.1.2.2. Sphingomyéline de lait et sphingomyélines individuelles

Des sphingomyélines (SM) ont été utilisées durant le travail de thèse pour étudier leurs propriétés physiques lorsqu'elles sont organisées en bicouches hydratées.

La sphingomyéline provenant du lait bovin (milk SM, poudre, pureté > 99%) a été achetée chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). La milk SM est un mélange naturel complexe constitué de différentes espèces moléculaires, caractérisées par différentes chaînes acyl et bases sphingoides (Figure 29). La majorité (~ 44% en masse) de la base sphingoide à longue chaîne est composée de 18 atomes de carbone dotée d'une double liaison *trans*. La milk SM contient également des acides gras dont la longueur varie entre 16 et 24 atomes de carbone avec environ 20% (w/w) de C16: 0, C22: 0 ou C24: 0 et ~30% (w/w) de C23:0 (Byrdwell and Perry, 2007; Fong et al., 2007).

Des molécules synthétiques de SM, achetées en poudre chez Avanti Polar Lipids, ont également été utilisées. Nous avons choisi des SMs de structures différentes correspondant aux espèces moléculaires majoritaires trouvées dans la milk SM, afin de pouvoir réduire la complexité du mélange naturel de la milk SM et de comprendre l'effet de l'hétérogénéité de composition sur les propriétés mécaniques des liposomes. Les espèces moléculaires de SM choisies sont la N-palmitoyl-D-érythro-sphingosylphosphorylcholine (d18:1/16:0; C16:0-SM, pureté > 99%), la N-lignoceroyl-D-érythro-sphingosylphosphorylcholine (d18:1/24:0; C24:0-SM, pureté > 99%) et la N-nervonoyl-D-érythro-sphingosylphosphorylcholine (d18:1/24:1; C24:1-SM, pureté > 99%).

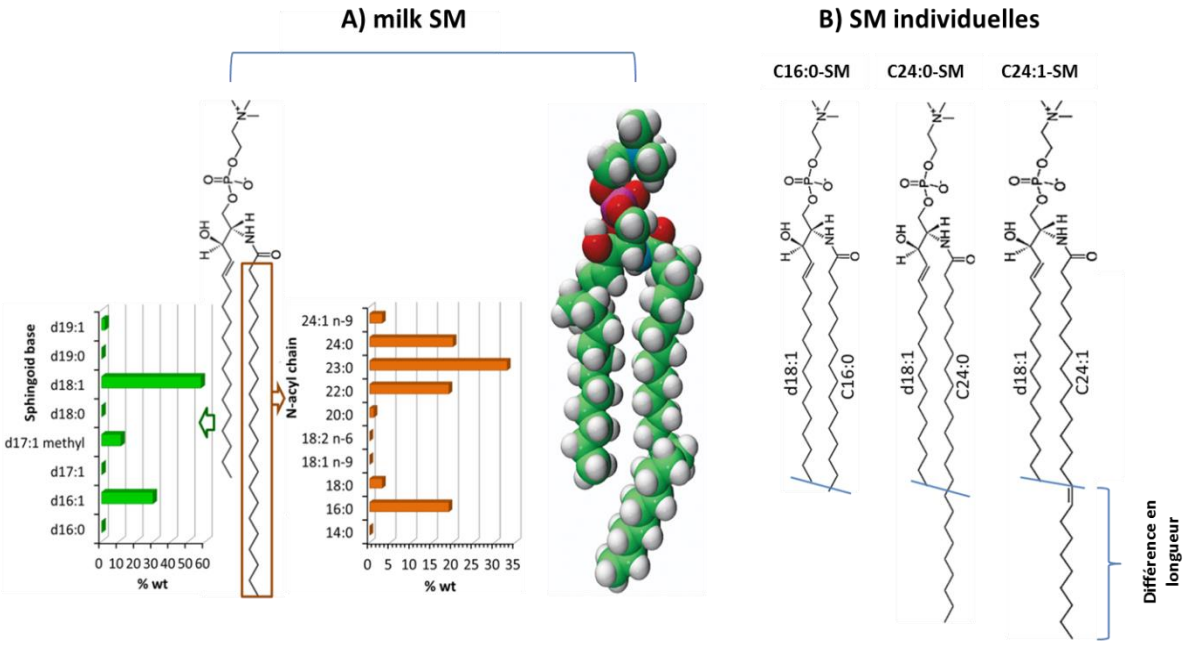


Figure 29: A) Distribution des bases sphingoides et des acides gras de la sphingomyéline du lait (milk SM) ; B) Structure chimique des molécules de SMs individuelles

3.1.2.3. Cholestérol

Des molécules de cholestérol (chol) extraites de la laine ovine (poudre, pureté > 98%) ont été achetées chez Avanti Polar Lipids. La structure est montrée sur la Figure 30.

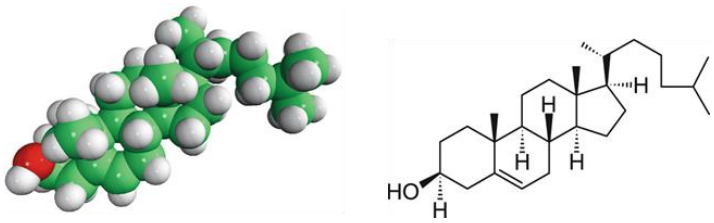


Figure 30: Structure chimique de la molécule de cholestérol

3.1.2.4. Lipides polaires extraits de la membrane des globules gras du lait

Un mélange complexe de lipides polaires de la membrane du globule gras du lait a été utilisé au cours de la thèse. Ce mélange de lipides polaires laitiers correspond au produit référencé PC 700 et acheté à la société Fonterra (Nouvelle Zélande), qui a ensuite été diafiltré au laboratoire pour augmenter sa pureté en éliminant le lactose et des minéraux. Il s'agit du même extrait de lipides polaires laitiers que celui utilisé dans les articles (Murthy et al., 2016a, 2016b). Les 5 classes majeures de lipides polaires contenus dans cet extrait, avec leur pourcentage en poids, sont la

sphingomyéline du lait (milk SM, 38.7%), la phosphatidylcholine (PC, 31.6%), la phosphatidylethanolamine (PE, 23.5%), la phosphatidylinositol (PI, 3.4%) et la phosphatidylsérine (PS, 2.8%), comme déterminé par HPLC (données internes à l'UMR STLO ; voir section 3.2.2.2). La composition en acides gras de l'extrait de lipides polaires de la membrane des globules gras est présentée dans la Figure 31, en couleur orange. Les acides gras à chaînes très longues et saturées (C22:0, C23:0, C24:0) proviennent de la quantité élevée de milk SM dans l'extrait de lipides polaires de la membrane des globules gras du lait (montrée en gris sur la Figure 31).

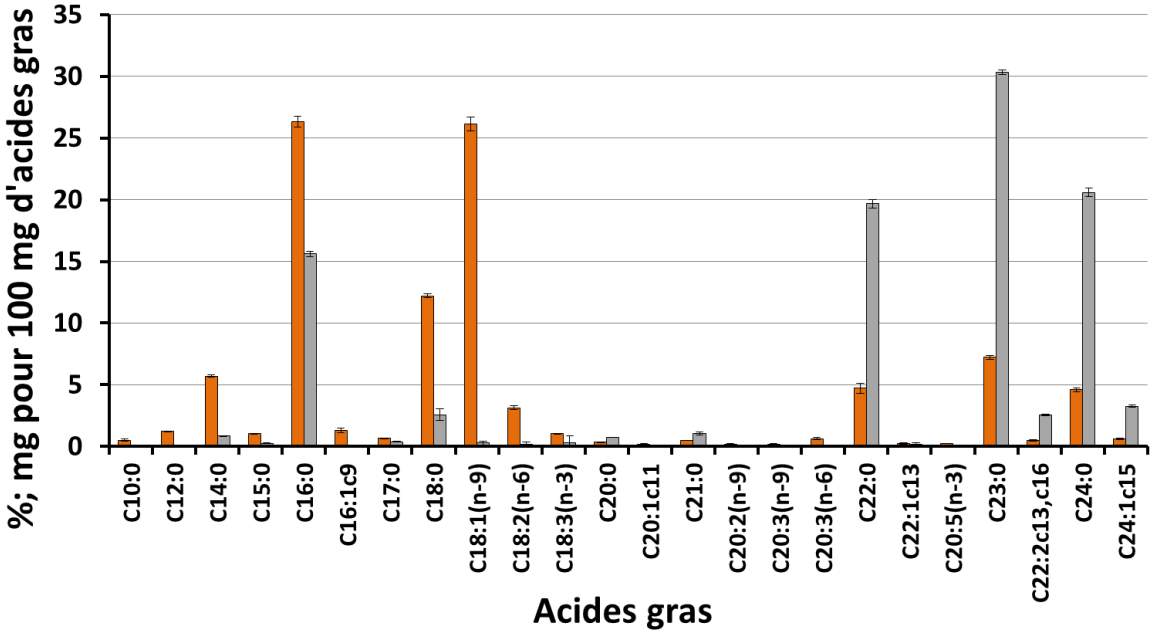


Figure 31: Composition en acides gras de l'extrait de lipides polaires de la membrane des globules gras du lait (en orange) et de la sphingomyéline du lait (en gris) (données internes à l'UMR STLO, C. Lopez).

3.1.3. Autres matériels

3.1.3.1. Tampons

Deux types de tampons ont été utilisés durant la thèse :

- Le **tampon PIPES** a été préparé en dissolvant 10 mM de PIPES (acide1,4-pipérazine-éthane sulfonique, pureté ≥ 99%, Sigma Aldrich, USA), 50 mM de NaCl (chlorure de sodium, pureté ≥ 99%, Sigma Aldrich, USA), et 2,5 ou 10 mM du $CaCl_2$ (chlorure de calcium, pureté ≥ 99%, Sigma Aldrich, USA) dans une solution basique de 5 M NaOH (hydroxyde de sodium, pureté ≥ 97%, Carlo Erba, Italie). Le mélange a été agité pendant 30 min en utilisant un agitateur magnétique chauffant à 50°C puis de l'eau distillée Milli-Q a été ajoutée pour obtenir la concentration finale souhaitée. Le pH a été ensuite ajusté en utilisant du NaOH 5 M afin d'atteindre pH 6.7, qui

correspond au pH du lait. Le tampon PIPES préparé non filtré a été stocké à 4°C et remis à température ambiante avant chaque expérimentation.

- Le **tampon PBS** (Phosphate buffered saline / tampon phosphate salin) est composé de 0.014 M de KH_2PO_4 (dihydrogénophosphate de potassium, pureté ≥ 99%, Merck, France), 0.2 M de Na_2HPO_4 (hydrogénophosphate de sodium, pureté ≥ 98%, Panreac, Espagne), 1.36 M de NaCl (chlorure de sodium Panreac, pureté ≥ 99%, Carlo Erba, Italie) et 0.02 M de KCl (chlorure de sodium, pureté ≥ 99%, Sigma Aldrich, USA). Ces molécules ont été dissoutes dans de l'eau distillée. Le tampon a été initialement préparé à pH 7.4 puis ajusté à pH 6.7 en utilisant quelques gouttes d'HCl (acide chlorhydrique 37%, VRW international, Fontenay-sous-Bois, France).

3.1.3.2. Solvants organiques

Les solvants utilisés sont de qualité analytique. Il s'agit de l'éthanol (Alcogroup, Paris, France), l'éthanol absolu (VRW international, Fontenay-sous-Bois, France), le méthanol, le chloroforme, et l'isopropanol qui ont été fournis par Carlo Erba (Paris, France).

3.1.3.3. Substrats utilisés pour la microscopie à force atomique

En vue de la caractérisation par AFM, nous avons testé différents substrats qui ont servi de support pour immobiliser les bicouches lipidiques (planes ou liposomes):

- Mica muscovite rubis clair fourni en plaques (Good fellow, Lille, France),
- Silice /wafer de silicium d'orientation atomique 100 (Siltronix, Archamps, France),
- Lames de verre de diagnostic (Thermo Scientific, Waltham, USA),
- Des substrats de verre revêtus par une fine couche d'or (Platypus Technologies, Madison, WI, USA). Dans certains cas, les substrats d'or ont été traités chimiquement pour greffer des chaines carboxyles à la surface. Pour cela, les substrats ont été mis, pendant 24 heures minimum, dans une solution composée de 2 mM de MUA (acide 11-mercaptoundecanoïque, 95%, Sigma Aldrich, USA) dissous dans de l'éthanol absolu, puis rincés à l'éthanol absolu puis à l'eau déionisée.
- Les petits morceaux de substrats d'or, de silice ou du mica ont été collés sur les lames de verre de diagnostic en préalable 4 jours avant l'utilisation afin que la résine (Super Attack Loctite, fournisseur, Belgique) soit bien polymérisée et séchée.

3.2. Méthodes expérimentales

3.2.1. Formation des bicouches lipidiques

3.2.1.1. Bicouches de lipides non supportées : vésicules

Dans ces travaux, les liposomes sont définis comme de petites vésicules uni-lamellaires (small unilamellar vesicles, SUV) composées d'un type de lipides polaires (e.g. DOPC, DPPC, milk SM, C16:0-SM, C24:0-SM) ou d'un mélange de plusieurs lipides polaires (C16:0-SM/C24:0-SM, C24 :0-SM/C24:1-SM).

La fabrication des liposomes est réalisée en plusieurs étapes. Les poudres de lipides ont été tout d'abord solubilisées dans un mélange méthanol/chloroforme (1:4.v/v) pour préparer les solutions mères. Le volume nécessaire de solution mère des lipides solubilisés a été introduit dans des flacons à scintillation en verre (6 mL ; Wheaton, Milville, NJ, USA) pour préparer les échantillons purs ou en mélange dans des proportions molaires définies (par exemple C16:0-SM/C24:0-SM, 50/50 mol). Une masse totale de 4 mg de lipides était introduite dans chaque flacon. Le méthanol et le chloroforme sont éliminés par évaporation à 40°C pendant deux heures, sous flux d'azote pour éviter l'oxydation des lipides. Le film lipidique formé dans les flacons en verre est ensuite hydraté avec le tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ (10 mM PIPES, 50 mM NaCl, 10 mM de $CaCl_2$ sauf mention différente) à pH 6.7 pour obtenir une concentration finale en lipides de 0.1% p/p. L'hydratation et la formation des vésicules sont réalisées à une température supérieure à la transition de phase (Tm) du lipide ayant la Tm la plus élevée dans le flacon, afin que le ou les lipides soient sous forme fluide. La température ainsi choisie pour l'hydratation des lipides était de 65°C. Sous l'effet de l'agitation mécanique par vortex, le film lipidique se décolle de la paroi du flacon pour former spontanément des vésicules multi lamellaires ou multi vésiculaires ayant généralement des tailles supérieures à 1 µm (Figure 32). Les SUV ont ensuite été fabriquées à 65°C par sonication en utilisant un équipement Q700 (Q-sonica, Newtown, CT, USA) et une micropointe fonctionnant à une amplitude de 50% (~ 400 W) pendant 30 min (1 h en présence de cholestérol). Après la sonication, la suspension de SUV était laissée à refroidir et à équilibrer à température ambiante (20 °C). Nous avons préparé des vésicules de différentes compositions chimiques:

- Composition homogène: DOPC; DPPC; C16:0-SM; C24:0-SM
- Composition hétérogène: milk SM/DOPC; C24:0-SM/C16:0-SM (50:50 % mol); C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol); milk SM, milk SM/cholestérol (50:50 % mol) ; lipides polaires de la membrane des globules gras du lait

Dans la littérature, d'autres méthodes de production des SUV sont citées, comme la sonication en bain d'ultrasons, ou l'extrusion à chaud à travers un filtre de faible porosité. Outre les petites vésicules unilamellaires (SUV), dont la taille avoisine la centaine de nm, il est également possible de produire des vésicules unilamellaires de taille moyenne, les LUV (large unilammelar vesicles), dont la taille varie entre 100 et 1000 nm et qui sont généralement obtenues par extrusion, ou les GUV, (giant unilamellar vesicles, Figure 32) qui dépassent le µm et qui sont généralement obtenues par électro-formation de films lipidiques plans déposés entre deux électrodes.

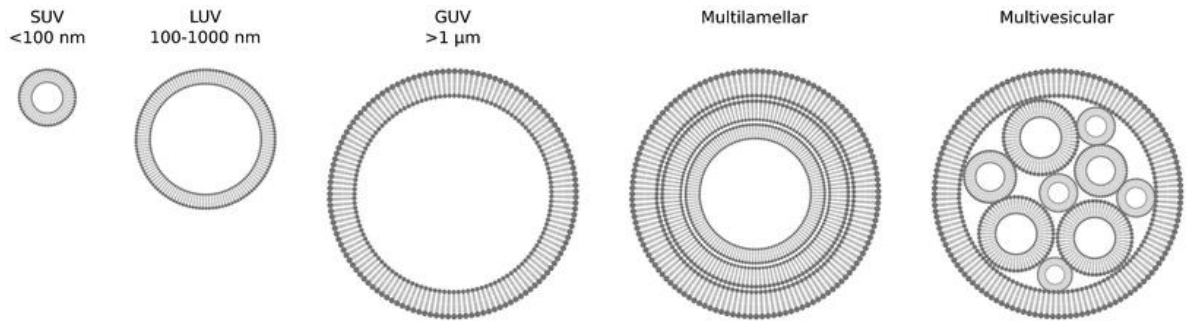


Figure 32: Classification des vésicules en fonction de la lamellarité et de la taille. Les petites vésicules unilamellaires (SUV) ont moins de 100 nm de diamètre; Les grandes vésicules unilamellaires (LUV) se situent entre 100 et 1000 nm; Et les vésicules unilamellaires géantes (GUV) sont supérieures à 1 µm. Les vésicules multilamellaires ont de nombreuses couches membranaires et les vésicules multi vésiculaires encapsulent de petites vésicules (van Swaay and deMello, 2013).

3.2.1.2. Bicouches de lipides supportées

Les bicouches lipidiques supportées (en anglais *supported lipid bilayers*, SLB) sont des membranes planes (2D) déposées sur la surface d'un substrat plan, généralement du mica. La formation de ces SLB se fait lorsque des vésicules unilamellaires de petite taille (SUV) s'adsorbent sur la surface, se déforment jusqu'à ce qu'elles se rompent, s'étalent sur la surface sous la forme de disques ou de « patches » de bicouches lipidiques (Figure 33). La présence de plusieurs patches de bicouche de distance très proche conduit à leur fusion pour former enfin une bicouche supportée continue. La formation des SLB dépend de plusieurs paramètres liés à la nature de la surface utilisée (rugosité, charge) ou aux propriétés des vésicules (taille, charge, état de phase). Cette préparation est généralement opérée à une température supérieure à la Tm des lipides constitutifs, afin de faciliter l'éclatement des vésicules et la fusion des patches de membrane. Cette condition permet aussi le couplage et une meilleure symétrie des feuillets (Alessandrini and Facci, 2014). Les SLB offrent de nombreux avantages comme la facilité de préparation et de modulation, la

stabilité, et l'adaptabilité à une grande variété de techniques sensibles pour la caractérisation de surface (Richter et al., 2006; Richter and Brisson, 2005) .

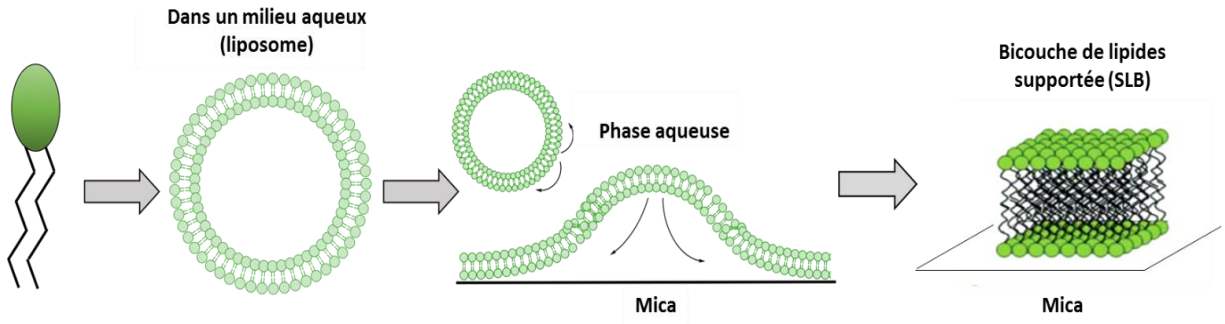


Figure 33: Mécanisme de formation des bicouches planes supportées à partir des vésicules (SUV) (Redondo-Morata et al., 2014)

La formation de petites vésicules unilamellaires (SUV) par sonication, réalisée dans des conditions de pH et de force ionique de la phase dispersante adaptées, permet d'obtenir une distribution de taille homogène ce qui optimise la formation ultérieure des SLB. Dans nos travaux, la suspension des SUV fabriquée à 0.1 % p/p de lipides a été diluée 10 fois (v/v) avec du tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à 65°C, puis déposée sur du mica fraîchement clivé. Un incubateur programmable (IPP 30+, Memmert, Büchenbach, Allemagne) a été utilisé pour la formation des SLB et pour maîtriser et standardiser la cinétique de leur refroidissement. Ainsi, une période d'incubation de 60 min à ~ 65 ± 5 ° C est suivie par un refroidissement lent réalisé à des vitesses diminuant séquentiellement de ~ 1°C.min^{-1} à ~ 0.1°C.min^{-1} afin de bien former des bicouches lipidiques planes. Un élément essentiel pour la bonne formation des SLB était notamment de refroidir lentement (de l'ordre de 0.3-0.5°C.min^{-1}) aux alentours de la Tm (la plus haute s'il y a plusieurs lipides). La bicouche est enfin rincée pour éliminer les SUV non fusionnées. Cette opération se fait par remplacements successifs d'une partie du tampon hydratant la bicouche, afin d'éviter son démouillage. Les SLB sont ensuite examinées dans le tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$. Dans la plupart des travaux de cette thèse, la molarité en sodium et en calcium du tampon était de 50 et 10 mM respectivement, comme indiqué dans la section 3.1.3.1. Dans le seul cas des SLB préparées avec les lipides polaires de la membrane des globules gras, la molarité en calcium du tampon PIPES était différente entre la sonication (0 mM de calcium, pour assurer la stabilité des vésicules électronégatives) et l'étape de fusion + rinçage (2 mM de calcium pour assurer des bicouches continues – voir chapitre 6). Ces molarités étaient plus faibles que pour les SUV de DOPC, DPPC, milk SM, qui sont électriquement neutres et nécessitent davantage de calcium pour

assurer la stabilité des SUV par répulsion électrostatique ou fusionner sur le mica (voir chapitre 7).

3.2.2. Méthodes de caractérisation

3.2.2.1. Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

Principe : La technique d'imagerie confocale de fluorescence représente une avancée technologique importante en imagerie biologique. Grâce à sa très faible profondeur de champ, cette technique permet par coupe optique de se déplacer dans les trois dimensions XYZ de l'échantillon. En l'absence de fluorescence intrinsèque de l'échantillon, la microscopie confocale nécessite le marquage des échantillons avec des sondes fluorescentes. Ces molécules fluorochromes seront excitées par une source de lumière de longueur d'onde λ, ce qui produit l'émission de fluorescence, à une longueur d'onde supérieure, qui sera détectée par l'appareil. Le choix de la (ou des) longueur(s) d'onde d'émission dépend de la gamme d'excitation du (ou des) fluorochrome(s) marquant l'échantillon. Le laser peut balayer toute la surface de l'échantillon grâce à un jeu de miroirs. Les photons détectés suite à l'émission des molécules fluorescentes sont transformés par des photomultiplicateurs en un signal électrique qui sera ensuite traduit en une image par reconstitution numérique (Figure 34). La netteté des images est due à la présence d'un orifice appelé « pinhole » localisé au niveau du détecteur qui permet d'éliminer tous les signaux de fluorescence hors du plan focal. La résolution latérale (X, Y) du microscope confocal est de 1 µm et sa résolution axiale (Z) atteint 0.4 µm. Dans les limites de sa résolution temporelle, il permet l'analyse en temps réel des phénomènes dynamiques, en particulier dans les systèmes biologiques. Cependant, il possède aussi quelques inconvénients comme la possibilité d'endommager des échantillons photosensibles (par ex une cellule), ou la photo-atténuation ou «bleaching» qui se traduit par une extinction de la fluorescence de la sonde et une perte de signal suite à une longue exposition au faisceau du laser.

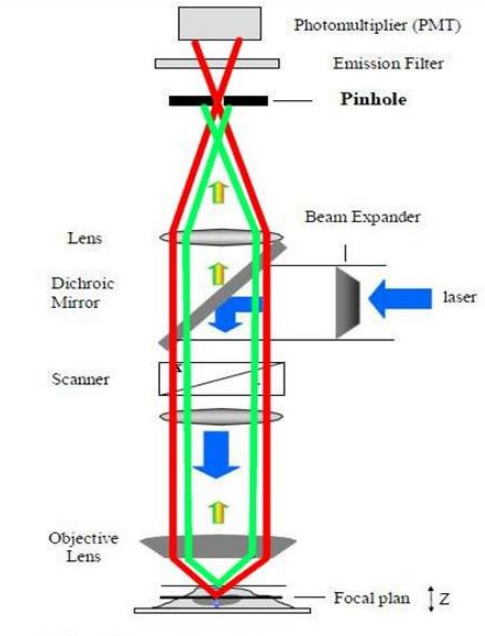


Figure 34 : Principe du microscope confocale (http://slideplayer.fr/slide/1134470/)

Application : Dans cette étude, l'équipement utilisé était un microscope inversé NIKON Eclipse-TE2000-C1si (NIKON, Champigny sur Marne, France). Les sondes fluorescentes utilisées au cours de la thèse ont nécessité l'utilisation du laser He-Ne avec les longueurs d'onde d'excitation λ_{exc}= 543 nm ou λ_{exc} = 488 nm. Les observations ont été réalisées avec un objectif × 100 à immersion dans l'huile, d'une ouverture numérique de 1.4. Un petit volume d'échantillon (2 µL) était déposé sur une fine lame de verre placée sur la platine porte-objet en contact avec l'objectif, puis recouvert d'une lamelle. La platine porte-objet (Linkam Scientific Instruments Ltd., Tad Worth Surrey, Angleterre) était munie d'un Peltier qui assurait par contact une régulation en température avec une vitesse maximale de 30°C.min^{-1}. Les images ont été acquises avec une résolution de 512 × 512 pixels et les valeurs de l'échelle des pixels ont été converties en micromètres. Le microscope est également équipé d'un système optique de contraste d'interférence différentielle (DIC) qui a également été utilisé pour identifier les globules gras sur les images, par superposition des images DIC avec les images de fluorescence. Dans ce système DIC, le faisceau incident est dédoublé en deux faisceaux proches, avant de traverser l'échantillon. Un second système optique recompose le faisceau, ce qui produit des interférences dépendantes de l'épaisseur et de la réfringence locale de l'échantillon. Cette technique génère des images en pseudo-relief qui augmentent la visualisation des objets. La microscopie confocale a été utilisée avec des sondes fluorescentes choisies (Figure 35) pour caractériser i) la microstructure des globules gras et l'organisation des lipides polaires dans la membrane des globules gras *in situ* dans le lait, ii) la microstructure de vésicules et l'organisation des lipides polaires dans ces vésicules.

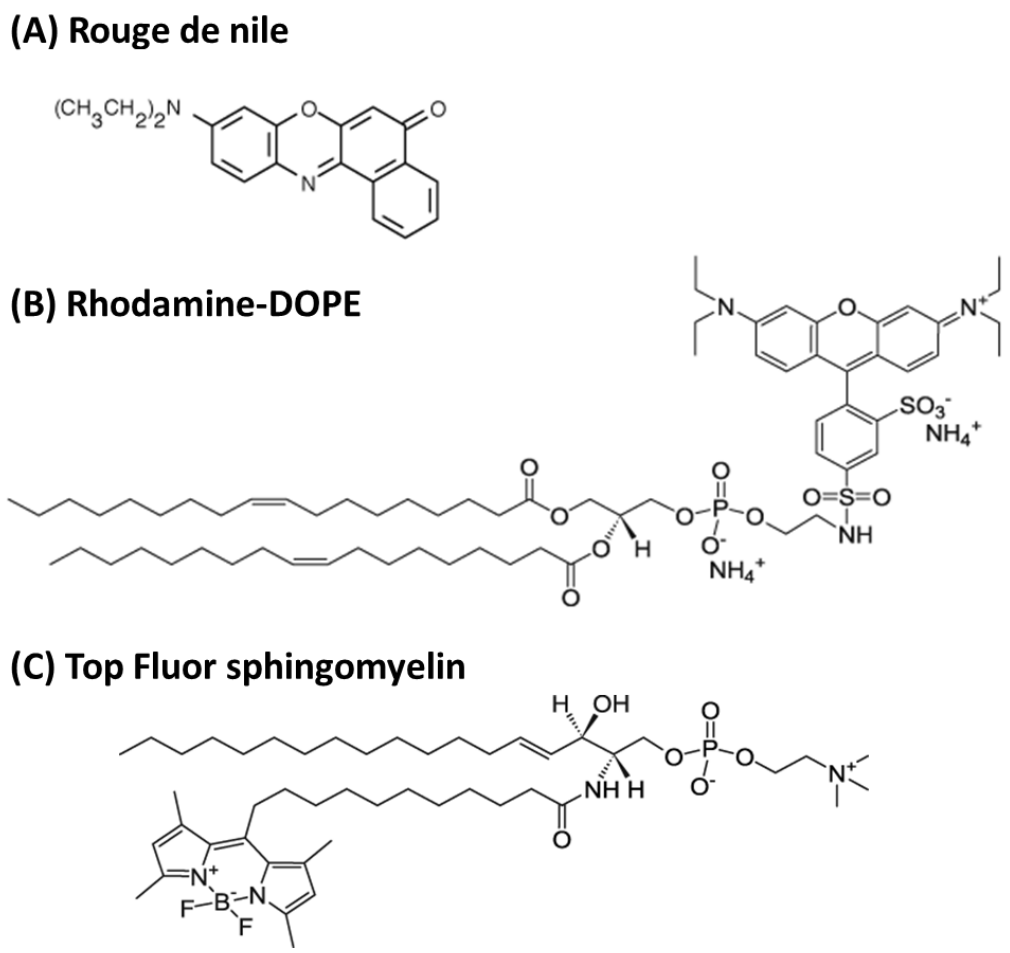


Figure 35: Sondes fluorescentes utilisées pour marquer les globules gras du lait ou les vésicules

<u>Microstructure des globules gras natifs et de leur membrane :</u>

La microscopie confocale a été utilisée pour caractériser la microstructure des globules gras natifs *in situ* dans des laits de vache, de brebis ou de chèvre. Différentes molécules fluorescentes ont été utilisées en fonction des objectifs expérimentaux (Figure 35).

- Le cœur des globules gras du lait, qui est riche en triacylglycérols, a été marqué selon Lopez et al., (2010). La sonde fluorescente lipophile rouge de Nile (5H-benzo-alpha-phénoxazine-5-one, 9-diéthylamino; Sigma Aldrich, St Louis, États-Unis) a été préparée en solution mère de 100 µg.mL^{-1} dans du propanediol (1,3-Propanediol, pureté ≥ 98%, Sigma Aldrich, USA). Environ 10 µL de la solution de rouge de Nile ont été ajoutés à 1 mL de chaque lait. La longueur d'onde d'excitation du rouge de Nile est λ_{exc}= 543 nm.
- L'organisation des lipides polaires dans la membrane à la surface des globules gras a été caractérisée selon le protocole défini dans (Lopez et al., 2010). Un phospholipide exogène marqué à la tête, la N-(Lissamine rhodamine B sulfonyl)-dioleoylphosphatidyléthanolamine

(Rh-DOPE, Avanti Polar lipids Inc., Birmingham, Angleterre ; DOPE ; Tm = -16°C). Cette sonde a été conservée dans du chloroforme (1 mg.mL^{-1}). Nous avons évaporé 20 µL de cette solution fluorescente placée dans un flacon en verre, dans lequel on ajoute ensuite 1 mL de lait. La longueur d'onde d'excitation de la sonde Rh-DOPE est λ_{exc}= 543 nm.

Les échantillons marqués ont été légèrement agités manuellement puis maintenus à température ambiante pendant au moins 30 min avant l'observation par microscopie confocale. Ensuite, ils ont été répartis en plusieurs aliquots afin de pouvoir réaliser différentes cinétiques thermiques (Figure 36). Plusieurs cinétiques ont été réalisées, directement sur la platine du microscope, ce qui a permis l'acquisition d'images au cours des évolutions de température.

- **Cinétiques de chauffage :** Les globules gras des laits de brebis, chèvre ou vache ont été caractérisés à T < Tm (MFGM) = 36°C. Pour cela, les laits ont été stockés à 4 ou 20°C pendant au moins 10 heures puis ont été chauffés à 60°C avec une vitesse de 10°C.min^{-1}.
- **Cinétiques de refroidissement et de stockage :** Les laits ont été chauffés à une température initiale donnée Ti (60 ou 20°C) puis refroidis à une température finale Tf (20 ou 4°C), avec une vitesse supérieure à 100° C.min^{-1}, par contact direct entre la goutte de lait à Ti et une lame de verre à Tf. Les globules gras du lait ont ensuite été imagés directement à Tf, ou conservés pendant la nuit (~ 16 heures) à Tf afin d'être observés le lendemain à la même température.

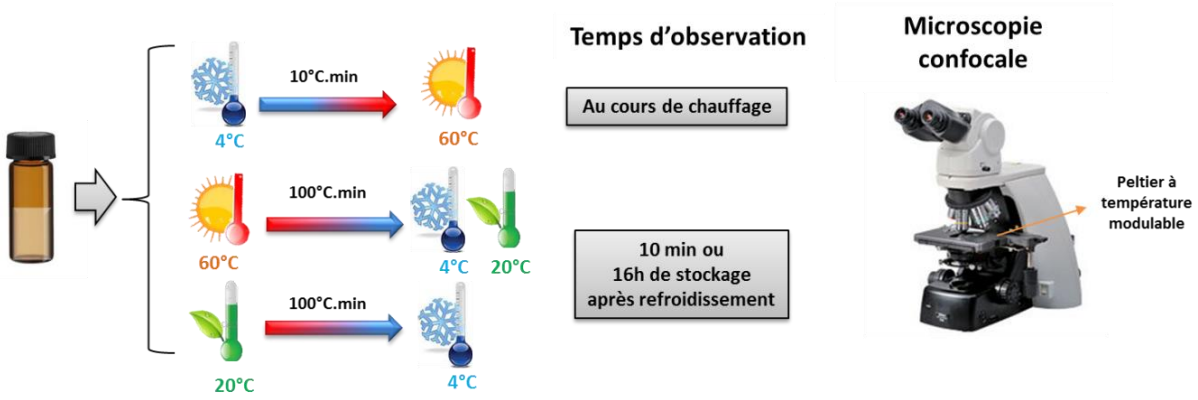


Figure 36 : Schéma représentatif des différentes cinétiques thermiques réalisées sur les globules gras natifs issus de laits crus de vache, brebis ou chèvre.

Vésicules de lipides polaires de grande taille :

Des vésicules formées par vortex, ayant un diamètre supérieur à 1 µm (MLV et LUV), ont été observées par microscopie confocale, avec deux objectifs scientifiques distincts.

Une partie des expérimentations avait pour objectif de caractériser la forme, la lamellarité, la taille et la dispersion des vésicules pour déterminer les conditions permettant une bonne stabilité des

vésicules, en particulier la nature du tampon (tampon PIPES *versus* tampon PBS) et la concentration des ions (teneur en calcium) dans le tampon. Dans ce travail, le marquage des lipides polaires des vésicules a été réalisé avec le rouge de Nile (10 µL de solution par mL de suspension de vésicules).

Une seconde partie des expérimentations avait pour objectif de caractériser les séparations de phase des lipides dans des membranes hétérogènes. Pour cela, des vésicules composées par un mélange binaire de milk SM et de DOPC ont été préparées. Deux sondes fluorescentes ont été utilisées. La sonde Rh-DOPE avait pour objectif de marquer la phase fluide composée de DOPC, et la sonde Top Fluor SM a été utilisée pour marquer la phase gel de milk SM. La sonde fluorescente Top Fluor SM (N-[11-dipyrrometheneborondifluoride-undecanoyl]-D-erythro sphingosylphosphorylcholine, Avanti Polar Lipids, Birmingham, Angleterre) est une molécule de sphingomyéline marquée au niveau de la queue hydrophobe (Figure 36). Elle est excitée à une longueur d'onde d'excitation de λ= 488 nm avec une longueur d'onde d'émission à λ=503 nm. La structure et la nature physique de cette molécule (Tm = 35°C) lui permet de s'introduire dans les membranes composées de lipides saturés et par conséquent de marquer la phase ordonnée (gel) à T < Tm. Quelques microlitres des solutions fluorescentes de Rh-DOPE et Top fluor SM ont été mélangées avec les solutions mères de milk SM et de DOPC. Les solvants ayant permis la solubilisation des lipides polaires et des sondes fluorescentes ont été évaporés à l'abri de la lumière pour éviter l'altération des sondes (photobleaching). Ce double marquage Rh-DOPE/ Top Fluor SM a été réalisé afin de marquer spécifiquement les différentes phases de membranes hétérogènes, telles que celles produites à partir d'un mélange binaire milk SM/DOPC.

3.2.2.2. Analyses chimiques

La détermination des classes de lipides polaires ont été réalisées en utilisant une chromatographie liquide haute performance (HPLC) en utilisant la chaîne de chromatographie Agilent (HP 1100, Agilent, Massy, France), combinée avec un détecteur de diffusion de lumière par évaporation (ELSD; PL-ELS1000, Polymer Laboratories, Marseille, France) selon la méthode détaillée par (Lopez et al., 2014, 2008). Une précolonne et une colonne de silice 150 × 3 mm avec des particules de 3 µm de diamètre a été utilisée (AIT, Houilles, France). Brièvement, de l'air comprimé sec et propre était utilisé comme gaz de nébulisation de l'échantillon, à un débit de 1.7 $mL.min^{-1}$ et une température de 50°C. Puis la température était portée à 85°C pour l'évaporation. Après injection, l'échantillon était élué par un mélange chloroforme/méthanol/tampon (1 M acide formique, neutralisé à pH 3 par de la triethylamine) en composition variable durant l'analyse. L'identification des pics était réalisée à l'aide de standards, qui ont également fourni les courbes d'étalonnage

nécessaires à la quantification de chaque classe. La somme des concentrations en glycérophospholipides (PE, PI, PS, PC) et de la milk SM a été considérée comme la concentration totale de lipides polaires dans les laits.

La teneur en matière grasse dans les laits liquides a été déterminée à l'UMR STLO à l'aide de la méthode Gerber (IDF, 2008).

La teneur totale en lipides totaux des laits a été déterminée à l'UMR STLO par adaptation de l'extraction à froid de Folch (Folch et al., 1957) avec un protocole décrit dans Lopez et al., (2014).

La quantité de cholestérol dans le lait lyophilisé a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (NF EN ISO 12228-1) par le Centre technique ITERG (Pessac, France).

3.2.2.3. Granulométrie laser

Principe : La diffraction laser détermine les distributions granulométriques des particules de tailles comprises entre 0.05 et 900 µm en mesurant la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées. Chaque particule, en fonction de sa taille, diffuse la lumière avec une intensité variable selon l'angle d'observation. La lumière diffusée est recueillie par un détecteur multi-éléments, avec I( ) McKS(q) où I( ) est l'intensité de lumière diffusée en fonction de l'angle , c la concentration en particules, K une constante d'appareillage, et S(q) le facteur de forme. L'image de diffraction obtenue est transformée en utilisant un modèle optique et une procédure mathématique appropriés (théorie de Mie ou théorie de Fraunhofer), qui permet de déduire la dimension des particules par ajustement. Ces modèles théoriques s'appliquent lorsque les particules sont opaques, sphériques et d'un diamètre est supérieur à la longueur d'onde utilisée (pour favoriser l'incidence rasante). Elles doivent également diffuser la lumière avec la même efficacité (contraste). Le résultat, illustré sous forme de courbe semi-logarithmique, est une distribution de particules en volume (diamètre d'une sphère de volume équivalent). Ainsi, différents paramètres en plus de la distribution de taille, sont extraits par le logiciel d'acquisition : le diamètre modal correspondant à la population de gouttelettes le plus présent dans la distribution de tailles, le diamètre moyen pondéré en surface d_{32} (µm), le diamètre moyen pondéré en volume d_{43} (µm) et la surface spécifique SSp (m^2/g).
Ces paramètres sont définis par les équations suivantes :

où ni est le nombre de gouttelettes de classe i, di est le diamètre des gouttelettes de classe i et Vi est le volume des gouttelettes de classe i.

Application : Dans ce travail, les expériences de granulométrie laser ont été réalisées à température ambiante pour déterminer les distributions de diamètre des globules gras de trois laits : de brebis, chèvre et vache. L'appareil utilisé (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, UK) était équipé d'un laser He / Ne (λ = 633 nm) et d'une diode électroluminescente (λ = 466 nm). Les indices de réfraction des matières grasses du lait ont été fixés à 1.46 (à 466 nm) et à 1.458 (à 633 nm). Pour l'eau, l'indice de réfraction a été fixé à 1.33. Dans la cellule de mesure, quelques gouttes des échantillons des laits entiers sont dispersées dans environ 100 mL d'eau milliQ jusqu'à obtenir 7% d'obscuration. Une solution de tampon EDTA / NaOH 35 mM à pH 7,0 (pureté> 98% de dihydrate de sel disodique, Prolabo, Fortenay-sous-Bois, France) a été ajoutée à la cellule de mesure pour dissocier les micelles de caséine. Toutes les analyses ont été effectuées en triple.

3.2.2.4. Diffusion dynamique de la lumière

Principe: La diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light spectroscopy*, DLS), également appelée diffusion quasi élastique de la lumière (QELS), est une technique non destructive de mesure de la distribution de la taille de particules submicroniques généralement dispersées dans un liquide. Cette technique est basée sur les interactions matière-rayonnement décrites par Maxwell. Elle consiste à mesurer l'intensité de la lumière diffusée par les particules présentes dans un volume fixe d'échantillon, et détectée au cours du temps sous un angle donné (Figure 37).

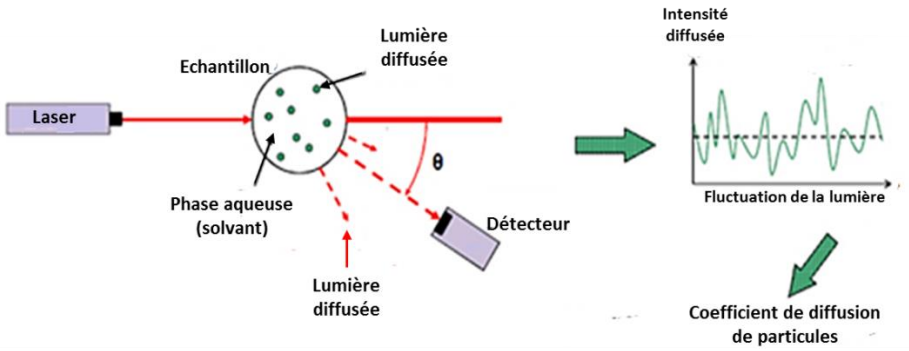


Figure 37 : Illustration du principe de la diffusion dynamique de la lumière (https://fys.kuleuven.be/vsm/fun/characterisation/DLS).

Sous l'effet de l'agitation thermique, les particules effectuent un mouvement aléatoire qu'on appelle brownien. A un instant t, l'intensité de lumière diffusée est fonction du nombre de

particules présentes dans le volume d'échantillon et de leurs positions relatives. Le photocorrélateur compare, à chaque instant, l'intensité de la lumière diffusée avec celle mesurées aux intervalles t précédents et établit la durée caractéristique, ou son inverse le temps de relaxation, à partir de laquelle la corrélation est perdue, ce qui traduit un changement significatif de la position des particules dans l'espace. Plus les particules sont petites, plus elles diffusent vite et plus cette durée est courte. Ce mouvement brownien est ainsi caractérisé par le coefficient de diffusion $_0$, exprimé en $^2/$. $_0$ est lié à l'évolution linéaire du déplacement carré moyen des particules au cours du temps:

Où r (t) est la position variable de la particule définie par les coordonnées x, y, z.

A partir de ce coefficient de diffusion, on peut remonter au diamètre hydrodynamique Dh des particules, grâce à la relation de Stokes-Einstein, en faisant l'hypothèse qu'elles sont sphériques:

Où K_B est la constante de Boltzmann, T la température et la viscosité dynamique du fluide. D_h le diamètre hydrodynamique de la particule.

Application : Dans cette étude, la distribution des diamètres et le diamètre hydrodynamique moyen (Dh) des vésicules (SUV) ont été mesurés dans un tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à 20°C sur un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Les mesures ont été effectuées à un angle de diffusion de 173° et une longueur d'onde de 633 nm. La moyenne Dh (±5 nm) a été calculée à l'aide de la méthode des cumulants. La viscosité de la phase dispersante était de 1.003 mPa.s à 20°C et l'indice de réfraction du solvant était de 1.33.

3.2.2.5. Mobilité électrophorétique

Principe : Le potentiel zêta des vésicules a été calculé à partir de leur mobilité électrophorétique, avec le zetasizer NanoZS. Ce paramètre est un indicateur de la charge nette des particules, diffusant avec leur couche de co-ions, prise au niveau du plan de glissement entre la particule mobile et le solvant. La détermination du potentiel zêta nous aide à contrôler la stabilité des suspensions de vésicules, en établissant les conditions d'attraction ou de répulsion électrostatique entre les particules. Dans cette approche, la suspension de particules est placée entre deux électrodes et un

champ électrique est appliqué qui met les particules chargées en mouvement. La vitesse de déplacement, ou mobilité électrophorétique μ_e, est mesurée en $m^2.V^{-1}.s^{-1}$ et ne dépend, pour un voltage, une température et un solvant donnés, que du potentiel zêta de la particule, selon la relation de Smoluchowski :

où $_r$ est la constante diélectrique du solvant, $_0$ est la constante diélectrique du vide et η est la viscosité de la phase aqueuse. Cette relation n'est valide que pour une longueur de Debye k_d négligeable au regard du rayon r des particules ($k_d.r >> 1$), ce qui est le cas pour les liposomes dans un tampon PIPES (k_d de l'ordre de 1-1.5 nm en fonction de la concentration en calcium). ***Application :*** Pour calculer le potentiel zêta des vésicules, le zetasizer NanoZS nécessite plusieurs paramètres : f ($k_d a$) = 1.5 (approximation de Smoluchowski) ; indice de réfraction des liposomes = 1.45 ; indice de réfraction de l'eau = 1.33 ; viscosité de la phase aqueuse = 1.003 mPa.s ; constante diélectrique de la phase aqueuse = 78.5. La tension électrique appliquée était de 40 V et la température était de 20°C.

3.2.2.6. Calorimétrie différentielle à balayage

Principe : La calorimétrie différentielle à balayage (*differential scanning calorimetry*, DSC) est une technique d'analyse thermique. Elle permet de déterminer les transitions qu'un échantillon peut subir sous l'effet d'un programme de chauffage ou de refroidissement dans une atmosphère contrôlée. Le principe de cette technique consiste à mesurer, au cours d'une variation programmée de température, la différence entre l'échange de chaleur entre un échantillon et l'équipement, et l'échange de chaleur entre une référence et l'équipement, pour que le l'échantillon soit à la même température que la référence (Figure 38). Le dispositif d'un DSC est composé d'une enceinte isolée dans laquelle existe un récipient témoin contenant l'échantillon et un récipient de référence vide. Au cours des variations thermiques, les matériaux constituant l'échantillon subissent des transitions de phase qui seront accompagnées par des échanges de chaleur (endothermique ou exothermique) plus importants que dans la référence. La libération ou l'absorption de la chaleur pendant ces transformations seront représentées par des signaux appelés « thermogrammes ». Grâce à la DSC, des transformations thermodynamiques de 1er ordre comme la fusion se traduisent par un pic dont la surface est proportionnelle à l'enthalpie de transformation, et dont le maximum correspond à la température caractéristique de la transition (T_m).

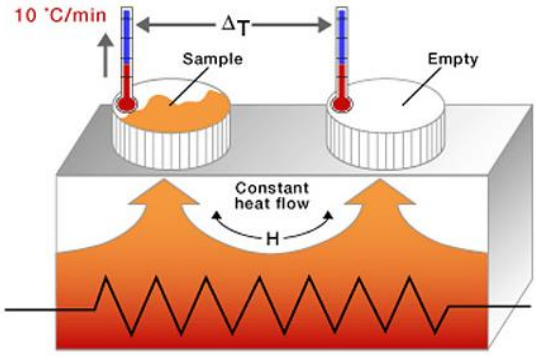


Figure 38: Principe de la calorimétrie différentielle à balayage (http://www.ulttc.com/fr/prestations/methodes-dessai/analyse-thermique.html).

Application : Pour l'analyse thermique des lipides polaires, nous avons utilisé un calorimètre différentiel à balayage DSC Q1000 (TA Instruments, Newcastle, DE, USA). L'étalonnage de ce calorimètre en température et enthalpie est réalisé à l'aide d'indium (température de fusion : 156,66°C, variation d'enthalpie de fusion : 28.41 $J.g^{-1}$). Les poudres de lipides ont été tout d'abord solubilisées dans un mélange méthanol/chloroforme (1:4. v/v) pour préparer les solutions mères. Le volume nécessaire de solution mère des lipides solubilisés a été introduit dans des flacons à scintillation en verre (6 mL ; Wheaton, Milville, NJ, USA) pour préparer les échantillons purs ou en mélange dans des proportions molaires définies (par exemple C16:0-SM/C24:0-SM, 50/50 mol). Le méthanol et le chloroforme sont éliminés par évaporation à 40°C pendant deux heures, sous flux d'azote pour éviter l'oxydation des lipides. Les films lipidiques formés ont été hydratés avec un tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à 65°C pour atteindre une concentration finale de lipides de 20% p/p, puis homogénéisés à l'aide d'un vortex pour former des vésicules multilamellaires (MLV). Les échantillons ont été hydratés pendant au moins 24 heures à température ambiante avant la caractérisation de leurs propriétés thermiques. Les échantillons ont ensuite été introduits dans des capsules en aluminium d'une contenance de 20 µL (capsule : 900793.901, couvercle : 900794.901, TA Instruments). Les capsules sont fermées hermétiquement et placées dans l'enceinte du calorimètre. Une capsule vide a été utilisée comme référence. Les échantillons ont été chauffés à des vitesses inférieures ou égales à 2°$C.min^{-1}$ en balayant une large gamme de températures (par exemple de -40°C à 80°C ; les cinétiques utilisées sont mentionnées dans les résultats). La DSC nous a permis de déterminer les profils (voir chapitre5) et les températures de fusion caractéristiques des différents lipides polaires (i.e. DOPC, DPPC, milk SM, les SM individuelles) et des mélanges (i.e. milk SM/DOPC ; milk SM/DOPC/cholestérol ; C16:0-SM/C24:0-SM, C24:0-SM/C24:1-SM) utilisés au cours de la thèse. Les mesures thermiques ont

été effectuées en triple pour chaque échantillon. Les paramètres standards (température de fusion, enthalpie) ont été déterminés par le logiciel TA (Universal Analysis 2000, v 4.1 D).

3.2.2.7. Diffraction des rayons X (DRX)

Principe : La diffraction des rayons X est une technique principalement utilisée pour déterminer les propriétés structurales des matériaux solides ou fluides structurés à l'échelle nanométrique ou atomique. Elle permet de donner des informations sur les structures, les phases, les orientations privilégiées du cristal (texture) et d'autres paramètres structurels comme la périodicité, la cristallinité, les défauts des cristaux. Le rayonnement X est obtenu lorsque des électrons de forte énergie frappent un atome, et provoquent des transitions électroniques. Les électrons des couches internes sont déplacés de leurs orbites, et remplacés par des électrons de couches plus externes. L'excès d'énergie est transféré sous forme de photons sous forme de rayonnement de haute fréquence, diffusé dans toutes les directions. En fonction des positions relatives des différents éléments diffusants dans l'espace, les ondes de diffusion collectées à un angle donné subissent des interférences additives ou destructives. Plus l'échantillon est organisé spatialement, et plus ces interférences seront marquées, à certains angles, témoins de distances caractéristiques dans la structure. Les pics d'intensité de diffraction des rayons X sont ainsi obtenus des angles spécifiques par rapport aux plans réticulaires d'un échantillon et traduits par des dimensions spécifiques dans la structure du matériau. La longueur d'onde du rayonnement X (0.1-5 Å) est idéalement adaptée à l'étude des structures cristallines périodiques dont les distances inter-réticulaires sont du même ordre de grandeur. On peut déterminer, grâce à la Loi de Bragg, les distances inter-réticulaires des familles de plans cristallins composant les phases présentes dans l'échantillon (Figure 39). De cette façon, on peut remonter jusqu'à la structure cristallographique des matériaux.

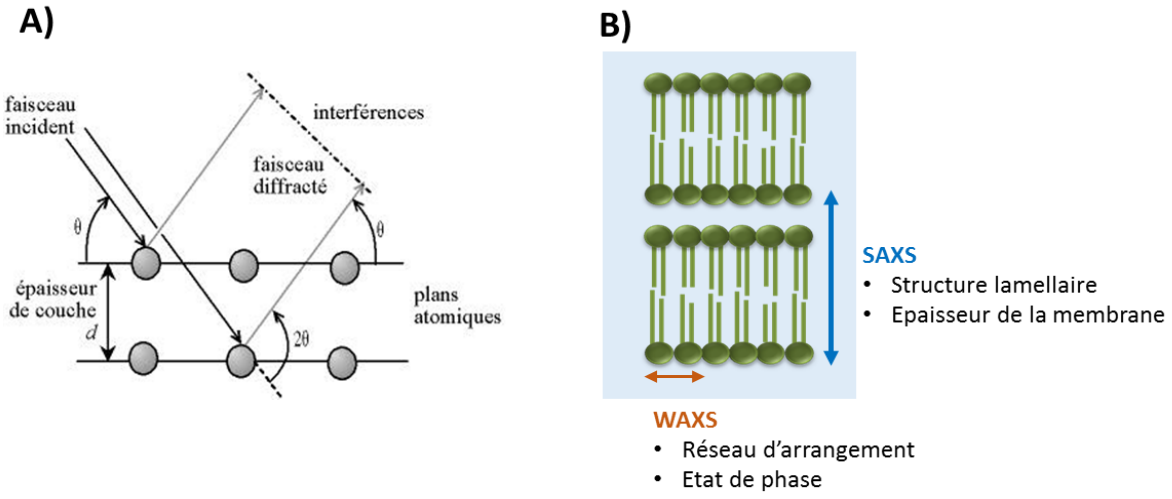


Figure 39: A) Schéma du comportement d'un faisceau de rayons X dans un cristal selon la loi de Bragg. B) exemple des différentes informations qu'on peut obtenir sur les membranes lipidiques par la diffraction des rayons X : aux grands angles WAXS (wide angle X scattering) et aux petits angles SAXS (small angle X scattering).

La loi de Bragg s'exprime selon:

Ou : $d = 2n \ /q$ où $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$

Avec **λ** : la longueur d'onde du faisceau de rayons X (en Å), **d** : la distance inter-réticulaire (en Å), **q :** le vecteur de diffusion (en $Å^{-1}$), : l'angle d'incidence des rayons X (degré) et **n** : l'ordre de diffraction.

Les données d'intensité de rayons X diffractés peuvent être enregistrées soit aux petits angles proche de 0° (Small-angle X-ray scattering, SAXS) soit aux grands angles supérieur à 5° (Wide-angle X-ray scattering, WAXS). Ceci permet une acquisition simultanée des intensités de rayons X diffractés sur une large gamme de vecteurs de diffusion q ($Å^{-1}$).

Application : Les expériences de diffraction des rayons X, réalisées dans ce travail, ont été effectuées sur la ligne de faisceau Guinier montée à l'Institut de Physique de Rennes par Frank Artzner. La longueur d'onde du faisceau incident λ est de 1.54 Å. Un détecteur Pilatus bidimensionnel placé à 232 mm de l'échantillon et permettant l'enregistrement des informations d DRX dans une plage allant de 0.013 $Å^{-1}$ à 1.742 $Å^{-1}$ a été utilisé. Cette gamme de vecteurs de diffusion couvre à la fois les régions des petits et des grands angles d'intérêt pour caractériser à la fois les structures lamellaires, et identifier l'état d'ordre des assemblages lipidiques (phase ordonnée ou désordonnée), respectivement. Les diagrammes de diffraction sont représentés par une série d'anneaux concentriques en fonction du vecteur de diffusion q. L'étalonnage du détecteur a été effectué avec du behenate d'argent. Pour caractériser les membranes lipidiques, des petits volumes (environ 10 µL) d'échantillons contenant des vésicules ont été mis dans de capillaires en quartz de 1.5 mm de diamètre (GLAS W. Muller, Berlin, Allemagne) et qui sont ensuite analysés à des températures contrôlées. Les expériences de DRX ont été réalisées sur les vésicules de DOPC (MLV) ou de DPPC (MLV, SUV) pour déterminer leur état de phase à 20°C.

3.2.2.8. Microscopie électronique en transmission (Cryo-TEM)

Principe : La cryo-TEM (pour *transmission electron microscopy*) est une technique basée sur les interactions électrons-matière et la détection des électrons ayant traversé l'échantillon, réalisée dans des conditions cryogéniques. Un canon produit un faisceau d'électrons qui est focalisé par

des lentilles magnétiques sur un échantillon très mince ; en traversant l'échantillon, les électrons interagissent avec la matière de façon variable en fonction de l'épaisseur, de la composition ou de la densité locales de l'échantillon. Le faisceau d'électrons transmis sera détecté permettant ainsi la formation d'une image. Cette technique atteint des résolutions de l'ordre du nm ou de l'Angström. Dans notre approche, les objets étaient figés dans de la glace amorphe par congélation rapide de la phase aqueuse dans un bain d'éthane liquide, afin de préserver leur morphologie et leur structure à l'état natif. Après la fixation, l'échantillon est ensuite visualisé sous vide par microscopie électronique, en maintenant l'échantillon parfaitement congelé grâce à de l'azote liquide.

Application : L'observation des vésicules (SUV) de lipides polaires (i.e. DOPC et DPPC), préparées selon le protocole décrit dans la section 3.2.1.1, par cryo-TEM a été réalisée par Cédric Gaillard à la plateforme BIBS à l'INRA de Nantes. Le but de cette caractérisation était de vérifier l'unilammelarité des vésicules obtenues par sonication. Les échantillons ont été préparés en utilisant un dispositif de fixation cryoplunge (Gatan, Pleasanton, CA) dans lequel une goutte de la suspension aqueuse a été déposée sur des grilles revêtues de carbone de type Holey (Ted Pella Inc. Redding, CA). Le film liquide formé dans les trous de la grille, a été vitrifié en plongeant rapidement la grille dans l'éthane liquide refroidie par l'azote liquide. La suspension vitrifiée de vésicules a été montée dans un support d'échantillon Gatan 910 qui a ensuite été inséré sous le microscope à l'aide d'un système de cryotransfert CT-3500 (Gatan, États-Unis). Les images TEM ont ensuite été obtenues à partir d'une suspension de vésicules conservée dans une phase vitreuse et suspendues à travers les trous du support. Les échantillons ont été observés dans des conditions de faible irradiation ($<10\ e^- \cdot A^2$), à -178 ° C, en utilisant un JEM 1230. Le microscope "Cryo" (Jeol, Japon) est équipé d'un filament LaB6 fonctionnant à 80 keV. Toutes les images ont été enregistrées par une caméra CCD Gatan 1.35 K × 1.04 K × 12 bits ES500W.

3.2.2.9. Microscopie à force atomique (AFM)

Principe : La microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*, AFM) fait partie de la famille des microscopies à champ proche ou microscopies à sonde locale. L'AFM repose sur l'utilisation des forces d'interactions interatomiques entre une pointe (Figure 40) et une surface. Lorsqu'une pointe s'approche d'une surface, des forces d'interaction provoquent la déflection du micro-levier qui se comportera comme un ressort. Une force de rappel de ressort est donc déterminée par le produit de la raideur de micro-levier et de sa déflection Δz. Cette déviation est suivie par le déplacement d'un faisceau laser, focalisé sur l'extrémité du microlevier et réfléchi sur une photodiode.

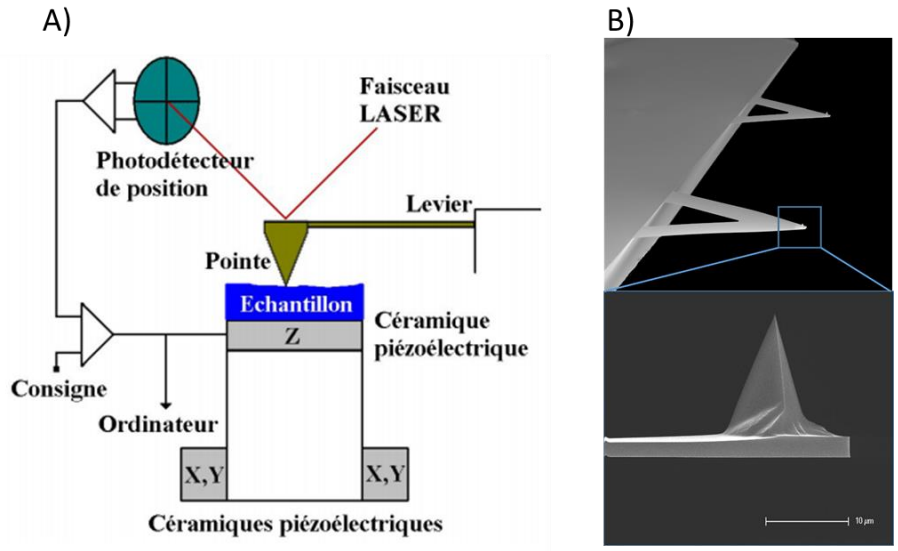


Figure 40: A) les principaux éléments d'un microscope à force atomique, B) Images à l'échelle microscopique des pointes MSNL *(bruker)* dont la raideur est proportionnelle de la longueur (www.brukerafmprobes.com/p-3710-msnl-10.aspx).

A grande distance, les forces d'interaction entre la pointe et la surface sont attractives *via* les interactions de van der Waals (Figure 41). Les attractions ou répulsions électrostatiques peuvent également intervenir à l'approche du contact (Drummond and Senden, 1994; Popa et al., 2010), ainsi que d'éventuelles répulsions stériques, par exemple en cas d'objets recouverts d'une brosse de polymères (Cuellar et al., 2013). A courte distance, lorsque la pointe entre en contact avec la surface, la force revient répulsive à cause des interactions entre les nuages électroniques des atomes respectifs de la pointe et de la surface (principe de Pauli). Si la surface est dure, la pointe s'infléchit sans pénétrer l'échantillon mais la force appliquée s'accroît à mesure que la distance entre la surface et le support de la pointe diminue. Si la surface est molle par rapport à la raideur de la pointe, la pointe indente la surface ce qui permet d'en évaluer les propriétés mécaniques. Enfin, lorsque la pointe est retirée du contact avec l'échantillon, il est possible d'accéder à des mesures de force d'adhésion entre la pointe et l'échantillon, de force d'élongation de boucles de polymères, etc (Dufrêne, 2004).

Pour réaliser une image de la topographie d'un échantillon, la pointe de l'AFM est consignée en force et « lit » la surface de l'échantillon comme en Braille ou en profilométrie. Ainsi, la pointe balaye la surface en conservant la force appliquée constante, c'est-à-dire que la distance entre la surface et le support de la pointe sera corrigée constamment pour conserver la déflection de la pointe constante et ainsi suivre les évolutions du relief de l'échantillon. En imagerie, un microscope à force atomique peut fonctionner selon trois régimes distincts : le mode contact, le mode contact intermittent et le mode non contact (Figure 41). En mode contact, la pointe est physiquement en contact avec la surface, avec une séparation de l'ordre de l'angstrom (Å) ; les

forces de contact sont donc des forces répulsives. Dans le mode « non-contact », comme l'indique son nom, la pointe ne touche pas la surface de l'échantillon mais est attirée par lui, ce qui permet la consignation d'une force. Le mode non-contact met en jeu un micro-levier oscillant avec une fréquence donnée, de l'ordre du kHz à la centaine de kHz selon la raideur de la pointe. Enfin, le mode contact intermittent (ou *tapping mode*) correspond à une combinaison des deux modes précédents. La distance entre la pointe et la surface est de 0.3 – 100 nm. Ce mode se base sur des contacts périodiques entre la pointe et l'échantillon. Lorsque le contact est établi, l'amplitude de l'oscillation diminue pour atteindre sa valeur de consigne. Ainsi, la hauteur de l'échantillon est réajustée constamment pour maintenir constante l'amplitude d'oscillation tout au long des variations de relief. Ce mode est adapté aux échantillons saillants et fragiles, car il évite d'éroder la surface. Ce mode a connu une évolution récente par l'introduction du *peak force tapping*, où le levier est « pseudo-oscillé » par des contacts fréquents (Hz-kHz) en courbes de force appliquées sur l'échantillon.

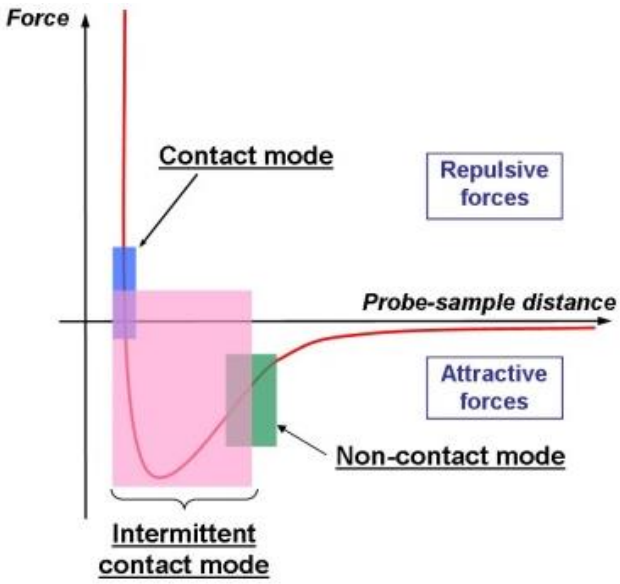


Figure 41: Forces d'interactions entre la pointe et la surface de l'échantillon, lors de la phase d'approche de la pointe AFM vers la surface (http://perso.univ-lemans.fr/~bardeau/IMMM-PEC/afm/afmintroduction.html).

En plus de l'imagerie, l'AFM est aussi un outil de mesure de forces qui permet, appliqué comme un nano-indenteur, de déterminer les propriétés mécaniques d'un échantillon. Ces mesures de forces sont réalisées, à une position fixe, par des cycles d'approche/retrait de la surface vis-à-vis de la pointe. Les courbes de forces obtenues par indentation peuvent être traitées afin d'extraire les paramètres mécaniques caractérisant l'échantillon (Section 1.3.2, chapitre1). En balayage point par point, ou en *peak force tapping*, cette technique permet également d'effectuer des cartes en

force-volume où elle combine pour chaque pixel la mesure de force avec la topographie (exemple de la Figure 42).

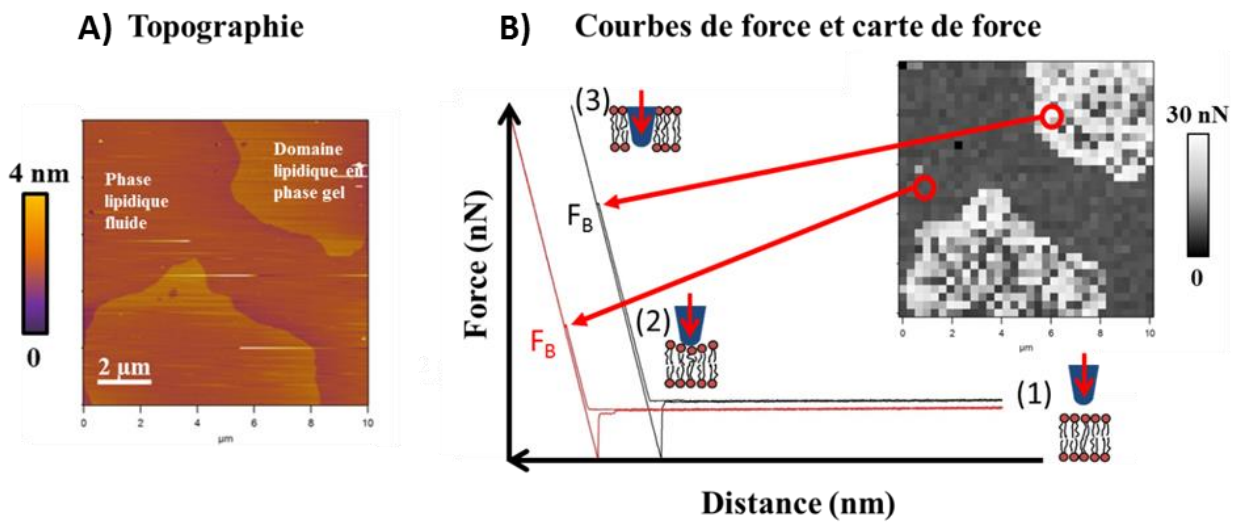


Figure 42 : Des images bidimensionnelles obtenues par AFM (10 × 10 µm^2) de la surface d'une membrane lipidique bi-phasique. (A) l'image par mode contact, (B) l'image par mode force-volume. Chaque pixel représente une courbe de force-distance d'où on peut extraire la rigidité de la membranes (position 2) ou la force de rupture F_B (position 3) (figure adaptée de Lopez et al., 2015).

La microscopie AFM est caractérisée par une haute résolution spatiale qui lui permet d'atteindre des échelles nanométriques pouvant aller jusqu'à l'Ångström, pour des échantillons parfaitement immobilisés, de ratio d'aspect élevés (i.e. plutôt plans) et pour des pointes fines (largeur de l'ordre du nm). De même, les micro-leviers sont caractérisés par une certaine raideur ($k \sim 10^{-3}$ à 10^{2} N.m^{-1}) ; des sondes très souples ont ainsi une très grande sensibilité mécanique et peuvent mesurer des forces de l'ordre du nN ou de la centaine de pN.

Application : L'appareil utilisé dans ce travail est un microscope MFP-3D Bio AFM (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA). Les échantillons ont été imagés en mode contact avec une vitesse de balayage de 1 Hz. Nous avons réalisé des images de taille allant de 20 × 20 µm^2 à 1 × 1 µm^2 avec une résolution de 256 × 256 pixels. Le choix de la sonde était fait en fonction des mesures d'indentation souhaitées. Dans le cas de mesures en perforation, pour déterminer une force de rupture (ou brakthrough force, F_B), nous avons choisi une pointe MSNL de 2 nm de rayon (Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA, USA). Pour les mesures en indentation, afin de calculer un module de Young, nous avons opté pour une sonde plus large donc plus sensible, la MLCT de 20 nm de rayon (Bruker – Figure 43). Sauf mention contraire, la raideur nominale de ces sondes était choisie à 0.03 N.m^{-1}.

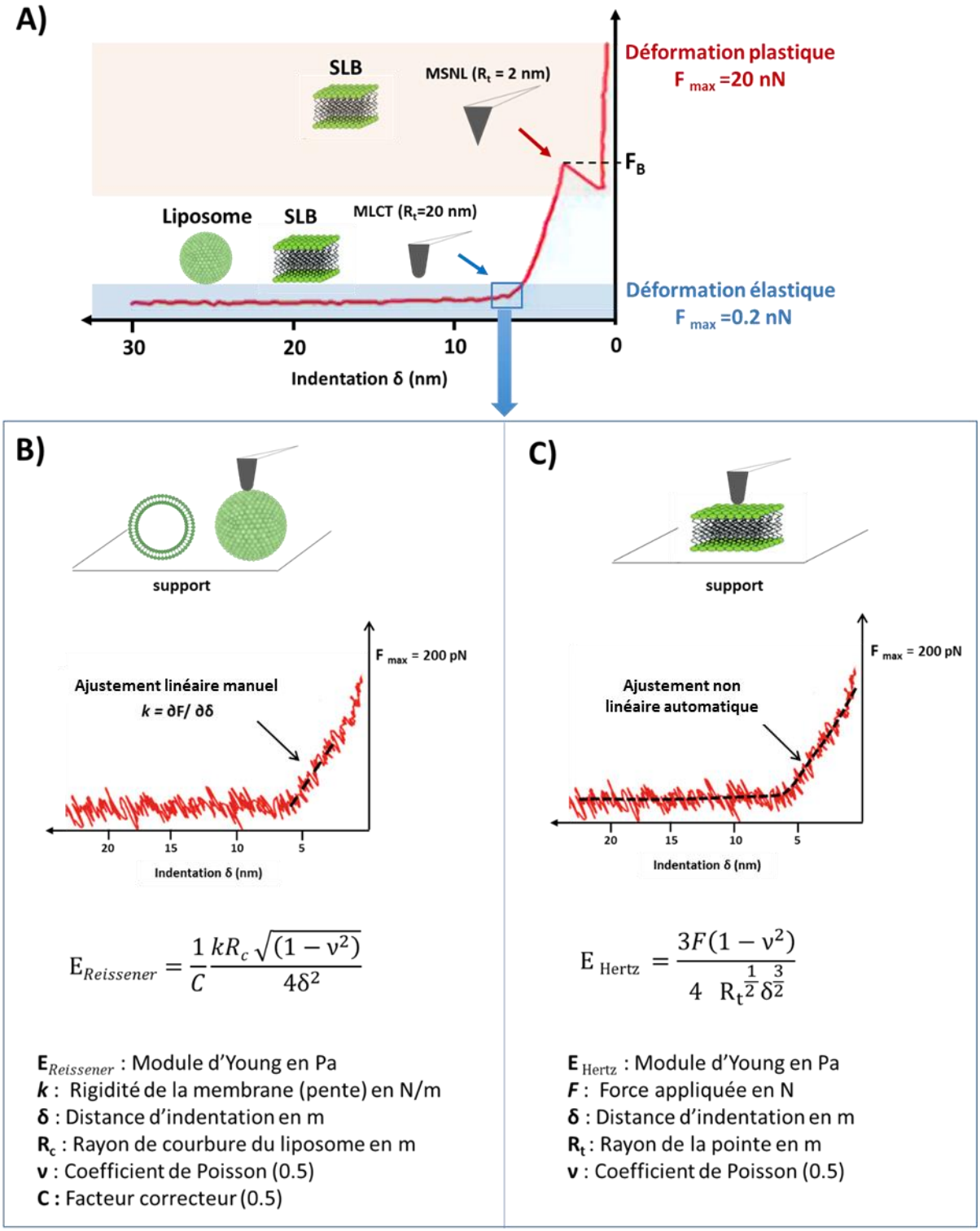


Figure 43 : A) Acquisition des données mécaniques dans deux régions de déformation différentes: plastique pour extraire les forces de rupture (F_B, breakthrough force) réalisée unqiuemen sur les SLBs, ou élastique pour déduire les modules de Young des membranes en SLB ou en liposome. B) et C) Traitement des coubres de forces obetenues sur des liposomes par le modèle de Reissner ou sur les SLBs par modèle de hertz

Ces sondes ont été calibrées par la méthode des fluctuations thermiques qui consiste à mesurer les fluctuations de la déflection du micro-levier au repos. L'amplitude des fluctuations d'origine thermique est directement reliée à la constante de raideur du micro levier par la relation: $K<Z> = k_B T$, où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue, Z^2 la moyenne des carrés des positions du micro-levier par rapport à sa position moyenne prise comme référence (Z=0), et K une constante proportionnelle à la constante de raideur du ressort. Pour mesurer la force de rupture, nous avons généralement appliqué des forces relativement élevées, de l'ordre de 20 nN. Tandis que pour la mesure de l'élasticité, nous avons utilisé des consignes de force beaucoup plus faibles de l'ordre de 200 pN, pour éviter la perforation des membranes lipidiques.

Acquisition des données sur les bicouches lipidiques supportées (SLB)

: L'acquisition des données mécaniques a été réalisée sur des bicouches de lipides supportées (SLB), formées sur une surface plane de mica. Après avoir formé les SLB, nous avons effectué des mesures de force à 20°C, sauf dans le chapitre 6 où les caractérisations topographiques et mécaniques de certains échantillons ont été réalisées à 20°C et 50°C, à l'aide de platines chauffantes (Peltier Cooler-Heater cell et Bioheater cell, Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA). Les analyses étaient réalisées en milieu liquide (tampon PIPES à pH 6.7) dans le régime élastique (calcul du module de Young E ; consigne de force = 200 pN ; vitesse = 2 $\mu m.s^{-1}$; distance = 100 nm ; Figure 43). Les images ont été obtenues tout d'abord en mode contact avec une pointe MLCT puis en force-volume, sur la même surface. L'analyse AFM a ainsi été effectuée sur des zones allant de 10 × 10 μm^2 à 3× 3 μm^2 (32 × 32 pixels).

Le traitement des données mécaniques se fait automatiquement sur les courbes de force obtenues par le logiciel AR qui calcule le module de Young en ajustant le modèle classique de Hertz présenté dans la Figure 43.

Mesure de la force de rupture ou *breakthrough force* F_B : pour cette mesure, une sonde MSNL était utilisée et les courbes de force étaient réalisées avec un appui plus élevé (20 nN) et sur de plus longues distances pour s'assurer de perforer la bicouche. Le relevé des F_B était réalisé manuellement sur les courbes de force-séparation (Figure 43).

Acquisition des données sur les liposomes (SUV)

Pour visualiser les liposomes par AFM, nous avons utilisé des cellules ouvertes composées de morceaux de substrat de silicium (environ 0.5 × 1 cm^2 ; orientation moléculaire 100) collés sur des

lames de diagnostic (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ces surfaces de silice sont préalablement nettoyées à l'éthanol, rincées à l'eau déionisée milliQ puis nettoyées par exposition UV / O_3. La suspension de vésicules unilamellaires de petite taille (SUV, liposomes) a été déposée sur la silice propre puis laissée incuber à 20°C pendant 30 min. Nous avons ensuite échangé 3 fois la goutte déposée en utilisant du tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à 20°C afin d'éliminer les liposomes non adsorbés, sans démouiller la surface. Dans un premier temps, nous avons acquis des images sur de larges champs afin de repérer les liposomes à indenter, en utilisant une sonde MLCT (k~0.03 $N.m^{-1}$). Ensuite, sur des champs plus petits, les expérimentations ont été réalisées en se focalisant sur des liposomes individuels. Ainsi, la sonde AFM a e été positionnée au sommet de chaque liposome ciblé, pour réaliser plusieurs courbes de force =Les forces étaient mesurées sur une distance de 100 nm, avec une consigne de 200 pN et une vitesse de 2 $\mu m.s^{-1}$. Dans ces conditions, l'indentation de la pointe AFM dans le liposome n'a pas dépassé d~ 6 nm, permettant ainsi de mesurer les propriétés mécaniques dans le régime élastique de la bicouche de lipides polaires (i.e. la membrane non supportée). Pour calculer l'élasticité, les courbes d'approche ont été traitées en utilisant la théorie de Reissner pour une particule sphérique (Chapitre I, section 1.3.2 ; Figure 43) :

Où R est le rayon de courbure de la membrane, k la raideur de la membrane (pente de la relation force-distance), ν coefficient de poisson qui vaut 0.5, et d l'épaisseur de la membrane (distance d'indentation d=δ), 1/C est le facteur correcteur prenant en compte les forces rétro-exercées du support avec C estimé, selon Berry et al., (2017), à une valeur de 0.5 pour le cas de nos vésicules faisant des tailles moyennes de l'ordre de 150 nm, d'une épaisseur de membrane de 5-8 nm et d'un rayon de pointe AFM de 20 nm. Pour appliquer ce modèle, nous avons eu besoin de certains paramètres propres à la membrane comme la rigidité, déterminée par la pente de la droite enregistrée juste après le contact (pointe/échantillon) de la courbe de force-distance (Figure 43) ; le rayon de courbure et l'épaisseur.

- Comme les liposomes adsorbés sur un substrat se déforment pour adopter une géométrie de calotte sphérique d'environ 400 nm de diamètre et de 100 nm de hauteur, le rayon de courbure R_c a été calculé à partir des paramètres géométriques extraits par l'analyse d'une section de l'image d'un liposome (Figure 44), comme la hauteur (H) et la largeur à la base du liposome individuel (W) (Chen and Vancso, 2011), en utilisant la formule :

Nous avons également utilisé le logiciel d'analyse d'images Gwyddion 2.47 pour déduire le rayon de courbure local (Figure 44), sur une distance de ~ 130 nm des deux côtés du sommet (130 nm étant le rayon estimé de la zone affectée par indentation d'une sonde MLCT de 20 nm de rayon).

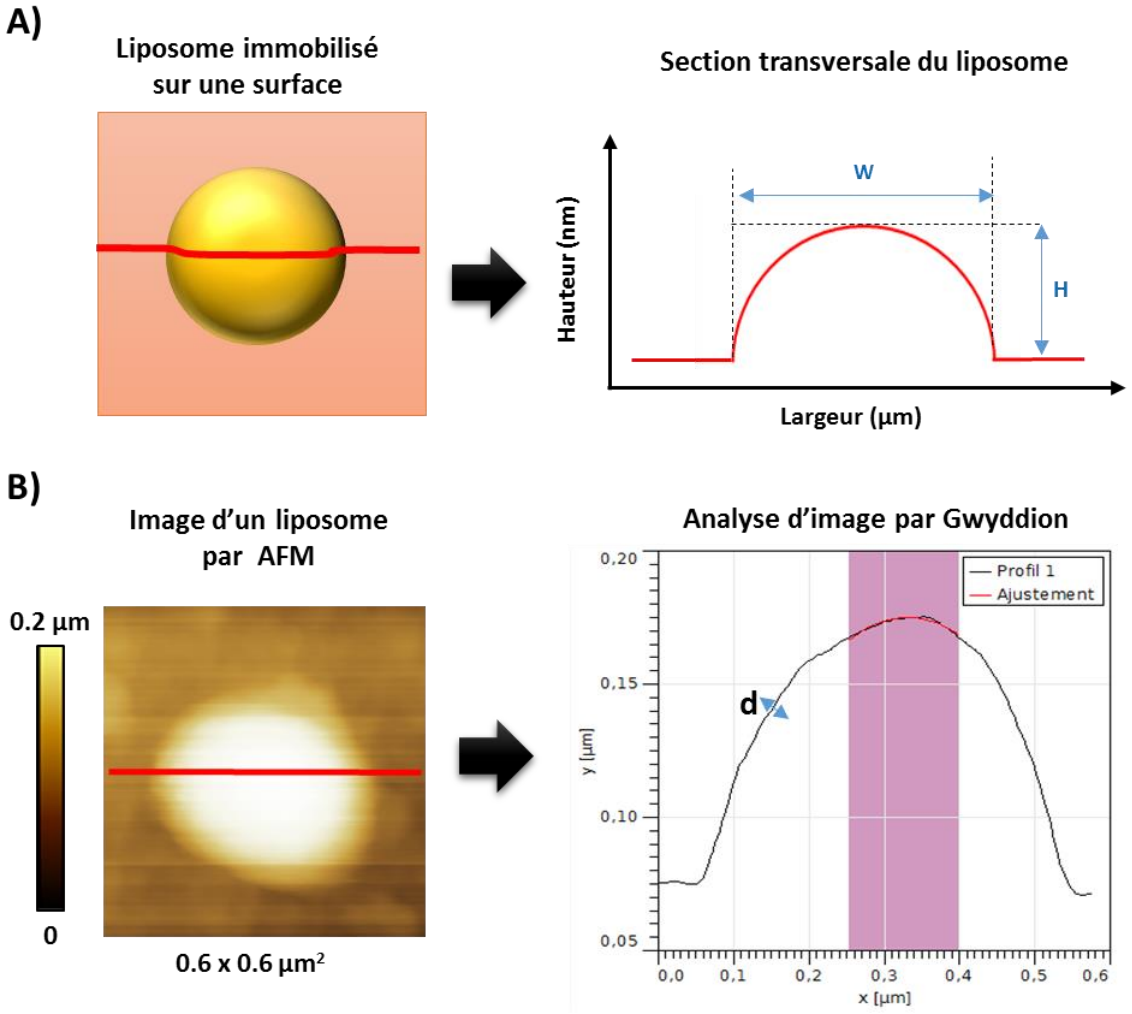


Figure 44: A) Extraction des paramètres géométriques d'un liposome par analyse de section transversale ; B) rayon de courbure local déterminé par l'ajustement (fit) du sommet (~260 nm) du liposome d'une membrane d'épaisseur d, en utilisant le logiciel d'analyse d'images Gwyddion 2.47.

- L'épaisseur (d) de la membrane de lipides polaires a été déterminée à partir des SLB, de deux manières différentes : i) par analyse d'une section de l'image d'un patch membranaire, en calculant la différence de hauteur entre le substrat et la surface de la bicouche ; ou ii) par analyse des courbes de force dans lesquelles la distance d'indentation associée un événement de rupture peut être assimilée à l'épaisseur de la bicouche de lipides (Figure 45).

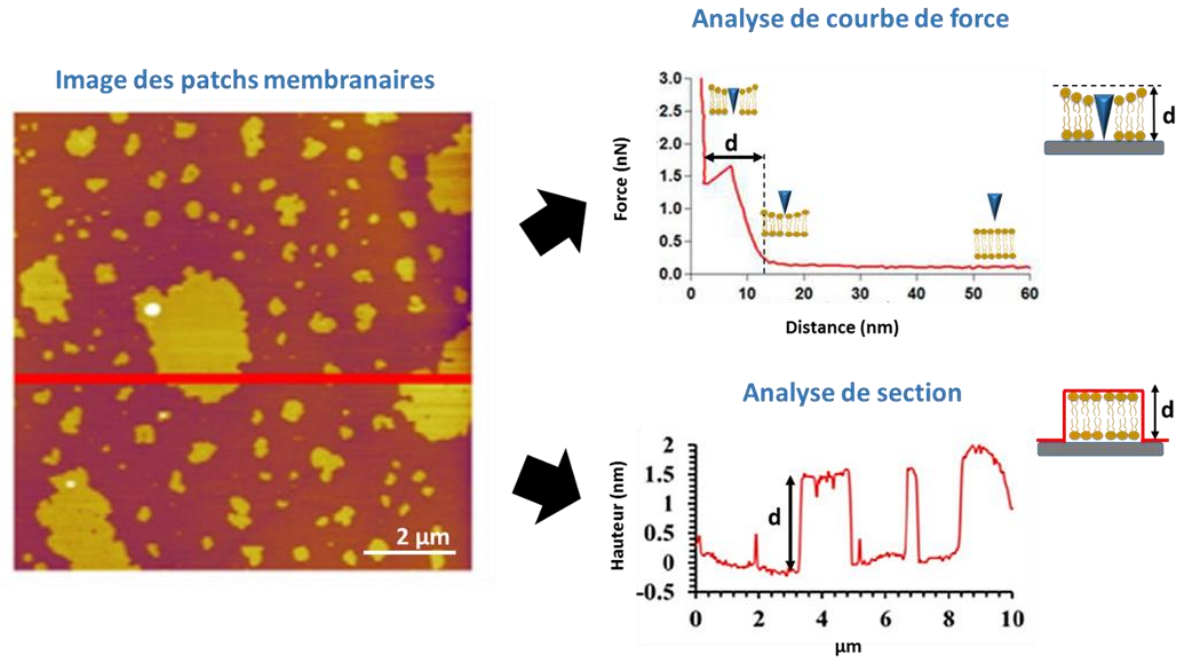


Figure 45: Différents moyens utilisés pour extraire la valeur de l'épaisseur des membranes lipidiques (adapté de Murthy et al., 2015).

Considérée comme plus juste par la plupart des auteurs, la mesure de la distance associée à la rupture d'une bicouche a été préférée. Cependant, des bicouches de sphingomyéline en phase gel n'ont pas donné de courbe de qualité suffisante, car la rupture était difficile à identifier où le levier trop souple pour se comporter linéairement sur certaines phases gel. Dans ce cas, nous avons opté pour une mesure sur des profils de hauteur réalisés sur des patches membranaires.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

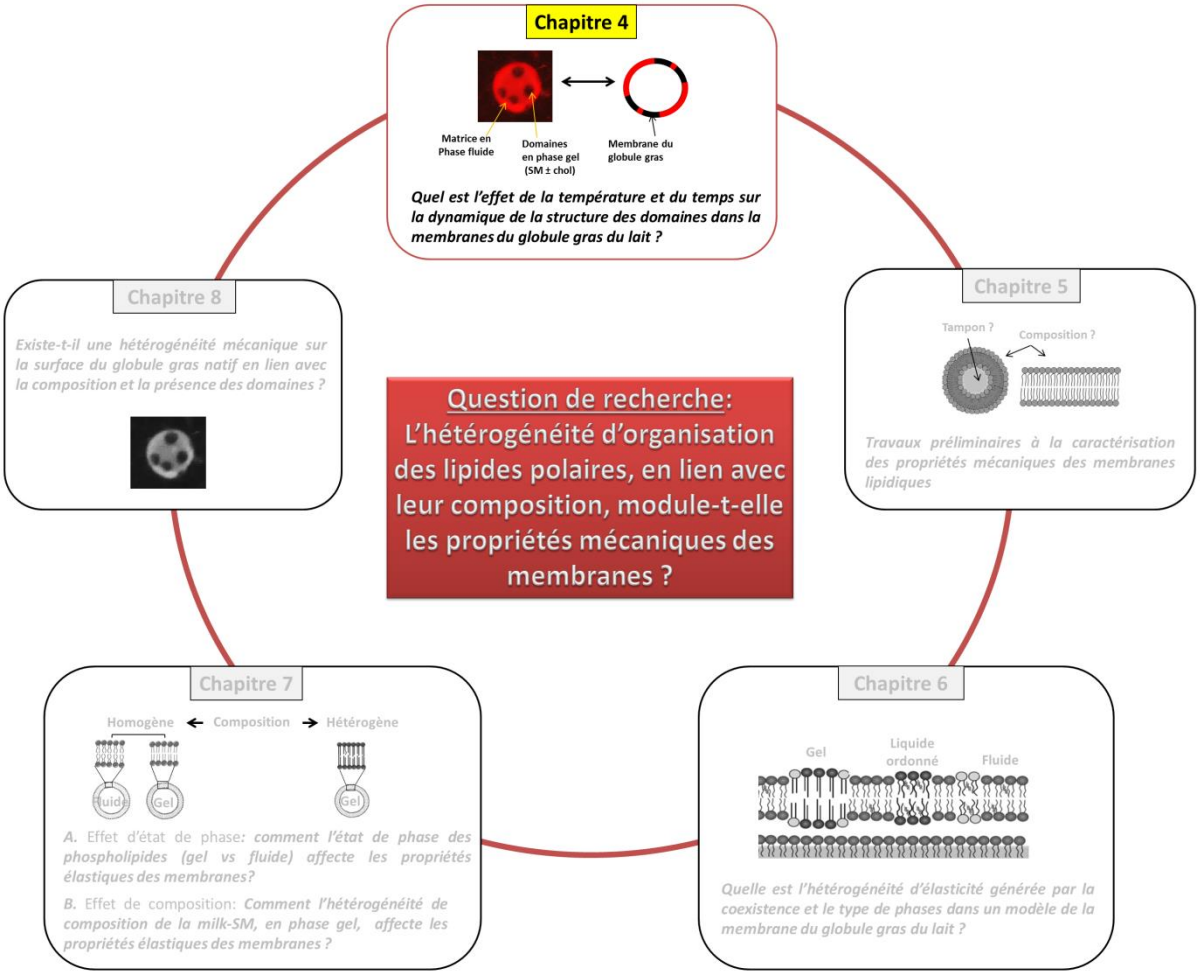
Chapitre 4: Quel est l'effet de la température et du temps sur la dynamique de la structure des domaines dans la membrane du globule gras du lait ?

4.1. Introduction

Dès sa production par la femelle mammifère (vache, chèvre, brebis …) à la température physiologique d'environ 37°C, le lait est stocké dans un tank où il est refroidi à 4°C. Dans l'usine de transformation, le lait peut subir différents traitements thermiques de chauffage (e.g. pasteurisation, UHT) et être soumis à des périodes de stockage à basse température. Ces variations de température peuvent affecter les propriétés physico-chimiques de ses composants, en particulier les globules gras. La membrane biologique qui entoure les globules gras du lait (MFGM) assure leur stabilité physique. L'organisation latérale de cette membrane est caractérisée par une hétérogénéité de structure induite par la présence de plusieurs espèces moléculaires de lipides polaires ayant des propriétés physiques différentes, notamment leur température de transition de phase Tm (Lopez et al., 2011). Par conséquent, tout changement de température peut affecter la structure membranaire, avec des conséquences directes sur les propriétés fonctionnelles du globule gras du lait (Anderson et al., 1972; Bolling et al., 2005; Lee and Sherbon, 2002). Les travaux réalisés par microscopie confocale pour caractériser les domaines riches en milk SM à la surface des globules gras dans le lait ont majoritairement été réalisés à température ambiante (Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2010; Nguyen et al., 2015; Zou et al., 2015, 2012). Peu de travaux se sont focalisés sur l'effet de la température (Nguyen et al., 2016).

Cette partie du travail de thèse vise à montrer comment la microstructure de la membrane du globule gras peut être modifiée en fonction de la température et du temps de stockage à basse température. Nous avons ainsi exploré, *in-situ* dans le lait, l'organisation des lipides polaires dans la membrane des globules gras par microscopie confocale en fonction de cinétiques en température et du temps pour mimer la thermodynamique des procédés industriels. En utilisant un phospholipide exogène comme sonde fluorescente, la rhodamine-DOPE (Lopez et al., 2010), nous avons marqué la phase continue de la MFGM ce qui nous a permis de distinguer les zones non fluorescentes qui correspondent aux domaines riches en milk SM et de suivre leur évolution. La microstructure de la MFGM a été caractérisée dans une large gamme de températures allant de 4°C à 60°C. Nous avons étudié l'effet du chauffage, du refroidissement et du temps de stockage à basse température. Ces analyses de microstructure ont été réalisées sur trois types de laits provenant de différentes espèces : brebis, chèvre et vache, différant légèrement en composition

lipidique, notamment le milk SM et le cholestérol. La comparaison de ces trois laits nous a permis d'explorer un lien possible entre la composition chimique et la microstructure des membranes.



Les résultats de cette étude ont fait l'objet de plusieurs communications scientifiques :

- 4 posters ont été présentés:
  - i) aux 7èmes Rencontres de la Biologie et la Physique du Grand Ouest (RBPGO), les 23-24 juin 2016 à Nantes, France ;
  - ii) au congrès mondial de la fédération internationale du lait (IDF world dairy summit), les 16-21 octobre 2016 à Rotterdam, Pays-Bas ;
  - *iii)* au colloque « Lait, vecteur de développement », les 10-12 mai 2017 à Rabat, Maroc.
- Ce travail a été publié dans le journal *« Food Chemistry » : Et-*
  & Lopez, C. (2017). Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time. Food chemistry, 220, 352-361.

4.2. Article 1 : Domaines lipidiques dans la membrane des globules gras du lait: étude de la dynamique in situ dans le lait en fonction de la température et du temps

Food Chemistry 220 (2017) 352–361

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated *in situ* in milk in relation to temperature and time

Oumaima Et-Thakafy, Fanny Guyomarc'h, Christelle Lopez *

STLO, INRA, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 June 2016
Received in revised form 29 September 2016
Accepted 4 October 2016
Available online 4 October 2016

Keywords:
Sphingomyelin
Cholesterol
Phase separation
Lipid phase transition
Confocal microscopy

ABSTRACT

The microstructure of the milk fat globule membrane (MFGM) is still poorly understood. The aim of this study was to investigate the dynamics of the MFGM at the surface of milk fat globules in relation to temperature and time, and in relation to the respective lipid compositions of the MFGM from bovine, goat and sheep milks. *In-situ* structural investigations were performed using confocal microscopy. Lipid domains were observed over a wide range of temperatures (4–60 °C). We demonstrated that rapid cooling of milk enhances the mechanisms of nucleation and that extended storage induces lipid reorganization within the MFGM with growth, leading to circular lipid domains. Diffusion of the lipid domains, coalescence and reduction in domain size were observed upon heating. Different MFGM features could be related to the respective cholesterol/sphingomyelin molar ratio in the three milk species. These structural changes may affect the interfacial properties of the MFGM, with consequences for the functional properties of fat globules and the mechanisms of their digestion.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Milk fat globules are the biological assembly of lipids secreted by female mammals to provide the dietary energy (about 50% in human milk) and bioactive molecules that are essential for the growth and health of suckling neonates. They are also involved in the manufacture of many dairy products (e.g. cream, butter, cheese) that are consumed by children and adults (Lopez, Cauty, & Guyomarc'h, 2015). Milk fat globules have a core that is rich in triacylglycerols (TAG) and are enveloped by a biological membrane known as the milk fat globule membrane (MFGM). The relationship between the lipid composition of the MFGM and its organization remain poorly understood despite its importance in dairy technology and food quality and in the mechanisms of milk lipid digestion in the gastrointestinal tract, and despite its possible implications for biological functions, human nutrition and health.

The MFGM is composed of a range of polar lipids, cholesterol, and membrane-specific proteins (Dewettinck et al., 2008; Jensen & Newburg, 1995). The main polar lipids are phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and sphingomyelin (milk-SM; main milk sphingolipid), while anionic phosphatidylserine (PS) and phosphatidylinositol (PI) are quantitatively minor polar lipids (Dewettinck et al., 2008; Lopez, 2011). From a structural point of view, the MFGM is thought to be organized as a trilayer of polar lipids, with a monolayer in contact with TAG originating from the endoplasmic reticulum and a bilayer originating from specialized regions of the apical plasma membrane of mammary epithelial cells (Heid & Keenan, 2005). The lateral arrangement of polar lipids in the MFGM has long been considered to be homogeneous (Dewettinck et al., 2008). Using confocal microscopy and various fluorescent lipophilic dyes, Evers et al. (2008) showed heterogeneities in the MFGM. Approaches using CLSM with Rhodamine-DOPE dye have in recent years revealed non-homogeneous distribution of polar lipids with non-fluorescent areas in the outer bilayer of the bovine MFGM, interpreted as the formation of SM-rich domains (Gallier, Gragson, Jiménez-Flores, & Everett, 2010; Lopez, Madec, & Jiménez-Flores, 2010; Zou et al., 2015). Milk-SM differs from the other MFGM polar lipids in that it contains long-chain saturated fatty acids which contribute to its high phase transition temperature Tm ~ 35 °C (Murthy, Guyomarc'h, Paboeuf, Vié, & Lopez, 2015). Other saturated polar lipids with high Tm, such as DPPC and POPE, are present in the MFGM to lesser extents and contribute in the wide melting range of MFGM polar lipids with Tm = 36.4 °C (Murthy et al., 2015). The presence of lipid domains has also been reported in the MFGM surrounding fat globules in human milk (Gallier et al., 2015; Lopez & Ménard, 2011; Zou et al., 2012) and buffalo milk (Nguyen et al., 2015). In these studies, differences in the sizes and patterns of the SM-rich domains have been reported between mammal

* Corresponding author.
E-mail address: Christelle.Lopez@inra.fr (C. Lopez).

species (bovine, buffalo, human). Little is currently known of the respective effects of the chemical composition of the MFGM (e.g. relative proportions of polar lipids, cholesterol and cholesterol/milk-SM ratio) and/or of the thermodynamic history of the milk samples on the microstructure of the MFGM.

Most studies to date have investigated the microstructure of the MFGM *in situ* at room temperature after a poorly monitored thermodynamic history of the milks (Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2010; Nguyen et al., 2015). However, after their secretion from the mammary gland at the physiological temperature of ~38 °C (Wooding & Kemp, 1975), milk fat globules are submitted to thermal kinetics and changes in temperature, e.g. during storage (4–7 °C), churning of cream (10–12 °C) and heat treatment (temperature above 60 °C, e.g. pasteurization). The few authors that have considered the effects of temperature characterized the MFGM in milks after storage at 4 °C and rewarming at physiological temperature (Lopez & Ménard, 2011; Zou et al., 2015). They reported that the domains became larger and more numerous as temperature decreased to 4 °C while they became smaller when temperature increased to 37 °C (Zou et al., 2015, 2012). A recent study investigated the structural characteristics of lipid domains in the buffalo MFGM up to 60 °C (i.e. above the Tm of all saturated polar lipids of the MFGM; Murthy et al., 2015) and reported that the temperature and rates of cooling affect the number, size and morphology of the SM-rich domains at the surface of buffalo milk fat globules (Nguyen et al., 2016). A way to improve understanding of the morphology and properties of the lipid domains in the MFGM is i) to change the temperature to reach temperatures above the phase transition temperature of the saturated polar lipids located in the MFGM (Tm ~ 35 °C for milk-SM; Tm ~ 41 °C for DPPC), ii) to investigate different thermal histories of the milk samples, and iii) to consider the specific lipid composition of the MFGM by comparing milks from various mammal species e.g. buffalo, goat, sheep, bovine, human milk.

The aims of this study were therefore to characterize the lipid composition of the MFGM from bovine, goat and sheep milks, and to investigate the molecular arrangement of MFGM polar lipids located at the surface of fat globules, in relation to the temperature and thermal history of the milks. Temperature-controlled CLSM with Rh-DOPE dye was used to characterize *in situ* the microstructure of the MFGM in bovine, goat and sheep milks.

2. Materials and methods

2.1. Milk samples

All the milks used in this study corresponded to bulk tank raw whole milks collected at mid-lactation. The milks were produced in the Brittany region of France and were provided by local dairy plants. Bovine milk was provided by Entremont (Montauban de Bretagne, France). Sheep and goat milks were provided by Triballat (Noyal, France). Sodium azide (NaN_3, 0.02% w/v) was added to the milks to prevent the growth of bacteria. Milk samples were stored at room temperature (19 ± 1 °C) before particle size measurements and confocal microscopy experiments. Milk samples were lyophilized and then stored at −20 °C before chemical analysis.

2.2. Chemical analysis

The fat content in the fluid milks was determined using the Gerber method (IDF, 2008). In the lyophilized milks, the total fat content was determined as previously described by Lopez, Briard-Bion, and Ménard (2014). The quantification of total polar lipids, e.g. glycerophospholipids and milk-SM, and determination of the polar lipid classes were performed using HPLC combined with an evaporative light scattering detector according to a method already detailed (Lopez et al., 2014). The sum of glycerophospholipids (PE, PI, PS, PC) and milk-SM concentration was regarded as the total polar lipid concentration in the milks. The amount of cholesterol in the lyophilized milk was determined by gas chromatography (NF EN ISO 12228-1).

2.3. Measurement of milk fat globule size

Laser light scattering experiments were performed to determine the fat globule size distributions in the bovine, goat and sheep milks. The apparatus used (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, U.K.) was equipped with a He/Ne laser (λ = 633 nm) and an electroluminescent diode (λ = 466 nm). The refractive indices of milk fat were set at 1.46 (at 466 nm) and 1.458 (at 633 nm). The refractive index was set at 1.33 for water. Whole milk samples were introduced into the measurement cell of the apparatus in order to reach the optimal condition of 7% obscuration. A solution of 35 mM EDTA/NaOH pH 7.0 buffer (>98% disodium salt dihydrate, Prolabo, Fortenay-sous-Bois, France) was added to the measurement cell to disrupt the casein micelles. All analyses were performed in triplicate. The specific surface area and volume-weighted average diameter d_{43}, defined as $\Sigma n_i d_i^4/\Sigma n_i d_i^3$, where n_i is the number of fat globules of diameter d_i, were calculated by the Malvern software.

2.4. Microstructural analysis

Microstructural analysis was performed using an inverted microscope NIKON Eclipse-TE2000-C1si (NIKON, Champigny sur Marne, France). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used with a He-Ne laser operating at 543 nm wavelength excitation and emission detection between 565 nm and 615 nm. A ×100 (numerical aperture NA 1.4) oil immersion objective was used for the microstructure observations. The neutral milk lipids (i.e. triacylglycerols) were stained with the lipid-soluble Nile Red fluorescent probe (5H-benzo-alpha-phenoxazine-5-one,9-diethylamino; supplied by Sigma Aldrich, St Louis, USA; 100 μg/mL in propanediol). About 10 μL of Nile Red was added to 1 mL of each type of milk. The exogenous head-labelled phospholipid fluorescent probe N-(Lissamine rhodamine B sulfonyl) dioleoylphosphatidylethanolamine (Rh-DOPE, Avanti Polar lipids Inc., Birmingham, England) was used at a concentration of 1 mg/mL in chloroform to label the phospholipids in the membrane surrounding the milk fat globules. For observation of the MFGM phospholipids, 20 μL of the Rh-DOPE solution was added per glass vial and the chloroform was evaporated under nitrogen, to avoid the possible artefacts caused by this organic solvent. Then 1 mL of each milk was introduced into the vials containing the Rh-DOPE fluorescent dye and the samples were kept at room temperature for at least 30 min prior to observation by CLSM. The stained samples of sheep, goat and bovine milk were divided over several vials to monitor their temperature and thermal history. Several protocols were used to investigate the microstructure of the MFGM in a range of temperatures between 4 °C and 60 °C, using a temperature-regulated stage (Linkam Scientific Instruments Ltd., Tadworth Surrey, England). In the first set of experiments, the milks were heated at a given initial temperature T_i (i.e. 60 °C or 20 °C) and quenched at the final temperature T_f (i.e. 20 °C or 4 °C; cooling rate dT/dt > 100 °C/min). The milk samples were then either observed directly under the microscope at T_f or stored overnight (~16 h) at T_f and observed on the following day at the same T_f. In the second set of experiments, the milks were stored at 4 °C and then heated under the microscope using the temperature-regulated stage from 4 °C to 60 °C, allowing tracking of changes in the microstructure according to increasing temperature, with

dT/dt = 10 °C/min. The same protocols were applied for each type of milk (i.e. sheep, goat and bovine milks) to compare the MFGM response to the temperature variations and thermal history.

Optical microscopy using differential interference contrast (DIC) was also used to characterize the sheep, goat and bovine milk fat globules. DIC images were superimposed on the fluorescent emission recorded in the CLSM images. The resolution of the two-dimensional images was 512 × 512 pixels and the pixel scale values were converted into micrometers using a scaling factor.

2.5. Statistical analysis

All the chemical analysis experiments were repeated independently three times. The results are presented as mean value ± standard deviation. Significant differences ($p < 0.05$) between the mean values were determined by Anova and Student test. The statistical analysis was performed using Excel (Microsoft, Redmont, WA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Microstructure of milk fat globules in bovine, goat and sheep milks

The size distribution and spherical shape of milk fat globules were characterised *in-situ* in bovine, goat and sheep milks (Fig. S1). The volume-weighted mean diameter of sheep milk fat globules was 5.4 ± 0.1 μm (size distribution 0.5–13 μm), whereas it was 4.1 ± 0.2 μm in bovine milk (size distribution 0.8–11 μm) and 3.8 ± 0.2 μm in goat milk (size distribution 0.7–9 μm). Whatever the origin of the milks, the size distribution of milk fat globules was not affected by the thermal kinetics nor by the storage of milk at 4 °C or 20 °C during one night performed in this study. The combination of DIC with fluorescence microscopy of the labelled neutral lipids showed dispersed areas of spherical shape, corresponding to the core of milk fat globules rich in triacylglycerols (Fig. S1 B, C and D). Microscopy images confirmed the larger size and higher amount of milk fat globules in sheep milk, compared to goat and bovine milks.

3.2. Lipid composition of the MFGM of bovine, goat and sheep milks

The total fat content was significantly higher in sheep milk (68.0 ± 0.2 g/kg) compared to goat and bovine milks (42.4 ± 0.5 g/kg and 41.0 ± 0.7 g/kg, respectively; Table 1). This is in agreement with previous reports (Lopez et al., 2014; Zancada et al., 2013). Interestingly, the high amount of fat in sheep milks was related to the formation of large milk fat globules (Fig. S1A). This positive relation between the amount of fat in milk and the size of the milk fat globules has already been reported and discussed (Lopez et al., 2014; Ménard et al., 2010).

The lipid composition of the MFGM from sheep, goat and bovine milks was analyzed and compared, with a special focus on the amounts of polar lipids and cholesterol. The total polar lipid content expressed in mg per g of fat was significantly lower for sheep milk compared to goat and bovine milks (Table 1). This result was in line with the larger size of fat globules in sheep milk corresponding to a lower surface area (5.4 ± 0.1 μm and 1.6 ± 0.1 m^2/g fat, respectively) and hence a smaller amount of membrane, compared to bovine and goat milk (1.9 ± 0.1 and 2.2 ± 0.1 m^2/g fat, respectively), in agreement with previous results (Lopez et al., 2014; Ménard et al., 2010). By calculating the amount of polar lipids per kg of milk, we found significantly different results for the three kinds of milk: 476 ± 4 mg/kg sheep milk, 445 ± 10 mg/kg goat milk and 337 ± 16 mg/kg bovine milk (Table 1). These results confirmed the smaller amount of polar lipids in goat milk compared to sheep milk reported by Zancada et al. (2013). In terms of the relative proportions of individual polar lipid species, we found that milk-SM, PC and PE were the major polar lipids quantitatively and the anionic PI and PS were minor polar lipids whatever the origin of the milk (Table 1) (Lopez, 2011; Zancada et al., 2013). Interestingly, sheep milk contained significantly higher amounts of milk-SM than goat and bovine milks (Table 1).

The major sterol present in milk, i.e. cholesterol, that accounts for at least 95% of the sterols, is located mainly in the MFGM (Jensen & Newburg, 1995). The amount of cholesterol expressed per g of fat was significantly higher in bovine and goat milks than in sheep milk (Table 1), in line with the smaller size of fat globules and higher amount of MFGM. The amount of cholesterol expressed per kg milk was significantly higher in sheep milk in relation with the higher amount of milk fat globules compared to bovine and goat milks (Table 1). Our findings are in agreement with the literature since the cholesterol content varies from 308 to 606 mg/100 g fat in bovine milk (Mesilati-Stahy & Argov-Argaman, 2014), from 10 to 20 mg/100 mL milk in goat milk (Jenness, 1980), and 306 ± 21 mg/100 g fat in sheep milk (Gómez-Cortés, Viturro, Juárez, & de la Fuente, 2015).

The relationship between the individual polar lipid species and cholesterol revealed that the cholesterol/milk-SM molar ratio was higher in the MFGM from bovine milk as compared to goat and sheep milks (3.6 versus 2.9–2.8, respectively; Table 1), which could impact the structural behavior of SM-rich domains in the MFGM.

Table 1
Lipid compositions of sheep, goat and bovine milks.

	Sheep milk	Goat milk	Bovine milk	Statistics (P values)
Fat content (g/kg milk)	68.0a ± 0.2	42.4b ± 0.5	41.0b ± 0.7	***
Polar lipids (mg/g fat)	7.0a ± 0.1	10.5b ± 0.2	8.2c ± 0.4	***
Polar lipids (mg/kg milk)	476a ± 4	445b ± 10	337c ± 16	***
Polar lipids (%)				
PE	30.5a ± 0.6	31.6b ± 0.2	32.0b ± 0.5	*
PC	24.5a ± 0.6	27.0b ± 0.3	25.1a ± 0.4	**
SM	28.2a ± 1.4	22.2b ± 0.7	22.6b ± 0.5	***
PI	6.3a ± 0.4	6.7a ± 0.3	8.3b ± 0.3	**
PS	10.6a ± 0.5	12.5b ± 0.5	12.1b ± 0.4	**
Cholesterol (mg/g fat)	2.7a ± 0.1	3.3b ± 0.2	3.3b ± 0.2	**
Cholesterol (mg/kg milk)	185a ± 3	140b ± 8	135b ± 7	***
Cholesterol (mg/m^2 MFGM)	1.8a ± 0.1	1.5b ± 0.8	1.7a ± 0.1	*
Cholesterol/SM (mol/mol)	2.8	2.9	3.6	

Abbreviations: PE = phosphatidylethanolamine, PC = phosphatidylcholine, SM = sphingomyelin, PI = phosphatidylinositol, PS = phosphatidylserine.
For each row, different letters indicate significantly different values (*) $P < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$. P value calculated by Anova.

3.3. Phase separation of polar lipids in the MFGM: structural characteristics of the sphingomyelin-rich domains in relation to temperature and time

3.3.1. Sphingomyelin-rich lipid domains are present over a wide range of temperatures (4–60 °C)

The presence of SM-rich lipid domains in the MFGM from bovine, sheep and goat milks was investigated over a wide range of temperatures: 4 °C (storage of milk and dairy products), 20 °C (room temperature), 37 °C (digestion of milk fat globules) and 60 °C (heat treatment; above the melting temperatures of milk TAG and saturated polar lipids). Regardless of temperature (i.e. from 4 °C to 60 °C), the emission fluorescence of Rh-DOPE was not homogeneously distributed in the biological membrane surrounding milk fat globules, and some non-fluorescent areas corresponding to phase separation of saturated polar lipids with formation of SM-rich domains where the fluorescent dye was excluded were observed in the MFGM of sheep, goat and bovine milk fat globules (Fig. S2). Milk fat globules without non-fluorescent areas in the MFGM were observed (e.g. at high temperature 60 °C and at low temperature 4 °C, indicated by white arrows in Fig. S3). However, it is also possible that the resolution limit of CLSM prevented the detection of small (<300 nm) non-fluorescent areas.

3.3.2. Dynamics of lipid domains on heating (4–60 °C)

In this set of experiments, bovine, goat and sheep milks were heated from 4 °C to 60 °C with dT/dt = 10 °C/min. Fig. 1 shows that the non-fluorescent domains present in the MFGM were dynamic systems that exhibited several responses to heating. When the

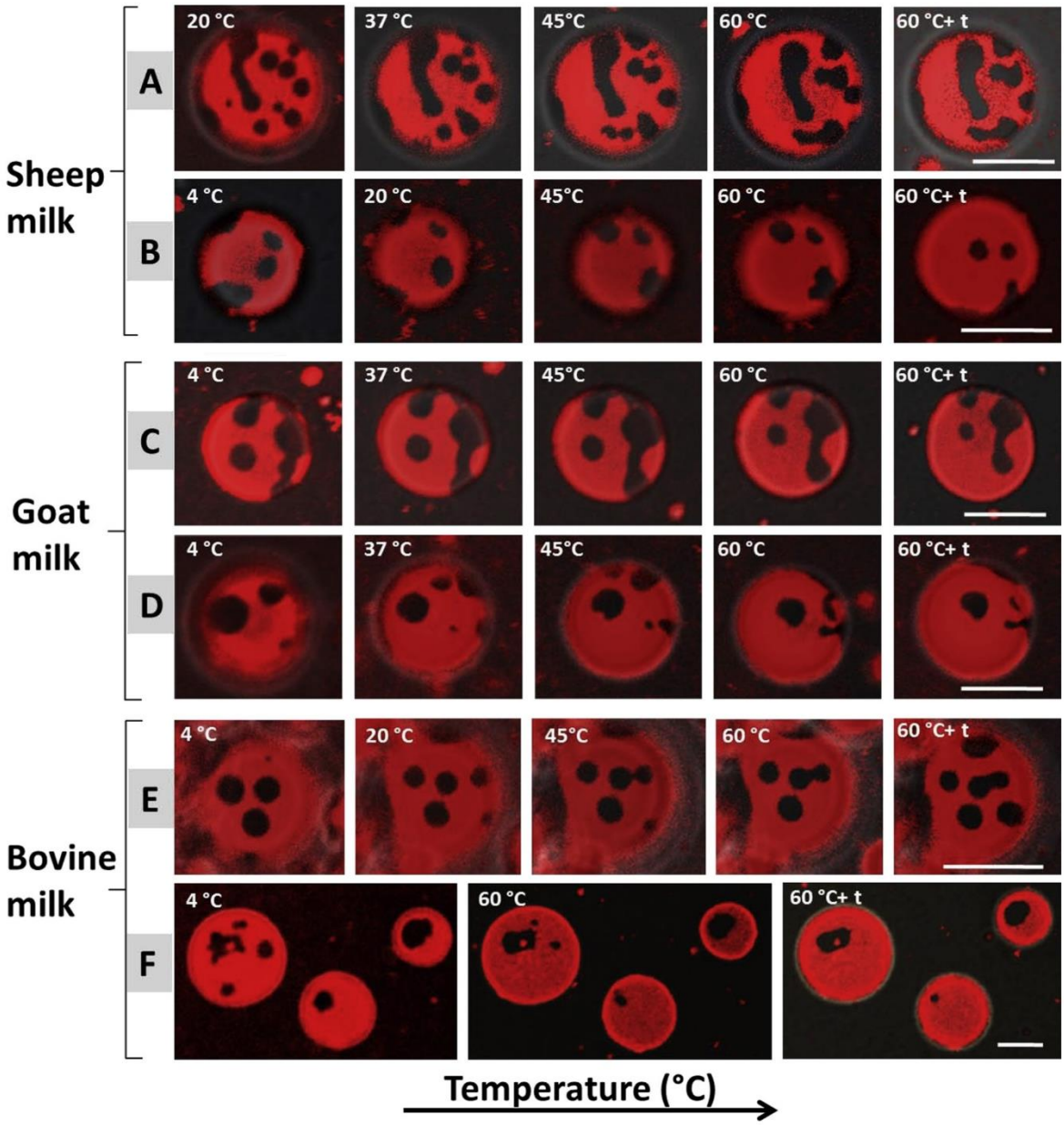


Fig. 1. Changes in the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane of sheep, goat and bovine milk fat globules upon heating from 4 °C to 60 °C at 10 °C/min. Images are the overlay of DIC and confocal microscopy images after labelling of the phospholipids with Rh-DOPE (red). Scale bars correspond to 5 μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

temperature increased, most of the non-fluorescent lipid domains changed their shape and size, and sometimes their location in the MFGM. The lipid domains were able to diffuse within the MFGM (Fig. 1A, B and E), coalesce with other neighbouring lipid domains (Fig. 1A, D and E), decrease in size (Fig. 1C and F) or disappear (Fig. 1A and F). Large domains had a greater tendency to coalesce or reduce in size while the small domain (size < 0.5 μm) tended to vanish at the resolution limit of CLSM.

3.3.3. Lipid domains observed at 4 °C and 20 °C, after cooling from T_i = 60 °C > Tm of saturated polar lipids

The milk samples were heated at 60 °C, i.e. above the phase transition temperature of MFGM polar lipids (Murthy et al., 2015; Murthy, Guyomarc'h, & Lopez, 2016a) and above the final melting temperature of TAG located in the core of milk fat globules (Lopez, Bourgaux, Lesieur, & Ollivon, 2007) (Fig. 2, top). The milk samples were then rapidly cooled to 4 °C (dT/dt > 100 °C/min)

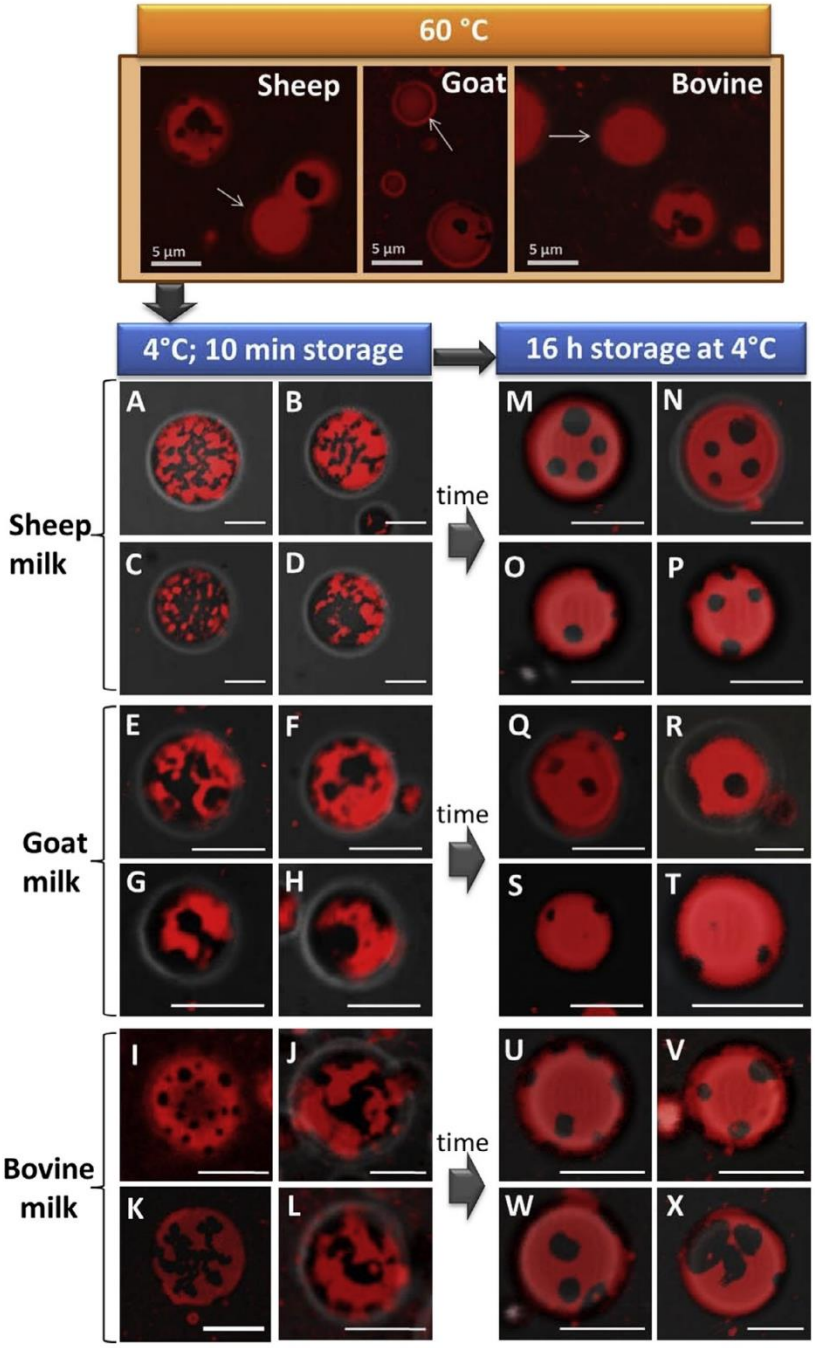


Fig. 2. Effects of storage time at 4 °C on the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane (MFGM) of sheep, goat and bovine milks heated to 60 °C (T > Tm; top) then cooled at dT/dt > 100 °C/min to 4 °C (T < Tm; bottom). Images are the overlay of DIC and CLSM images showing the heterogeneous distribution of polar lipids after labelling of the milk fat globule membrane with Rh-DOPE (red). Top: surface of milk fat globules in milks heated to 60 °C; arrows show fat globules without observable lipid domains in the MFGM. Bottom left column: surface of milk fat globules in milks heated to 60 °C, cooled to 4 °C and rapidly studied at 4 °C. Bottom right column: surface of milk fat globules heated to 60 °C, cooled to 4 °C and studied after overnight storage at 4 °C. Scale bars correspond to 5 μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and either studied rapidly under microscope (within 10 min after cooling) or stored overnight (i.e. about 16 h) at 4 °C before microstructure characterization at 4 °C (Fig. 2, bottom). This protocol was used to elucidate the effects of heat treatment (e.g. pasteurisation performed in the dairy industry and in milk banks) and subsequent cooling and storage of milks at 4 °C. Non-fluorescent lipid domains were observed in the MFGM for all animal species and protocols (Fig. 2). Fig. 2 shows that the time-dependent history of the milks affected the morphology of the non-fluorescent lipid domains formed in the MFGM of bovine, goat and sheep milks cooled from 60 °C to 4 °C. Immediately after cooling of sheep and goat milks at 4 °C, non-fluorescent lipid domains with undefined shapes such as narrow channels, networks of domains and angular large domains were observed in the MFGM (Fig. 2, bottom left). Channels were especially present in sheep milk (Fig. 2A and B). Interestingly, the bovine MFGM showed small circular domains (0.3–1 μm) isolated (Fig. 2I) or connected (Fig. 2K) and irregularly shaped domains (Fig. 2J and L), possibly related to the higher cholesterol/milk-SM molar ratio (Table 1) or to the presence of other components, e.g. MFGM proteins. In milk samples stored overnight at 4 °C (Fig. 2, bottom right), all the non-fluorescent domains exhibited regular shapes such as circles or ellipses, with little difference in number and size of the domains between the bovine, goat and sheep MFGM (Table 2).

In the second set of experiments, the arrangement of polar lipids in the MFGM was investigated at 20 °C after rapid cooling of the milks from 60 °C (dT/dt > 100 °C/min) followed by either (i) observation at 20 °C within 10–20 min or (ii) observation after storage of the milks for ~16 h at 20 °C (Fig. S4). In the milks studied just after rapid cooling to 20 °C, the non-fluorescent domains covered a large proportion of the MFGM surface and corresponded either to large domains with irregular shapes or small domains connected as networks (Fig. S4, left). There was no obvious difference between the sheep, goat and bovine milks. On the other hand, storage for about 16 h at 20 °C (Fig. S4, right) led to the formation of large non-fluorescent domains of circular shape. Interestingly, sheep milk fat globules exhibited slightly more domains on their MFGM than bovine or goat milk (Table 2), possibly related to their higher content in milk-SM (Table 1). The circular shape of the non-fluorescent domains after overnight storage at 20 °C was in agreement with previous reports (Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2010).

Both the cooling from 60 °C (T_i > Tm of saturated polar lipids) to 4 or 20 °C (T_f < Tm of saturated polar lipids) and the storage time at T_f had different effects on the lateral organization of the polar lipids on the surface of fat globules whatever the origin of the milk (bovine, sheep or goat). Quenching at T_f < Tm of saturated polar lipids produced transient domain features (numerous small domains, angles) that were rearranged during storage to reach ideal phase separation corresponding to large circular lipid domains.

3.3.4. Sphingomyelin-rich lipid domains observed at 4 °C, after cooling from T_i = 20 °C < Tm of saturated polar lipids

In this set of experiments, the question of the initial temperature before cooling at 4 °C was addressed, i.e. T_i = 60 °C > Tm of saturated polar lipids (previous paragraph) or T_i = 20 °C < Tm of saturated polar lipids.

The microstructural analysis of the milks at 20 °C showed the presence of large circular non-fluorescent domains (Fig. 3, left). The milks were then rapidly cooled from 20 °C to 4 °C (dT/dt ~ 100 °C/min), and (i) studied within the following 10 min, or (ii) stored at 4 °C to be studied on the following day (Fig. 3, right). In Fig. 3 it can be seen that most of the non-fluorescent lipid domains observed were of circular shape independently of the duration of storage at 4 °C. The morphology of the lipid domains was therefore resistant to the rapid cooling from 20 to 4 °C (Fig. 3). This was probably due to the fact that the temperature quenching from 20 to 4 °C did not include the phase transition temperatures, i.e. Tm and Tc, of the MFGM polar lipid mixture (Tm = 36.4 °C, Murthy et al., 2015; Tc = 30.3 °C, Murthy et al., 2016a). Whatever the storage time, bovine and goat milk fat globules exhibited 1–3 or 1–5 domains of similar diameter (ranging 0.5–3 μm – Table 2). Interestingly, 1–6 domains were found at the surface of sheep milk fat globules (Fig. 3, top line), varying in size from 1 to 1.7 μm immediately after cooling but reaching 2–3 μm in samples stored overnight at 4 °C. This suggested that domain growth could occur in sheep milk at 4 °C after cooling from 20 °C, possibly related to its higher content in milk SM compared to the milk fat globules of other mammal origin (Table 1).

4. Discussion

4.1. Phase separation of high Tm polar lipids in the MFGM and the role of cholesterol

Regardless of the mammal origin of the milks (e.g. bovine, sheep and goat), and thus regardless of compositional variation between species, CLSM images showed the presence of non-fluorescent domains on the surface of milk fat globules at different temperatures (i.e. from 4 °C to 60 °C) and storage times at 4 °C or 20 °C. In the presence of ordered and disordered lipid phases, it has been demonstrated that the fluorescent probe Rhodamine-DOPE preferentially partitions in the liquid-disordered (Ld) phase of polar lipids (Bagatolli & Gratton, 2000; Baumgart, Hunt, Farkas, Webb, & Feigenson, 2007). The non-fluorescent domains observed in the MFGM were then interpreted as the lateral segregation of polar lipids in ordered phases (i.e. either the liquid-ordered Lo or the gel phase), surrounded by a Ld phase mostly composed of glycerophospholipids (PC, PE, PI, PS) with unsaturated fatty acids and a very low Tm. These new findings obtained with sheep and goat milks complement previous results showing the presence of lipid domains at 20 °C in bovine, human and buffalo milks (Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2010; Nguyen et al., 2015; Zou et al., 2012, 2015) and at 37 °C in human milk (Lopez & Ménard, 2011; Zou et al., 2012).

In milk, the ordered (Lo or gel) phase lipid domains involve high Tm polar lipids, corresponding to species with a long saturated fatty acid chain (number of carbon atoms > 18) such as milk-SM (Tm = 35 °C; 95% w/w saturated fatty acids with 70–74% C22:0-C24:0 acyl chains; Sánchez-Juanes, Alonso, Zancada, & Hueso, 2009; Zancada et al., 2013), saturated PC (DPPC; Tm = 41 °C) and saturated PE (POPE; Tm = 25.8 °C), as already demonstrated (Murthy et al., 2015). Moreover, some authors have reported that milk-SM and PC are mainly located in the outer bilayer of the membrane (Deeth, 1997). The non-fluorescent lipid domains on the milk fat globule surface must therefore be rich in milk-SM and other saturated PC. Chemical analysis of the polar lipids from the sheep, goat and bovine milks used in this study (Table 1) showed the high amount of milk-SM and PC making up the lipid domains formed at the surface of milk fat globules. Direct evidence of the ability of milk-SM and DPPC to form laterally segregated ordered phase domains has been provided in simplified systems investigated in giant unilamelar vesicles (Bagatolli & Gratton, 2000; Zheng, Jiménez-Flores, Gragson, & Everett, 2014) and in supported lipid bilayers using atomic force microscopy (Lopez et al., 2015).

Observation of lipid microdomains at the surface of the fat globules in sheep, goat and bovine milks at 60 °C, i.e. well above the Tm of MFGM saturated polar lipids (Murthy et al., 2015), was in agreement with a previous study focusing on the buffalo MFGM

Table 2
Number and size of non-fluorescent lipid domains observed at the surface of fat globules in sheep, goat and bovine milks. Determinations were performed on half of milk fat globules, as observed in the 2D CLSM images (n > 20 milk fat globules).

Mammal Species	Number and size of the non-fluorescent lipid domains			
	Storage at 20 °C after cooling from 60 °C	Storage at 4 °C after cooling from 60 °C	Directly observed at 4 °C after cooling from 20 °C	Storage at 4 °C after cooling from 20 °C
Sheep	4–8 domains 0.1–1.5 μm	1–5 domains 0.5–1.6 μm	1–7 domains 0.5–2 μm	1–6 domains 2–3 μm
Goat	1–4 domains 0.6–1.5 μm	1–2 domains 0.4–1 μm	1–4 domains 0.4–1.2 μm	1–6 domains 0.5–1.7 μm
Bovine	1–4 domains 1–3 μm	1–6 domains 1–2 μm	1–5 domains 0.4–1.5 μm	1–5 domains 0.5–1.5 μm

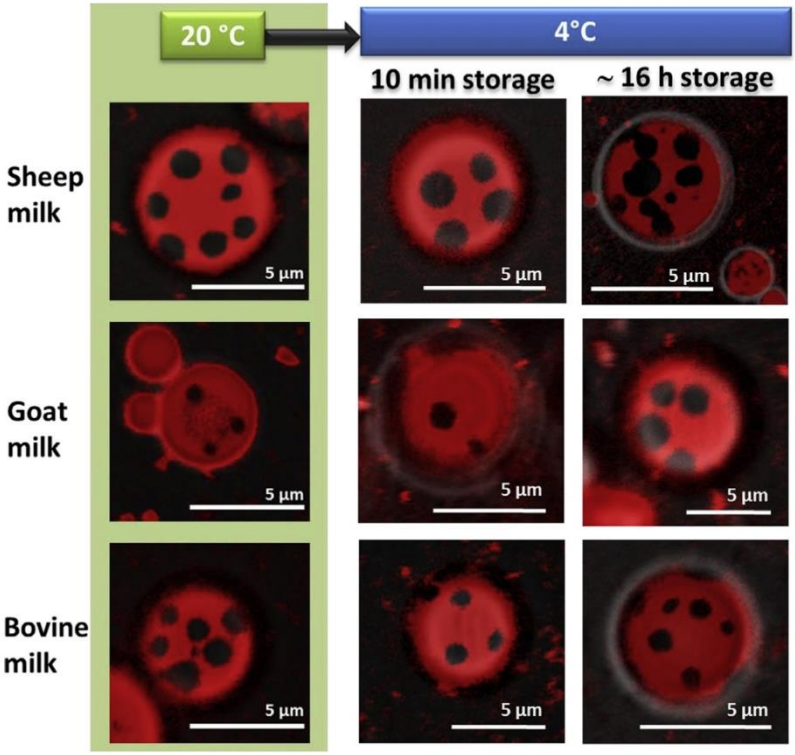


Fig. 3. Effects of storage time at 4 °C on the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane of sheep, goat and bovine milks stored at 20 °C (T < Tm; left column), then cooled to 100 °C/min to 4 °C (T < Tm; middle and right columns). Images are the overlay of DIC and CLSM images after labelling of the milk fat globule membrane with Rh-DOPE (red). Left column: surface of milk fat globules in milks stored at 20 °C; middle column: surface of milk fat globules in milks cooled to 4 °C and studied rapidly; Right column: surface of milk fat globules after overnight storage at 4 °C. The scale bars are indicated in the figures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Nguyen et al., 2016). These lipid domains are interpreted as the formation of complexes between high Tm saturated polar lipids and cholesterol to form a Lo phase (Veatch & Keller, 2003). Studies performed by X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC) have shown that above 40% mol cholesterol, egg-SM forms a Lo phase that is present below and above the Tm of egg-SM (Chemin et al., 2008). Moreover, recent studies combining DSC, XRD and AFM techniques showed that MFGM polar lipids in absence of cholesterol form gel phase microdomains below 35 °C (Murthy et al., 2016a) and that the presence of cholesterol induce the formation of Lo phase in a MFGM polar lipid extract (Murthy, Guyomarc'h, & Lopez, 2016b). In the present study, the persistence of domains upon heating at 60 °C was accompanied by either reduction of the domain area or coalescence of domains, as summarized in Fig. 4 (left panel). CLSM images also showed fat globules without non-fluorescent areas at 60 °C (Fig. 4, left panel). This could be explained either by the persistence of small Lo phase domains not detected with the resolution of CLSM or by the complete melting of gel phase domains into a fluid Ld phase at 60 °C (Bagatolli & Gratton, 2000). There may be differences in the chemical composition of the MFGM from one fat globule to another in the same milk, for example a high Tm saturated polar lipids/cholesterol ratio preventing the formation of Lo phase domains.

In addition to the Lo phase domains present at 60 °C, decreasing the temperature at T_f (20–4 °C) < Tm of saturated polar lipids present in the MFGM of sheep, goat and bovine milks induced the Ld to gel phase transition of some polar lipids with their lateral segregation. As a consequence, our observations suggested the coexistence of ordered phases with solid-solid immiscibility, as already reported in GUV by Bagatolli and Gratton (2000). Indeed, CLSM images showed (i) large lipid domains of angular shape and (ii) small domains often with irregular "network" shapes immediately after temperature quenching, and (iii) large circular domains after long storage at T < Tm (Fig. 4, right panel). Depending on the presence or absence of domains at 60 °C, domain nucleation and growth may follow different routes, as discussed below (dashed

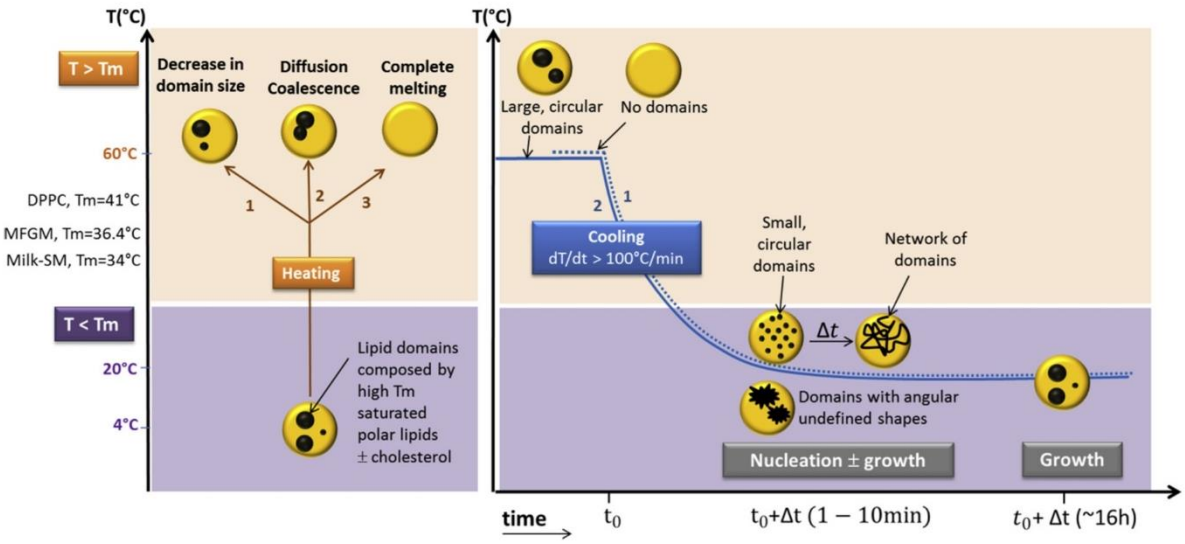


Fig. 4. Schematic summary of the morphological changes in the lipid domains in the biological membrane surrounding fat globules in bovine, sheep and goat milk according to the time-temperature route. Left panel: effects of heating of refrigerated milks to T = 60 °C (i.e. above the melting temperature Tm). Three responses were observed: (1) reduction of domain size, (2) coalescence due to increased diffusion, and (3) complete melting. Right panel: effects of quenching milk warmed to 60 °C down to temperatures T = 4 or 20 °C, i.e. below Tm (dT/dt > 100 °C/min) then storing the sample at T for ~16 h. Two responses were hypothesized depending on whether the milk fat globules exhibited domains at 60 °C or not: in the absence of initial domains, nucleation and growth of small domains in the gel phase that first connected into networks, then coalesced (dashed line); or in the presence of initial domains, growth of the domains by addition of small angular gel phase material, then rearrangement into circular domains (continuous line). The Tm values of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), milk fat globule membrane polar lipid extract (MFGM) and milk sphingomyelin (milk-SM) are indicated on the temperature scale (left axis).

and continuous lines in Fig. 4, right panel). For temperatures below the Tm of MFGM polar lipids (i.e. 20 °C and 4 °C), domains with polar lipids in the gel phase or in the Lo phase may co-exist that can account for the various morphologies. The results obtained with sheep, goat and bovine milks were consistent with those previously reported for buffalo milk (Nguyen et al., 2016).

In these lipid domains formed at the surface of milk fat globules, cholesterol plays an important part in the molecular packing and ordering of the saturated polar lipids (Lopez, 2011; Murthy et al., 2015, 2016b; Simons & Vaz, 2004). Previous reports on milk-SM and MFGM polar lipid extract showed that i) cholesterol fluidified the gel-phase domains into a Lo state, thereby abolishing the gel-to-Ld transition, and increased dispersion of the domains by enhancing nucleation (Murthy et al., 2015, 2016b) and ii) cholesterol exerted a condensing effect in the liquid-ordered phase by reducing the molecular area within the domains (Murthy et al., 2015). Some differences observed in the shape and quantity of lipid domains could therefore be associated with the composition (mainly the cholesterol/milk-SM ratio) and the degree of saturation of polar lipids (Lopez et al., 2010; Zou et al., 2012). For example, nucleation of numerous, small non-fluorescent lipid domains in bovine milk upon thermal quenching from 60 to 4 °C agrees with its slightly higher cholesterol/milk-SM ratio than those of sheep and goat milk (3.6 versus 2.8 and 2.9, respectively; Table 1). It was also suggested that the higher amount of milk-SM in sheep milk could account for the sometimes greater number of domains or larger domain size after storage than for the other two species (Table 2). Since the MFGM contains many components, we should also consider that other components than the main polar lipids (e.g. glycolipids, ceramides) or membrane-specific proteins could be involved in the dynamics of the MFGM in relation to temperature and time.

4.2. Lipid domain nucleation and growth observed for T < Tm

At 60 °C, and more generally at temperatures above the Tm of MFGM polar lipids, the MFGM can therefore be seen as a dominant continuous fluid phase of melted polar lipids where the high-Tm lipid species are supersaturated, in which Lo phase domains corresponding to complexes between high-Tm polar lipids and cholesterol are dispersed. The CLSM studies performed after cooling of the milks from 60 °C to 20 °C or 4 °C support the mechanism of nucleation and growth of the lipid domains (Fig. S4; Fig. 2). However, it was possible to distinguish between the formation of new Lo or gel phase lipid domains upon cooling, depending on the amount of cholesterol present, and/or the growth of the Lo phase lipid domains already present at 60 °C.

The classical nucleation theory, adapted for two-dimensional systems such as bilayers (Frolov, Chizmadzhev, Cohen, & Zimmerberg, 2006), shows that the formation of nuclei is an activated process that depends both on the difference in chemical potential $\Delta\mu$ and on the line tension between the phases. The nucleation mechanism for a sphere requires crossing an energy barrier called Gibbs free energy ΔG:

$$\Delta G = \frac{-V_S}{V_m}\Delta\mu + 4\pi r^2 \gamma_{n,f}$$

where V_s is the nuclei sphere volume, r the nucleus sphere radius, V_m the molecule volume in the nucleus, and $\gamma_{n,f}$ the interfacial nucleus/fluid surface tension.

The first term corresponds to volume energy which depends on chemical potential (i.e. number of high Tm polar lipids such as SM), while the second term corresponds to the surface energy. When the volume term was dominant, nucleus creation was favoured. However, when the surface term was dominant, the nuclei had tendency to dissolve and disappear. At the equilibrium of this competition, free energy reaches its maximum and creates a critical radius r_{crit} for which $\Delta G = \Delta G_{crit}$. The domain shrank or grew when nucleus radius was below or above this critical value, respectively.

These theoretical explanations can explain the different shapes of the lipid domains observed in the MFGM that have been generated by fast cooling of the milks and then storage in isothermal conditions. Basically, gel-phase and Lo-phase lipid domains should follow similar nucleation and growth routes. However, the

literature indicates that the major difference between gel-phase and Lo-phase lipid domains is their susceptibility to coalescence. Experimental evidence shows that gel-phase domains do not or only very slowly coalesce (Beales, Gordon, Zhao, Egelhaaf, & Poon, 2005; Chen & Santore, 2014), which may be explained by the repulsive force originating from the high level of thickness mismatch between the Ld and gel phases (Frolov et al., 2006). Such thickness mismatch was visible in AFM investigations performed with hydrated supported lipid bilayers models of the MFGM (Murthy et al., 2016a, 2016b). Combination with other factors (e.g. line tension and leaflet registry) results in the formation of irregular shaped gel-phase lipid domains that need a longer time to reach equilibrium (Blanchette, Orme, Ratto, & Longo, 2008; Szmodis, Blanchette, Longo, Orme, & Parikh, 2010). Lo phase lipid domains grow through the uptake of polar lipids from the supersaturated fluid phase and through coalescence, while Ostwald ripening is negligible. The line tension, and to a lesser extent the thickness mismatch, determines the size distribution of the domains at equilibrium that assume circular shapes (Frolov et al., 2006). In our milk samples, we suggest that during cooling numerous, small gel-phase and Lo-phase lipid domains were formed from a MFGM containing whole polar lipids in the Ld phase at 60 °C (i.e. no initial Lo phase lipid domain on the surface of milk fat globules – Fig. 4, right panel, dashed line). In bovine milk, these "nuclei" were more dispersed than in goat or sheep milk, probably as a result of the higher cholesterol/SM molar ratio, providing more Lo phase and lower line tension. In goat and sheep MFGM, we hypothesize that the network shape with narrow channels was formed after nucleation where small domains created after cooling had rapidly connected but not coalesced, possibly as a result of higher gel-phase content. In the long term (over 10 h), more coalescence occurred and the lipid domains finally assumed circular shapes, thus indicating that the Lo phase was probably dominant. We suggest that when Lo phase domains are initially present at the surface of the milk fat globules at 60 °C, non-fluorescent lipid domains of large size and angular shape occur after cooling, resulting from their crystal growth probably in the gel phase through uptake of new matter from the supersaturated phase (i.e. they act as a nucleus – Fig. 4, right panel, continuous line). This variety of shapes shows that, even though a general common trend was observed across milk samples, each fat globule had its own response. The presence of some components such as membrane proteins or significant amounts of cholesterol can affect membrane viscosity and hence the nucleation mechanism by affecting diffusion and the of frequency nucleation (Mullin, 2001).

4.3. Dynamics of lipid domains on heating: diffusion, coalescence, melting

We demonstrated in this study that the lipid domains induced by phase separation of polar lipids in the outer bilayer of the MFGM are dynamic systems that can diffuse, coalesce and decrease in size or even disappear when the temperature increases (Fig. 1). Reduction in size or disappearance of the lipid domains when the temperature is increased to 60 °C could be interpreted as changes in the physical state of the polar lipids involved in the domains, i.e. gel to Ld phase transition of the saturated polar lipids (SM, Tm = 35 °C; DPPC, Tm = 41 °C), inducing an increase in the amount of Ld phase. At the same time, domains in the Lo phase would resist melting due to the involvement of cholesterol, as explained above. Diffusion of the non-fluorescent lipid domains in the plane of the outer bilayer of the MFGM has already been observed in isothermal conditions as a function of time (Lopez et al., 2010; Nguyen et al., 2015). Diffusion may be also related to variations in temperature, viscosity and size domains according to the Stokes–Einstein theory (Cicuta, Keller, & Veatch, 2007). However, the diffusion of the non-fluorescent lipid domains did not occur in all fat globule surfaces despite being under the same temperature and size conditions. This means that the viscosity of the MFGM was involved in the mechanisms of diffusion of the lipid domains. The viscosity of the MFGM can be affected by its chemical composition (of both lipids and membrane-specific proteins) and by its microstructure (Raison, Roberts, & Berry, 1982). Fostered by diffusion, the non-fluorescent domains moving in the outer bilayer of the MFGM can approach one another, and then coalesce (Fig. 1), to minimize the line tension and total energy.

5. Conclusion

This study demonstrated that the biological membrane surrounding fat globules in sheep, goat and bovine milks is a dynamic system that is highly sensitive to changes in temperature, with reorganization of the packing of polar lipids towards equilibrium state as a function of time. Both the cooling kinetics and storage duration at low temperature (20–4 °C) affect the shape, the size and the number of lipid domains through the mechanisms of nucleation and growth. On heating from 4 °C to 60 °C, we observed diffusion of the lipid domains, coalescence and melting at the surface of the fat globules. We suggest that the composition and phase state of the lipid domains determine their reactions to temperature changes. Thus for temperatures below the Tm of MFGM polar lipids (e.g. ~36 °C), lipid domains are formed by high Tm polar lipids (e.g. SM, DPPC, POPE) in the gel phase, while domains involving complexes between high-Tm lipids and cholesterol in the Lo phase can be present at all temperatures; and only the Lo phase domain can exist above Tm of MFGM polar lipids. The presence of phase separation in the MFGM with lipid domains in the gel phase or in the Lo phase dispersed in a fluid Ld phase could induce mechanical heterogeneity in the membrane and have functional consequences that remain to be elucidated. The MFGM is involved in many interfacial mechanisms, such as adsorption of enzymes, bacteria, viruses, location of proteins, and physical stability of milk fat globules. Changes in the morphology and physical properties of the lipid domains induced by temperature and time dynamics could affect the technological properties of milk fat globules (e.g. butter manufacture) and their nutritional functions, particularly the mechanisms of lipid digestion. This study increases understanding of the structure of the MFGM in relation to temperature and storage at low temperature.

Acknowledgements

The doctoral fellowship of author Et-Thakafy was funded by INRA CEPIA and Région Bretagne under Grant ARED 8806. The authors thank Benoît Robert (INRA, Rennes) and the STLO Dairy Platform for the supply of milk samples as well as Joëlle Léonil (Head of INRA-STLO, Rennes) for her support. The members of CNIEL's (French Dairy Interbranch Organization, Paris, France) Committee on dairy lipids are thanked for stimulating discussions about the MFGM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.017.

References

Bagatolli, L. A., & Gratton, E. (2000). Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophysical Journal, 78*, 290–305.

Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E. R., Webb, W. W., & Feigenson, G. W. (2007). Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1768*(9), 2182–2194.
Beales, P. A., Gordon, V. D., Zhao, Z., Egelhaaf, S. U., & Poon, W. C. K. (2005). Solid-like domains in fluid membranes. *Journal of Physics: Condensed Matter, 17*(45), S3341–S3346.
Blanchette, C. D., Orme, C. A., Ratto, T. V., & Longo, M. L. (2008). Quantifying growth of symmetric and asymmetric lipid bilayer domains. *Langmuir, 24*(4), 1219–1224.
Chemin, C., Bourgaux, C., Péan, J.-M., Pabst, G., Wüthrich, P., Couvreur, P., et al. (2008). Consequences of ions and pH on the supramolecular organization of sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids, 153*(2), 119–129.
Chen, D., & Santore, M. M. (2014). 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)-rich domain formation in binary phospholipid vesicle membranes: Two-dimensional nucleation and growth. *Langmuir, 30*(31), 9484–9493.
Cicuta, P., Keller, S. L., & Veatch, S. L. (2007). Diffusion of liquid domains in lipid bilayer membranes. *J. Phys. Chem. B, 111*(13), 3328–3331.
Deeth, H. (1997). The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Australian Journal of Dairy Technology, 52*(1), 44.
Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., & Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal, 18*(5), 436–457.
Evers, J. M., Haverkamp, R. G., Holroyd, S. E., Jameson, G. B., Mackenzie, D. D. S., & McCarthy, O. J. (2008). Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *International Dairy Journal, 18*(12), 1081–1089.
Frolov, V. A. J., Chizmadzhev, Y. A., Cohen, F. S., & Zimmerberg, J. (2006). "Entropic traps" in the kinetics of phase separation in multicomponent membranes stabilize nanodomains. *Biophysical Journal, 91*(1), 189–205.
Gallier, S., Gragson, D., Jiménez-Flores, R., & Everett, D. (2010). Using confocal laser scanning microscopy to probe the milk fat gglobule membrane and associated proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(7), 4250–4257.
Gallier, S., Vocking, K., Post, J. A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E. M., et al. (2015). A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 136*, 329–339.
Gómez-Cortés, P., Viturro, E., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2015). Alternative to decrease cholesterol in sheep milk cheeses. *Food Chemistry, 188*, 325–327.
Heid, H. W., & Keenan, T. W. (2005). Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology, 84*(2–3), 245–258.
International Dairy Federation (2008) Milk – Determination of fat content – Gerber butyrometers, IDF 105:2008, IDF Editions, Brussels, Belgium (also available as: International Standard Organization ISO 488:2008).
International Standard Organization (2014) Determination of individual and total sterols contents – Gas chromatographic method – Part 1: Animal and vegetable fats and oils, NF EN ISO 12228-1, AFNOR Editions, La Plaine Saint-Denis, France.
Jenness, R. (1980). Composition and characteristics of goat milk: Review 1968–1979. *Journal of Dairy Science, 63*(10), 1605–1630.
Jensen, R., & Newburg, D. (1995). Bovine milk lipids. In *Handbook of milk composition* (pp. 260–267). New York: Academic press.
Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science, 16*(5), 391–404.
Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., & Ollivon, M. (2007). Coupling of time-resolved synchrotron X-ray diffraction and DSC to elucidate the crystallisation properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules. *Le Lait, 87*(4–5), 459–480.
Lopez, C., Briard-Bion, V., & Ménard, O. (2014). Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring. *Food Research International, 58*, 59–68.
Lopez, C., Cauty, C., & Guyomarc'h, F. (2015). Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: Role of technological processes and potential impacts. *Dairy Science & Technology, 95*(6), 863–893.
Lopez, C., Madec, M.-N., & Jiménez-Flores, R. (2010). Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry, 120*(1), 22–33.
Lopez, C., & Ménard, O. (2011). Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 83*(1), 29–41.
Ménard, O., Ahmad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., & Lopez, C. (2010). Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry, 120*(2), 544–551.
Mesilati-Stahy, R., & Argov-Argaman, N. (2014). The relationship between size and lipid composition of the bovine milk fat globule is modulated by lactation stage. *Food Chemistry, 145*, 562–570.
Mullin, J. (2001). *Crystallization* (4th ed.). London: Butterworth-Heinemann.
Murthy, A. V. R., Guyomarc'h, F., & Lopez, C. (2016a). The temperature-dependent physical state of polar lipids and their miscibility impact the topography and mechanical properties of bilayer models of the milk fat globule membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1858*(9), 2181–2190.
Murthy, A. V. R., Guyomarc'h, F., & Lopez, C. (2016b). Cholesterol decreases the size and the mechanical resistance to rupture of sphingomyelin rich domains, in lipid bilayers studied as a model of the milk fat globule membrane. *Langmuir, 32*(26), 6757–6765.
Murthy, A. V. R., Guyomarc'h, F., Paboeuf, G., Vié, V., & Lopez, C. (2015). Cholesterol strongly affects the organization of lipid monolayers studied as models of the milk fat globule membrane: Condensing effect and change in the lipid domain morphology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1848*(10), 2308–2316.
Nguyen, H. T. H., Madec, M.-N., Ong, L., Kentish, S. E., Gras, S. L., & Lopez, C. (2016). The dynamics of the biological membrane surrounding the buffalo milk fat globule investigated as a function of temperature. *Food Chemistry, 204*, 343–351.
Nguyen, H. T. H., Ong, L., Beaucher, E., Madec, M.-N., Kentish, S. E., Gras, S. L., et al. (2015). Buffalo milk fat globules and their biological membrane: In situ structural investigations. *Food Research International, 67*, 35–43.
Raison, J. K., Roberts, J. K., & Berry, J. A. (1982). Correlations between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant, Nerium oleander, to growth temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 688*, 218–228.
Sánchez-Juanes, F., Alonso, J. M., Zancada, L., & Hueso, P. (2009). Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *International Dairy Journal, 19*(5), 273–278.
Simons, K., & Vaz, W. L. C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 33*(1), 269–295.
Szmodis, A. W., Blanchette, C. D., Longo, M. L., Orme, C. A., & Parikh, A. N. (2010). Thermally induced phase separation in supported bilayers of glycosphingolipid and phospholipid mixtures. *Biointerphases, 5*(4), 120.
Veatch, S. L., & Keller, S. L. (2003). Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophysical Journal, 85*(5), 3074–3083.
Wooding, F. B. P., & Kemp, P. (1975). Ultrastructure of the milk fat globule membrane with and without triglyceride. *Cell and Tissue Research, 165*, 113–127.
Zancada, L., Pérez-Díez, F., Sánchez-Juanes, F., Alonso, J. M., García-Pardo, L. A., & Hueso, P. (2013). Phospholipid classes and fatty acid composition of ewe's and goat's milk. *Grasas y Aceites, 64*(3), 304–310.
Zheng, H., Jiménez-Flores, R., Gragson, D., & Everett, D. W. (2014). Phospholipid architecture of the bovine milk fat globule membrane using giant unilamellar vesicles as a model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62*, 3236–3243.
Zou, X.-Q., Guo, Z., Huang, J.-H., Jin, Q.-Z., Cheong, L.-Z., Wang, X.-G., et al. (2012). Human milk fat globules from different stages of lactation: A lipid composition analysis and microstructure characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(29), 7158–7167.
Zou, X., Guo, Z., Jin, Q., Huang, J., Cheong, L., Xu, X., et al. (2015). Composition and microstructure of colostrum and mature bovine milk fat globule membrane. *Food Chemistry, 185*, 362–370.

Supplementary data

Figure S1: Microstructure of fat globules in bovine, sheep and goat milks. (A) Size distributions of milk fat globules determined by laser light scattering. Microscopy images showing milk fat globules in (B) bovine, (C) goat and (D) sheep milks, by combining DIC and CLSM images after labelling of triacylglycerols with Nile red (red color). The scales bars are indicated in the figures.

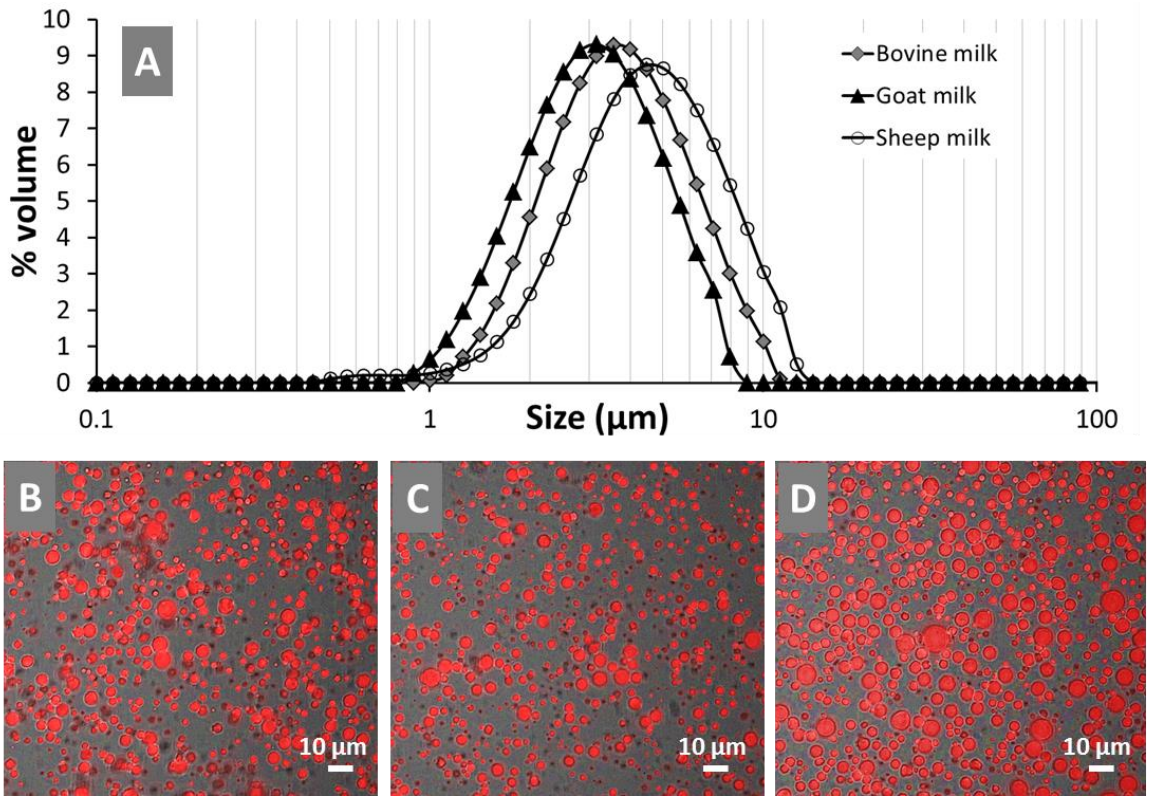


Figure S2: Phase separation of polar lipids in the milk fat globule membrane (MFGM) observed at different temperatures ranging from 4 to 60°C in sheep (A), goat (B) and bovine (C) raw milks. Images are the overlay of differential interferential contrast and of confocal microscopy images after labelling of the phospholipids with Rh-DOPE (red color). The lipid domains appear as non-fluorescent black areas.

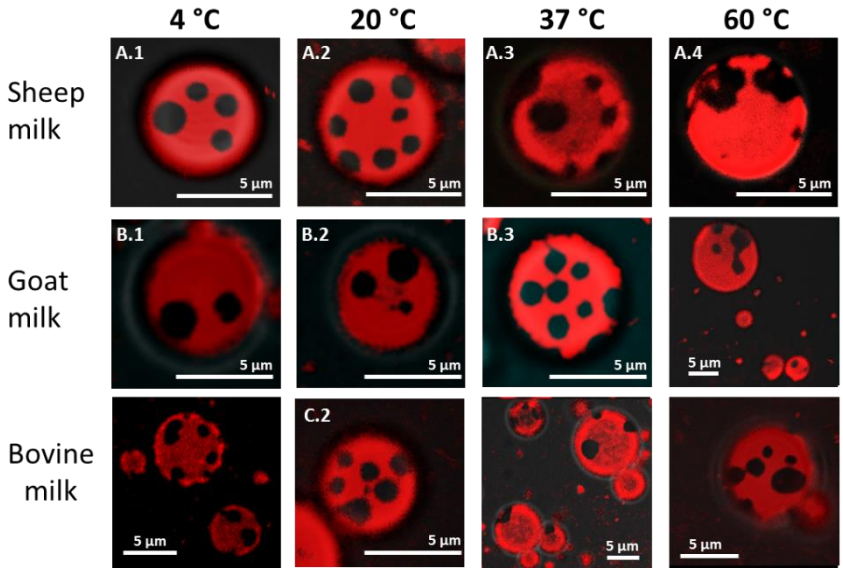


Figure S3: Images showing milk fat globules of sheep, goat or bovine milks with a homogeneous distribution of the fluorescent dye Rh-DOPE used for the labelling of the phospholipids (red color) in the MFGM at 60°C (A) or 4°C (B). Images are the overlay of differential interferential contrast and confocal microscopy images. The scale bars are indicated in the figures.

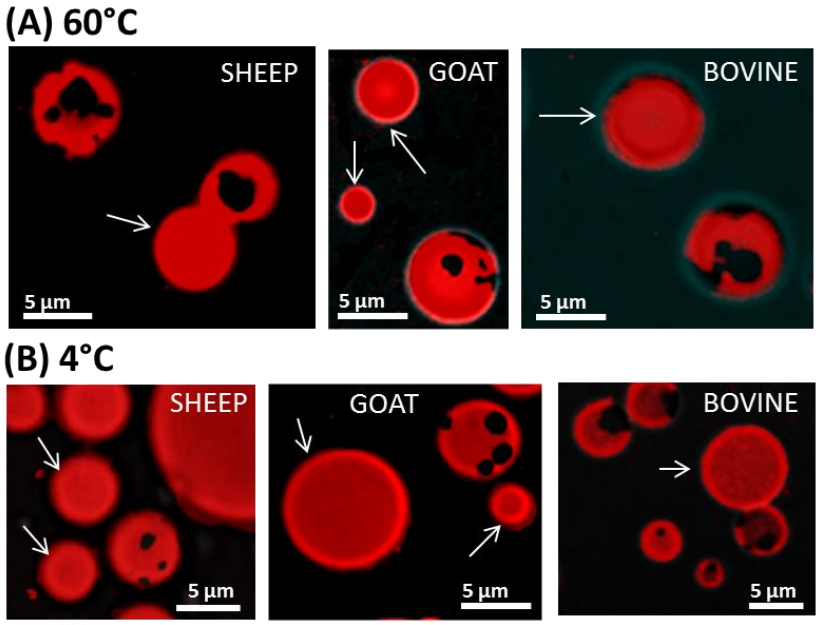
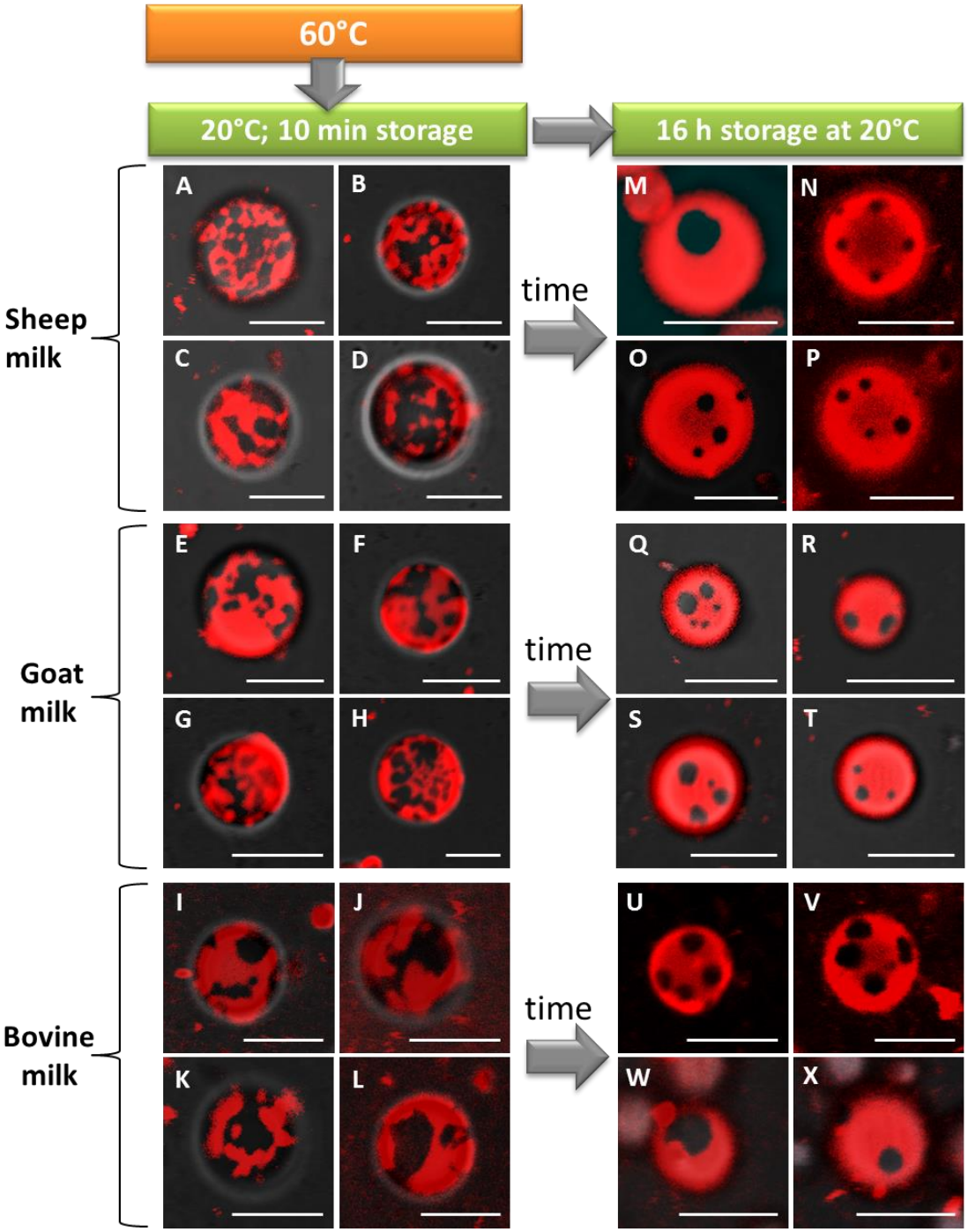


Figure S4: Effect of storage time at 20°C on the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane of sheep, goat and bovine milks heated at 60°C (T>Tm) then cooled to 20°C (T<Tm) at dT /dt > 100°C/min. Images are the overlay of DIC and CLSM images showing the heterogeneous distribution of polar lipids after labelling of the milk fat globule membrane with Rh-DOPE (red color). Left column: surface of milk fat globules in milks heated at 60 °C cooled to 20°C and rapidly observed. Right column: surface of milk fat globules heated at 60°C and observed after overnight storage at 20°C. The scale bars correspond to 5 µm.



4.3. Bilan du chapitre 4 et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence que la membrane biologique qui entoure les globules gras du lait (MFGM) est un système dynamique dont la microstructure peut changer en fonction de la température et évoluer au cours du temps. La présence d'une hétérogénéité de structure induite par la formation des domaines riches en lipides polaires saturés (majoritairement la milk SM, DPPC) a été observée à la surface des globules gras de trois types de lait différents (brebis, chèvre et vache). Quel que soit le type de lait utilisé dans ce travail, les résultats obtenus par microscopie confocale montrent que les domaines riches en SM peuvent exister sur une large plage de températures (T : 4 – 60°C), qui inclut des températures inférieures et supérieures à la température de transition de phase gel/fluide de la MFGM (Tm = 36.4°C). Au cours du chauffage, nous avons observé que les domaines peuvent diffuser, coalescer ou diminuer en taille jusqu'à leur disparition complète. Ces différentes réponses peuvent nous indiquer l'état de phase du domaine ou également la présence ou non du cholestérol. Pour T < Tm, les domaines peuvent être présents dans deux phases ordonnées, soit gel (ou s_o), soit liquide ordonné (Lo), en l'absence ou présence de cholestérol, respectivement. Pour T > Tm, les domaines en phase gel sont fondus. Selon les connaissances issues de la littérature (chapitre 1), nous savons en revanche que la phase Lo est indifférente aux variations thermiques. Donc, les domaines observés à T > Tm devraient correspondre à un mélange complexe de milk SM et du cholestérol en phase Lo. Pour les cinétiques de refroidissement, nous avons montré que le passage rapide de T=60°C > Tm à T=20 – 4°C < Tm favorise les mécanismes de nucléation avec la formation de nombreux petits domaines, et que l'évolution du temps au cours du stockage favorise ensuite la croissance des domaines. L'analyse chimique a révélé que ces laits présentent des compositions lipidiques qualitativement similaires avec quelques différences en teneur qui pourraient être liées à l'espèce et/ou l'alimentation. Le rapport cholestérol/milk SM était plus important chez la vache que chez la chèvre et la brebis ce qui peut entrainer des différences dans la constitution des domaines de milk SM en phase Lo et donc dans la microstructure des membranes. Cette étude a montré que, quelle que soit l'espèce qui a produit le lait, la microstructure de la membrane du globule gras est un système dynamique qui est hautement sensible aux variations thermiques où les lipides polaires ont la capacité de diffuser et se réorganiser au cours du temps pour atteindre un état d'équilibre.

Cette hétérogénéité de structure de la MFGM est probablement impliquée dans de nombreux mécanismes interfaciaux, tels que l'adsorption d'enzymes (e.g. lipases lors de la digestion des globules gras dans le tractus digestif), l'insertion et l'arrangement des protéines membranaires, les interactions avec les bactéries ou les virus ; ou encore dans la stabilité

physique des globules gras au cours des procédés technologiques. Cependant, ces conséquences fonctionnelles restent à élucider.

Dans la suite de ce travail, nous avons fait l'hypothèse que l'hétérogénéité de structure de la MFGM, qui correspond à la coexistence de domaines en phase ordonnée (gel ou Lo) riches en milk SM et d'une matrice fluide, pourrait générer une hétérogénéité mécanique. Vu la complexité de la MFGM, et notamment la présence des protéines membranaires, nous avons choisi de travailler sur des systèmes modèles simplifiés et de composition contrôlée. L'objectif est de déterminer le rôle de la composition en lipides polaires (saturés vs. insaturés), de leur organisation moléculaire (effet de la longueur de chaine, de l'insaturation), de leur état de phase (gel, fluide, Lo) sur les propriétés mécaniques de la membrane.

De ce chapitre, on retient:

La membrane du globule gras du lait est un système dynamique sensible aux variations thermiques et au stockage au froid ou à température ambiante.

Des domaines riches en milk SM (Tm= 36.4°C) sont observés sur une large gamme de températures allant de 4°C jusqu'à 60°C.

Un chauffage induit soit la diminution de taille voire la disparition de certains domaines, interprétés comme résultant de leur fusion, soit la diffusion et/ou la coalescence d'autres domaines persistant au-delà de la Tm. Ceci suggère que les domaines de milk SM peuvent exister en phase gel (L_β), i.e. susceptibles de fondre à T>Tm, ou en phase liquide ordonné (L_O) i.e. en présence du cholestérol, qui sont insensibles à la température. Trois phases seraient donc présentes dans la membrane du globule gras à T<Tm: la phase continue fluide, des domaines en phase gel et des domaines en phase liquide ordonné.

Un refroidissement rapide conduit à l'apparition de plusieurs petits domaines à la surface du globule, induits par un phénomène de nucléation, qui finissent par former des gros domaines circulaires au cours du temps.

Chapitre 5: Travaux préliminaires à la caractérisation des propriétés mécaniques des membranes lipidiques

5.1. Introduction et objectifs

L'examen des propriétés mécaniques de la membrane du globule gras *in situ* dans le lait et en particulier la détermination des propriétés mécaniques de la phase ordonnée riche en milk SM et de la phase fluide des lipides polaires est un véritable challenge. Comme toutes les émulsions, le lait est un système thermodynamiquement instable et la structure du globule gras peut rapidement évoluer, par exemple par coalescence. Le globule gras du lait est également réactif aux interactions avec les protéines, notamment face à l'action des enzymes telles que les lipases (e.g. lipoprotéine lipase naturellement présente dans le lait, lipases bactériennes). Cela signifie que l'échantillon de lait doit être étudié dans un pas de temps qui est court, de l'ordre de la journée après sa sécrétion par la vache. Le globule gras du lait est un système biologique complexe, avec son cœur de triglycérides qui cristallisent sur une large plage de températures (i.e. -40 à 40°C) entouré par la membrane biologique (MFGM) riche en protéines, lipides polaires et cholestérol. En conséquence, les investigations des propriétés mécaniques de la MFGM autour des globules gras dans le lait peuvent être affectées par les possibles contraintes imposées par les cristaux de triglycérides sur la membrane, et/ou par la présence de nombreuses protéines membranaires qui forment un glycocalyx. A ce jour, seule 1 publication rapporte des mesures d'indentation et de calcul du module de Young sur des globules gras dans leur globalité, tous éléments confondus (Balasuriya et al., 2012).

L'objectif de cette partie du travail de thèse était de déterminer les conditions expérimentales de la préparation des membranes et de définir les types de systèmes à étudier (vésicules, bicouches lipidiques supportées) par AFM en fonction de la composition en lipides.

5.2. Stratégie

Compte-tenu de la complexité du globule gras du lait, nous avons choisi de nous affranchir de la présence du cœur de triglycérides et de la présence de protéines membranaires. Notre stratégie initiale consistait à étudier les propriétés mécaniques de membranes modèles en produisant des vésicules de lipides polaires de composition contrôlée ayant une organisation tridimensionnelle proche du système réel et un diamètre suffisamment grand, de l'ordre du µm comme les globules gras, qui puisse être observées par microscopie confocale à balayage laser (CLSM), et ensuite être immobilisées pour caractériser leurs propriétés élastiques par AFM (Schäfer et al., 2015, 2013). Dans ce contexte, une première partie du travail de thèse a consisté à

mettre en place un protocole pour rechercher les conditions expérimentales permettant la production de ce système modèle et la caractérisation combinée de ses propriétés structurales et mécaniques. Le but de ces travaux préliminaires était de déterminer :

- **La phase aqueuse**: proche de celle du lait avec pH=6.7, contenant du calcium, et qui permette d'éviter l'agrégation des vésicules en optimisant leur dispersion via des répulsions électrostatiques.
- **La composition chimique**: qui permette de mimer les différents états de phases ordonnées (lipides saturés i.e. milk SM) et désordonnée de la MFGM (lipides insaturés) et dont le rapport molaire doit générer une séparation de phases à 20°C, qui est la température de la caractérisation mécanique réalisée par AFM.
- **Le diamètre et la lamellarité des vésicules** : avoir des vésicules d'une taille micrométrique qui sera nécessaire pour coupler et comparer les observations réalisées par microscopie confocale et AFM; et unilamellaires pour déterminer les propriétés mécaniques d'une bicouche de lipides polaires (et non la superposition de bicouches)
- **L'immobilisation des vésicules sur un support**: adsorber des vésicules sur une surface, en milieu liquide et sans trop les endommager, est une étape primordiale pour pouvoir les indenter par la pointe d'AFM et réaliser des mesures de force.

Pour mettre au point ces conditions, nous avons choisi trois types de lipides modèles: le phospholipide insaturé dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) représentant la matrice en phase fluide, et la sphingomyéline du lait (milk SM) avec ou sans cholestérol pour créer des domaines en phase gel ou en phase liquide ordonné. Dans cette étude, nous avons utilisé des vésicules de complexité croissante en termes de composition : milk SM, DOPC, le mélange binaire milk SM/DOPC, et le mélange ternaire milk SM/DOPC/cholestérol. Aussi, pour les essais préliminaires de la thèse, nous avons fait le choix de préparer les vésicules par un processus de fabrication simple. Nous avons priviliégié l'utilisation des vésicules unilamellaires (Large Unilamellar Vesicules, LUV) en raison de leur facilité de fabrication par agitation au vortex et de caractérisation par microscopie confocale et AFM. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'effet du tampon et de sa concentration en sels sur la stabilité et la dispersion des vésicules. Après avoir sélectionné la phase aqueuse, nous avons déterminé, à l'aide de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), les températures de transition de phase des membranes hétérogènes modèles de la MFGM en variant la composition en lipides polaires. Ainsi, nous avons pu choisir les rapports molaires milk SM/DOPC et milk SM/DOPC/cholestérol pour lesquels l'observation d'une coexistence de phases est possible à 20°C. Pour les mélanges binaires (milk SM/DOPC), les vésicules ont été observées par microscopie confocale en utilisant des sondes fluorescentes

exogènes Rh-DOPE ou Top fluor SM qui permettent de marquer respectivement la phase fluide ou les domaines de milk SM d'une membrane. Pour les mélanges ternaires (SM/DOPC/cholestérol), l'analyse thermique et la caractérisation par microscopie nous ont permis de connaitre l'effet de l'ajout du cholestérol sur l'état de phase des membranes et par conséquent sur la stabilité des vésicules. Les observations issues de ces expérimentations ont orienté nos choix concernant le système modèle et son dimensionnement. Dans un deuxième temps, une caractérisation préliminaire de la stabilité des vésicules adsorbées sur des supports de propriétés surfaciques différentes a été nécessaire en vue de réaliser la caractérisation mécanique par AFM. Cette stratégie nous a permis de déterminer les conditions optimales pour une meilleure d'immobilisation. Les choix stratégiques argumentés pour la suite de ce travail seront basés sur les résultats obtenus dans ce chapitre.

5.3. Conditions expérimentales pour la fabrication de vésicules

5.3.1. Sélection de la phase aqueuse pour l'obtention de vésicules individualisées

Pour hydrater les lipides, nous avons choisi une solution tampon afin de pouvoir maintenir le pH. La préférence est donnée à l'utilisation d'un tampon PIPES 10 mM contenant 50 mM NaCl et du $CaCl_2$ qui peut être rajouté à différentes concentrations pour tenir compte du mélange de lipides considéré (comme dans Cheng et al., 2017; Guyomarc'h et al., 2014; Murthy et al., 2015). Nous avons donc testé plusieurs concentrations en $CaCl_2$ afin de déterminer l'effet de la charge des vésicules, modulée par la présence des sels, sur leur production et leur dispersion.

Un autre type de tampon, très pauvre en calcium (~ 0 mM lié au calcium résiduel évalué à 10 µM), a également été testé. Il s'agit du tampon phosphate salin (PBS ×1) composé de 1.36 M NaCl, 0.02 M KCl , 0.014M KH_2PO_4 et 0.2 M Na_2HPO_4 (comme dans Delorme and Fery, 2006). Ce tampon a été utilisé uniquement pour effectuer une comparaison avec les résultats disponibles dans la littérature concernant la détermination des propriétés mécaniques de liposomes composés de phospholipides (Delorme and Fery, 2006).

Dans le tampon PIPES, nous avons étudié l'effet de la teneur en calcium (~ 0-10 mM) sur le potentiel zêta des vésicules. Ces dernières ont été obtenues par réhydratation à chaud d'un film lipidique préalablement préparé comme indiqué dans le chapitre 3 (section 3.2.1.1), puis une agitation au vortex pendant 1-2 minutes et enfin un temps d'équilibration (1 heure) à température ambiante. Les vésicules obtenues par ce procédé présentent généralement une taille moyenne de quelques µm (Figure 46). La taille des vésicules obtenues permet leur observation par microscopie

confocale à balayage laser, la détermination de leur lamellarité et l'évaluation de leur éventuelle agrégation.

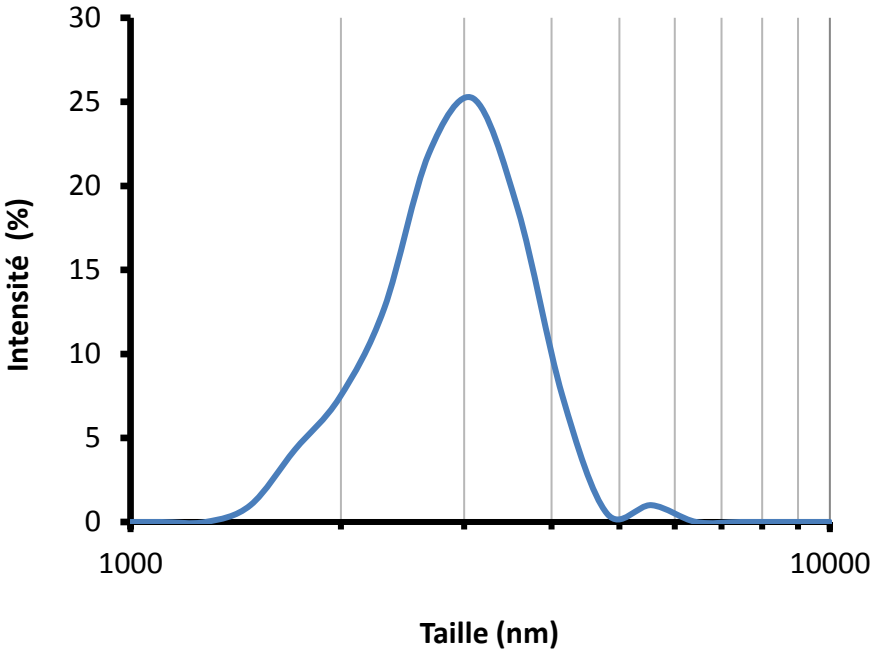
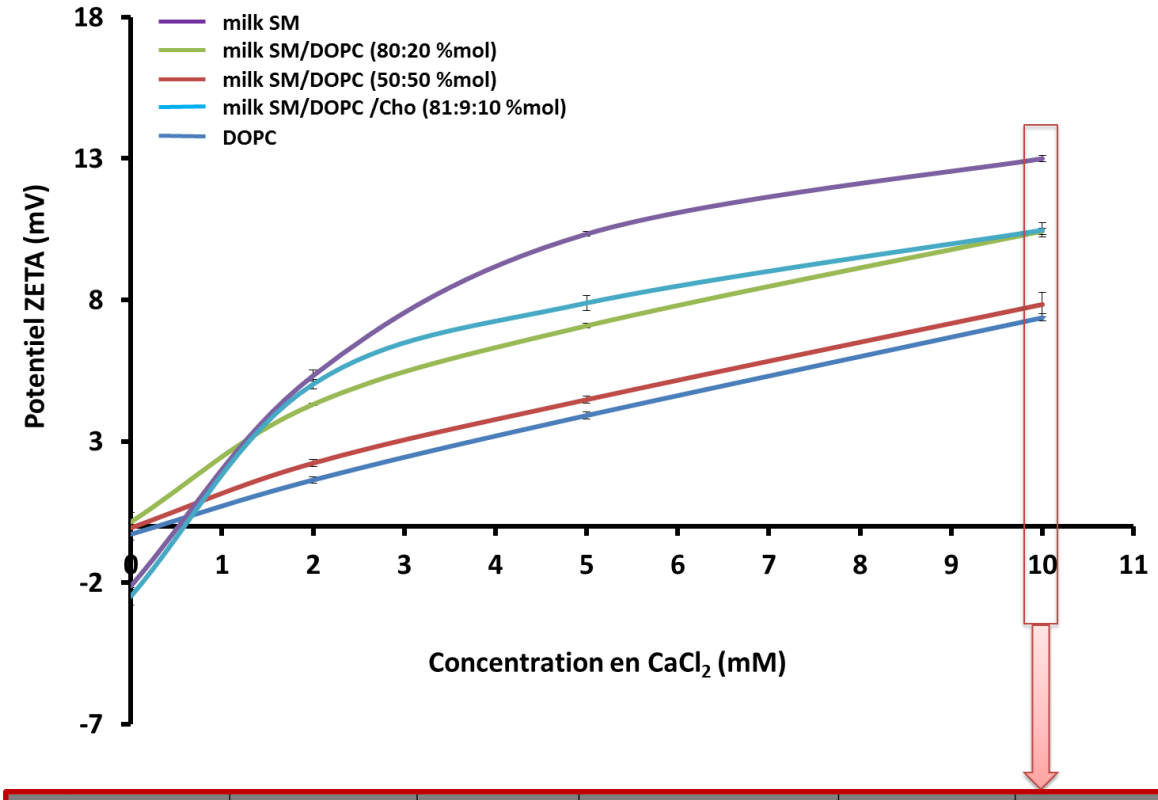


Figure 46 : Distribution du diamètre hydrodynamique des vésicules de milk SM hydratées par un tampon PIPES à 10 mM de $CaCl_2$, pH =6.7, mesurée à 20°C par diffusion dynamique de la lumière.

Il est bien connu que la charge de surface de vésicules lipidiques peut être modifiée en fonction des ions présents dans la phase aqueuse (Maherani et al., 2012b; Mirza et al., 1998; Mosharraf et al., 1995; Sinn et al., 2006). La nature zwittérionique des molécules à tête PC comme DOPC ou la milk SM fait qu'elles ne possèdent pas de charge nette à pH 6.7 en l'absence d'ions, ce qui conduit à leur agrégation. Au contraire, un potentiel zêta élevé contribue à la stabilisation des vésicules grâce à l'établissement de répulsions électrostatiques (Mosharraf et al., 1995). Cette charge de surface peut être calculée à partir de la mesure de la mobilité électrophorétique des vésicules dans différents milieux et en présence de différentes concentrations en sels.

Dans le tampon PIPES en l'absence de calcium, les mesures de potentiel zêta ont montré que les vésicules de DOPC ou de milk SM étaient faiblement électronégatives ou électriquement neutres (Figure 47). Ainsi, dans le PIPES sans calcium les valeurs du potentiel zêta étaient de -2.12 mV pour la milk SM, de -0.28 mV pour le DOPC, de 0.15 ou -0.06 mV pour les mélanges milk SM/DOPC 80:20 % mol. ou 50:50 % mol. respectivement, et de -2.48 mV pour le mélange milk SM/DOPC/cholestérol (81:9:10 % mol.).

Nous avons montré que l'augmentation de la concentration en calcium dans le tampon PIPES conduit à une augmentation de la valeur du potentiel zêta des vésicules de DOPC, de milk SM ou du mélange milk SM/DOPC ou milk SM/DOPC/cholestérol (Figure 47). A 10 mM de calcium, toutes les vésicules, quelle que soit leur composition, étaient chargées positivement. Ainsi, les valeurs du potentiel zêta étaient de +13.2mV pour la milk SM, de +7.4 mV pour le DOPC, de +10.5 ou +7.3 mV pour les mélanges milk SM/DOPC 80:20 % mol. ou 50:50 % mol. respectivement, et de +10.5 mV pour le mélange milk SM/DOPC/cholestérol (81:9:10 % mol.).



Échantillon	milk SM 100 (%mol)	milk SM 80:20 (%mol)	milk SM/DOPC/chol 81:9:10 (%mol)	milk SM 50:50 (%mol)	DOPC 100 (%mol)
Potentiel zêta (mV) à 10 mM $CaCl_2$	+ 13.0	+ 10.4	+ 10.5	+ 7.30	+ 7.4

Figure 47: Effet de la concentration en calcium sur la charge surfacique de vésicules de différentes compositions. Le tableau indique les valeurs du potentiel zêta mesuré dans un tampon PIPES à 10 mM de calcium pour les compositions suivantes : milk SM, DOPC, milk SM/DOPC, milk SM/DOPC/cholestérol

Dans le tampon PBS, comme dans le tampon PIPES en absence du calcium, les valeurs ont été faiblement négatives. Les vésicules de milk SM avaient un potentiel zêta de -4.83 mV, et celles de milk SM /DOPC 50:50 % mol avaient un potentiel zêta de -1.96 mV. Les autres échantillons n'ont pas été mesurés dans le PBS.

Parallèlement, les vésicules ont été observées par microscopie confocale à balayage laser en utilisant un objectif ×100, après avoir été marquées avec la sonde fluorescente rouge de Nile (excitation à λ=543 nm). Les images des vésicules ont été acquises dans un tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à différentes concentrations en calcium (~ 0, 2, 5 ou 10 mM), ou dans le tampon PBS. Dans le tampon PIPES, les observations ont montré que l'absence de calcium a provoqué un phénomène d'agrégation des vésicules de milk SM (Figure 48). En augmentant la concentration du $CaCl_2$, les vésicules ont tendance à s'individualiser. **De ces expérimentations, nous avons conclu qu'une teneur en calcium de 10 mM est optimale pour la dispersion des vésicules de milk SM.** Des résultats identiques (non montrés) ont été obtenus pour d'autre types de vésicules de composition homogène (DOPC) ou hétérogène (milk SM/DOPC avec ou sans cholestérol). La Figure 48 présente les images obtenues en présence de 10 mM de calcium, où toutes les vésicules sont dispersées, sauf celles contenant du cholestérol.

Dans le tampon PBS, les images obtenues par microscopie confocale ont montré une bonne dispersion des vésicules de milk SM, malgré leur charge faible (Figure 48). Les autres échantillons n'ont pas été observés dans ce tampon.

Ces résultats montrent que la présence de calcium est favorable à la préparation de vésicules stables (non agrégées) pour notre étude.

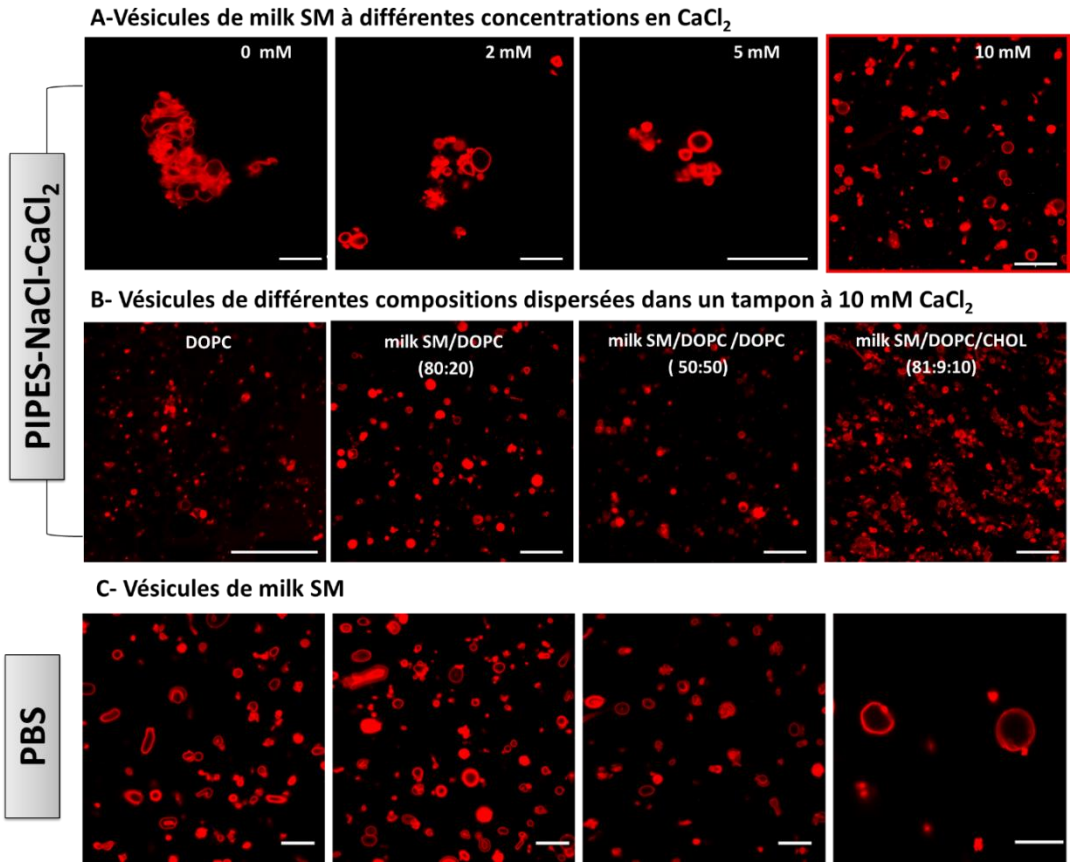


Figure 48: Images de microscopie confocale montrant les vésicules lipidiques marquées avec du rouge de Nile. Ces vésicules ont été obtenues par vortex et dispersées dans différents milieux. A) vésicules de sphingomyéline du lait (milk SM) dans un tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à différentes concentrations en calcium (~0, 2, 5, 10 mM). B) vésicules composées de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), de milk SM/DOPC (80:20 % mol.; 50:50 % mol.) ou de milk SM/DOPC/cholestérol (81:9 :10 % mol.) dans un tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à 10 mM de calcium. C) vésicules composées de milk SM dans un tampon PBS. Les barres d'échelle représentent 10 µm.

Les images de microscopie confocale montrent qu'en dépit de la simplicité du protocole de préparation utilisé (agitation par vortex), les suspensions contenaient une quantité importante de vésicules unilamellaires. Il est possible que les répulsions électrostatiques induites par la présence d'ions inhibent l'empilement des bicouches concentriques à l'origine des vésicules multilamellaires. Cette observation est intéressante car elle nous permet d'envisager de travailler à partir de LUV, qui serait adaptée à un couplage entre des observations par microcopies confocale et par AFM. Cette stratégie a été testée et les résultats sont présentés à la section 5.3.2.1.

En conclusion, nous avons montré que la présence du calcium, composant important de la phase aqueuse du lait, en forte concentration (10 mM $CaCl_2$) renforce la charge positive des vésicules contenant des lipides polaires zwitterioniques comme DOPC et milk SM. Cette teneur en calcium favorise la dispersion en évitant l'agrégation des vésicules (Maherani et al., 2012a; Mosharraf et al., 1995) et favorise également la formation de vésicules unilamellaires. La présence de calcium dans les échantillons pourrait par la suite également aider à optimiser l'adsorption et la stabilité des vésicules immobilisées (via des interactions électrostatiques entre la bicouche chargée positivement et une surface chargée négativement) pour pouvoir les indenter par AFM (Dimitrievski and Kasemo, 2008) ou encore contribuer à la bonne formation de bicouches lipidiques supportées sur la surface hydrophile du mica (Richter et al., 2006).

5.3.2. Sélection de la composition lipidique pour visualiser une séparation de phases

Pour mettre au point la composition chimique du système modèle de la bicouche externe de la membrane du globule gras, plusieurs rapports molaires de milk SM/DOPC ont été préparés. Les échantillons ont été caractérisés par DSC pour pouvoir sélectionner la composition permettant la création d'une hétérogénéité de structure, induite par la différence de phases de lipides ayant des Tm éloignées (Tm-DOPC =-20°C ; Tm-milk SM = 34 °C), telle qu'elle a été observée dans le plan de la MFGM (Lopez et al., 2010). L'effet de la présence de cholestérol (chol) a également été considéré, et nous avons étudié le comportement thermique et structural des vésicules composées d'un système ternaire milk SM/DOPC/chol à différents rapports molaires.

5.3.2.1. Système binaire milk SM/DOPC

Dans un premier temps, l'objectif était de caractériser la coexistence de phases dans un système binaire composé de milk SM et de DOPC (Bezlyepkina et al., 2013). Pour cela, nous avons préparé des suspensions de vésicules, de plusieurs rapports molaires milk SM/DOPC formées, par vortex après hydratation à chaud d'un film lipidique par un tampon PIPES-NaCl-10 mM $CaCl_2$ pour atteindre une concentration en lipides de 20% wt. Ces vésicules ont été caractérisés par DSC afin d'étudier l'effet de la dispersion de la milk SM dans le DOPC sur la température de transition de phase gel/fluide du système en fonction de sa composition. La Figure 49 présente les thermogrammes résultant de cette analyse thermique. En absence de DOPC, le changement de phase des membranes de milk SM se manifeste par un seul pic endothermique dont le maximum correspond à la température de transition Tm = 34.3°C de la milk SM (Murthy et al., 2015). L'introduction de DOPC sur une quantité fixe de milk SM, pour atteindre des rapports molaires de 30:70 à 90:10 % mol. milk SM/DOPC, conduit à l'apparition de deux endothermes qu'on associe à une transition de phase. En deçà de la température de transition, le système est probablement biphasique, avec une phase ordonnée riche en milk SM, et une phase désordonnée riche en DOPC (Guyomarc'h et al., 2014). L'augmentation de la proportion de DOPC induit un décalage de la Tm du premier endotherme, caractéristique de la milk SM (milk SM/DOPC 100:0% mol), vers les plus basses températures, jusqu'à sa disparition en l'absence de milk SM (0:100 % mol). L'apparition d'un second endotherme a été observée à partir de milk SM/DOPC 90:10 % mol jusqu'à sa disparition à milk SM/DOPC 30:70 % mol.

Il est important de remarquer que le système binaire milk SM/DOPC 30 :70 % mol, qui d'un point de vue chimique est proche du mélange de lipides polaires de la MFGM (30% de milk SM), a des propriétés thermiques totalement différentes notamment une plage de température de transition de phase abaissée (Tm d'un extrait de lipides polaires de la MFGM = 36.4°C; Murthy et al., 2015). Cela pose la question de la pertinence de ce système binaire modèle par rapport au système réel.

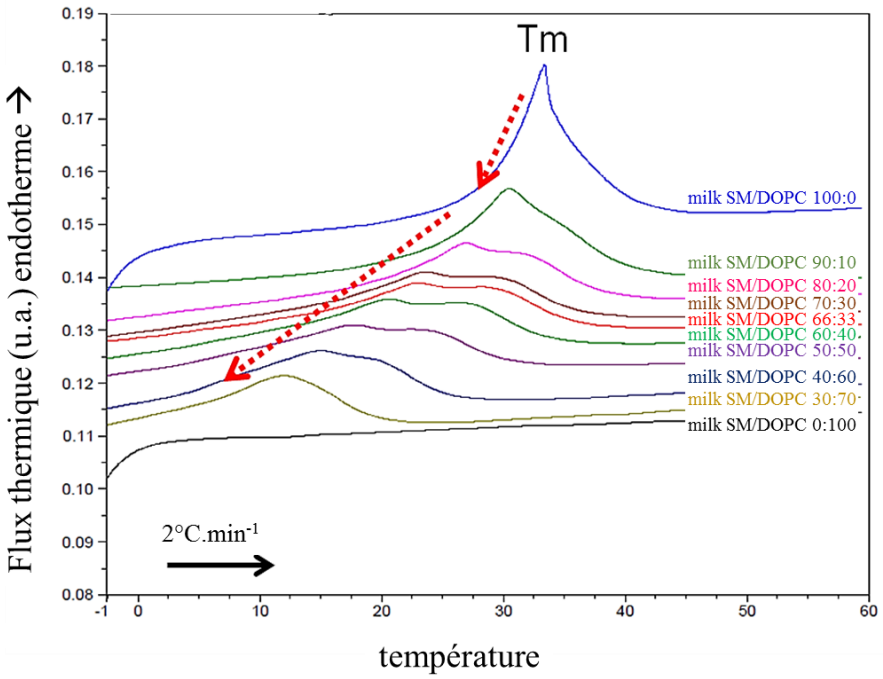


Figure 49: Thermogrammes obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sur des vésicules composées de différent rapports molaires de sphingomyéline de lait (milk SM) et dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) pour caractériser l'effet de la dispersion d'une quantité fixe de milk SM dans le DOPC sur la température de transition de phase gel fluide. Les analyses sont réalisées dans du tampon PIPES-NaCl à 10 mM $CaCl_2$ à pH 6.7.

Dans l'objectif de caractériser par microscopie confocale et par AFM des vésicules avec une séparation de phase des lipides, **nous avons choisi un rapport molaire milk SM/ DOPC de 80:20% mol.**, qui incorpore une certaine proportion de DOPC tout en présentant une température de transition de phase comprise entre 26 et 32.5°C. Ce mélange binaire devrait permettre de visualiser la coexistence de phases à 20°C, qui est la température de caractérisation structurale par microscopie confocale et mécanique par microscopie à force atomique.

Les vésicules ainsi produites ont été marquées par deux sondes fluorescentes, la Rh-DOPE (0.5 % mol.; λ = 543 nm ; rouge) et le Top Fluor-SM (0.5 %mol. ; λ = 488 nm ; vert) préalablement introduites avec les lipides polaires pendant la préparation des films lipidiques (chapitre 3, section 3.2.2.1). Ces sondes ont été choisies car elles ont une affinité à la fois pour la phase fluide riche en DOPC et pour la milk SM (en phase gel à 20°C). En microscopie confocale, les signaux de fluorescence détectés séparément peuvent être ensuite superposés (Figure 51). Si des vésicules individuelles apparaissent totalement vertes donc riches en Top Fluor SM, ou totalement rouges donc riches en DOPC, cela signifie que les lipides (milk SM et DOPC) sont mal mélangés et se ségrégent dans des vésicules différentes (Figure 51). Si les vésicules montrent une membrane alternativement rouge et verte, ce qui indique que les lipides sont répartis sur tous les objets mais qu'il y a une séparation de phases (situation ciblée). Si enfin les vésicules montrent une superposition du rouge et du vert (un mélange qui apparaît en jaune sur les images), ceci signifie

que la séparation de phase est peu visible (domaines très dispersés ou très petits) ou que DOPC et milk SM sont mélangés (colocalisation des sondes fluorescentes).

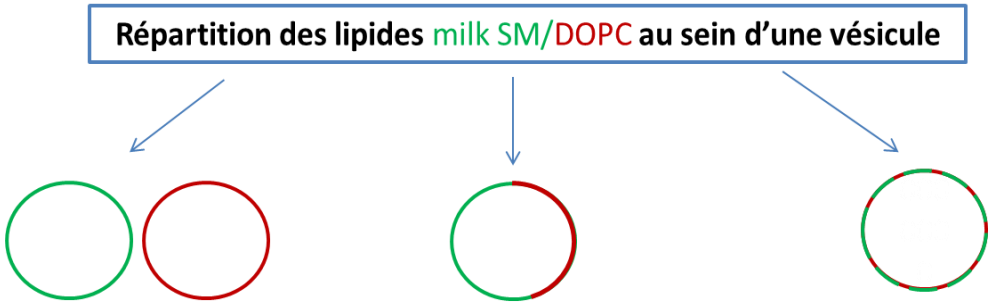


Figure 50: Schématisation de la répartition des sondes fluorescentes, et donc des lipides, dans les vésicules. Les lipides peuvent être répartis de manière hétérogène qui finit par créer deux populations de vésicules de compositions différentes, ou d'une manière homogène sur toutes les vésicules i.e. elles contiennent les deux types de lipides, en séparation de phases ou bien colocalisés.

Dans notre cas, les observations par microscopie confocale ont montré que les vésicules de milk SM/DOPC présentaient chacun de ces trois types de répartition des couleurs (Figure 50). Les vésicules peuvent être soit uniphasiques en contenant uniquement milk SM (Figure 51 B et C), ou biphasiques suite à la présence des deux lipides ayant deux phases différentes phases fluide/gel (Figure 51 A et B). La ségrégation des lipides de milk SM conduit à la formation de grands domaines (séparation complète de phases) ou de petits domaines distribués uniformément dans le plan de la membrane (Figure 51 A). Nous avons également remarqué que de nombreuses vésicules présentaient une colocalisation des couleurs (rouge /verre), ce qui peut être interprété par une solubilisation des molécules de DOPC dans la phase gel de milk SM et donc une absence de ségrégation. Si l'on se réfère aux diagrammes de phases de systèmes proches du nôtre, il faut souligner que l'organisation du mélange milk SM/DOPC 80/20 % mol. est peut-être à la limite entre une phase unique gel, et deux phases fluide et gel (De Almeida et al., 2003; Halling et al., 2008; Veatch and Keller, 2003), ce qui peut expliquer nos difficultés. De plus, l'ajout des molécules fluorescentes a induit une forte agrégation des vésicules malgré la présence de 10 mM de calcium comme défini précédemment (Figure 51 A, B et C).

En utilisant le même système binaire, nous avons essayé, dans une deuxième expérience, de visualiser la séparation de phases mais en utilisant cette fois-ci un simple marquage par la sonde Top fluor SM (Figure 51 I, J et K). Ainsi, on espère distinguer la phase gel de milk SM colorée en vert, de la phase fluide non marquée de DOPC, c'est-à-dire faire l'inverse de ce qui a été pratiqué dans le chapitre 4, où seule la phase fluide était marquée par la Rh-DOPE et laissait apparaître les domaines riches en SM (non marqués avec la sonre Dh-DOPE). Cependant, l'analyse d'images montre qu'aucune zone non-fluorescente n'a été observée, contrairement à ce qui peut être vu

lorsqu'on utilise la Rh-DOPE. Ce résultat inattendu ne nous a pas permis de préciser l'organisation des lipides polaires au sein de la membrane de nos vésicules.

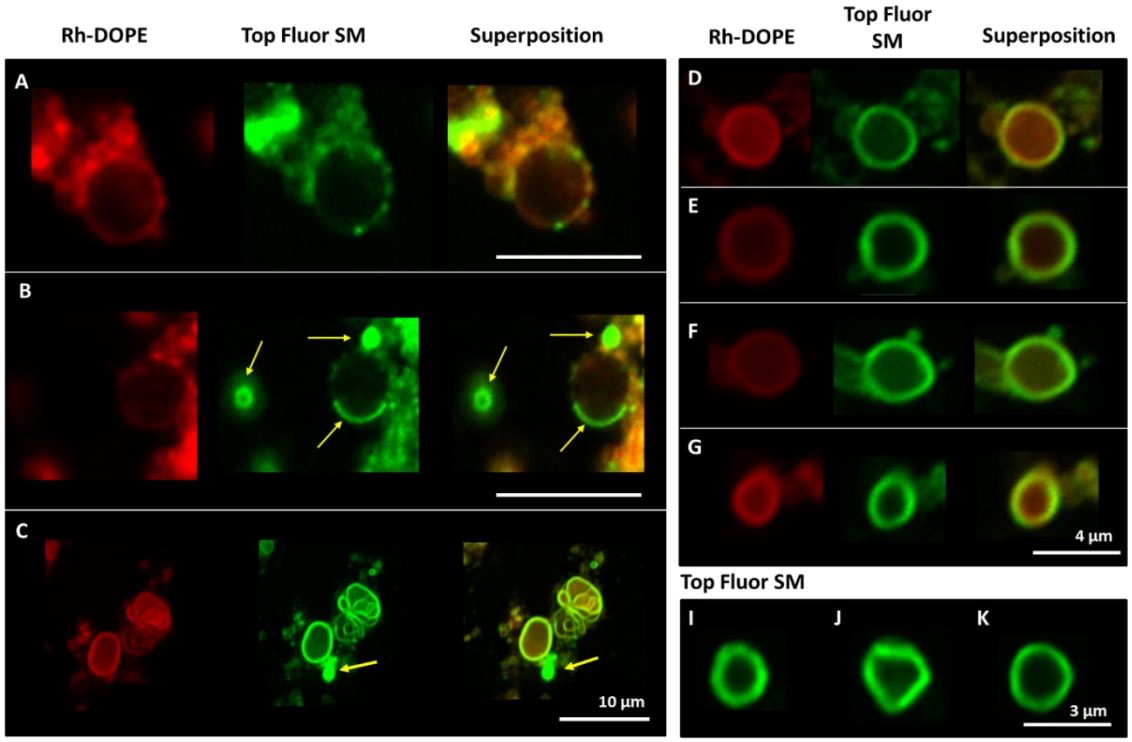


Figure 51: Images de vésicules obtenues par réhydratation à chaud et agitation par vortex de films lipidiques contenant un rapport molaire milk SM/ DOPC de 80:20 % mol., et marquées par de la Rh-DOPE (en rouge) et/ou du Top fluor SM (en vert). Les observations sont réalisées par microscopie confocale à balayage laser, dans du tampon PIPES-NaCl contenant 10 mM de $CaCl_2$, à pH 6.7 et à 20°C.

Ayant des difficultés à visualiser une séparation de phase avec le système binaire milk SM/DOPC (80:20 %mol), nous avons décidé de travailler avec un autre rapport molaire plus équilibré, composé de 50% mol de milk SM et 50% mol de DOPC. Selon les diagrammes de phases, nous avons supposé que cette composition nous permettrait de discriminer facilement les deux phases, gel et fluide. Les vésicules de milk SM/DOPC (50:50 % mol) ont été doublement marquées par Top fluor SM et Rh-DOPE, ou séparément par une de ces deux sondes fluorescentes. Notre attente était d'observer des membranes biphasiques qui seraient soit bicolores (rouge et vert), soit unicolores avec la présence des zones non fluorescentes qui correspondent à une phase gel (pour le marquage par Rh-DOPE) ou à une phase fluide (pour le marquage par Top fluor SM). La caractérisation par microscopie confocale a été réalisée à 20°C car c'est une température pour laquelle la composition milk SM/DOPC (50:50 % mol) n'est pas complètement fluide offrant toujours la possibilité de voir une séparation gel/fluide et par conséquent pouvoir la caractériser mécaniquement par AFM à température ambiante. La caractérisation par microscopie confocale de ce système a montré des résultats similaires à ceux obtenus pour milk SM/ DOPC de 80:20%

mol. Les images obtenues (Figure 52) ont montré qu'aucune séparation de phases n'a eu lieu quel que soit le type de marquage, simple ou double.

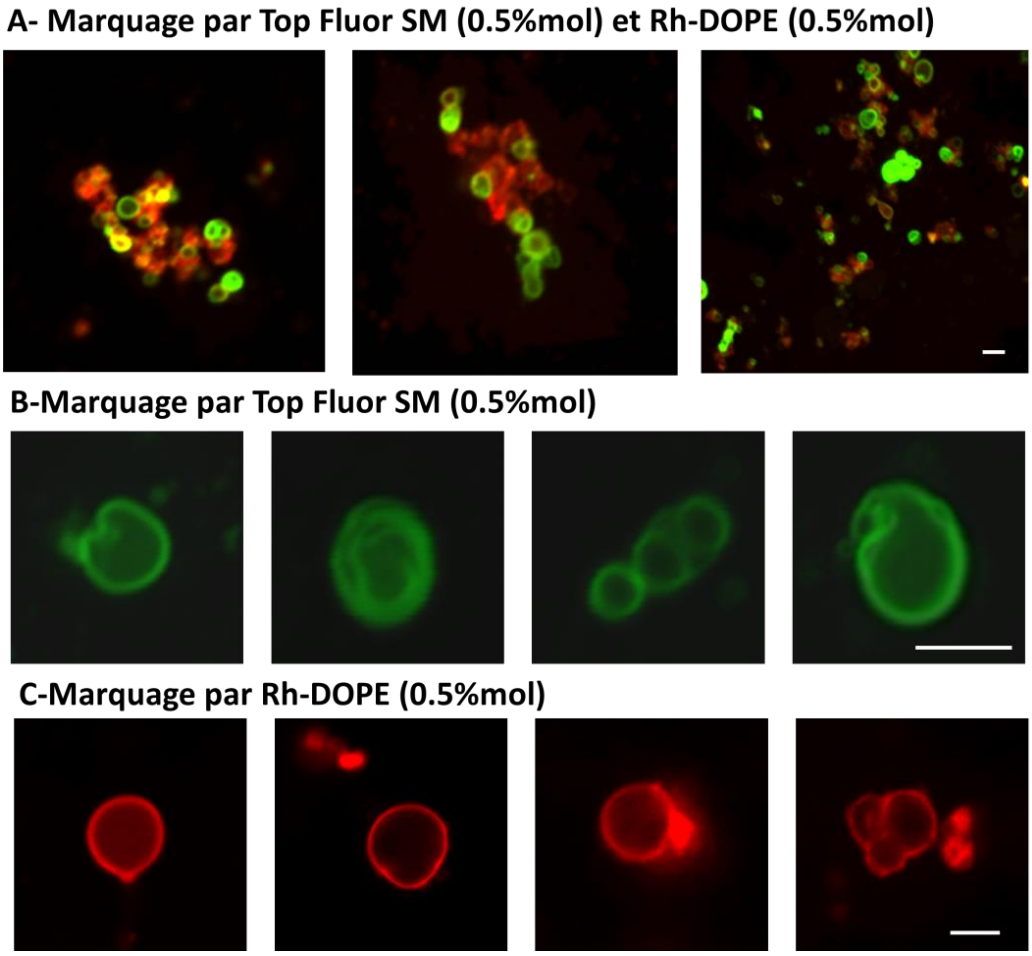


Figure 52: Images de vésicules obtenues par réhydratation à chaud et agitation par vortex de films lipidiques contenant un rapport molaire milk SM/ DOPC de 50:50 % mol., et marquées par de la Rh-DOPE (en rouge) et/ou du Top fluor SM (en vert). Les observations sont réalisées par microscopie confocale à balayage laser, dans du tampon PIPES-NaCl contenant 10 mM de $CaCl_2$, à pH 6.7 et à 20°C.barre d'échelle est de 5 µm.

En conclusion, il n'a pas été possible de visualiser une séparation de phases dans les membranes de vésicules de milk SM/DOPC, alors qu'elle a été caractérisée en 2D dans des SLB par AFM (Guyomarc'h et al., 2017). Peut-être devons-nous relier ce problème au choix de la méthode de préparation des vésicules, à leur durée d'équilibration, à la petite taille des domaines, ou encore à l'influence des sondes sur la séparation des phases.

En 3D, la littérature montre qu'il est possible de visualiser cette coexistence de phases à des température inférieures ou au cours de la transition, à la surface de vésicules unilamellaires de grande taille (giant unilamellar vesicle, GUV) composées soit d'un mélange binaire tel que $SM_{cerveau}$/DOPC (70:30%mol, 50:50%mol; Kinoshita et al., 2014) ou DPPC/DOPC (70:30%mol;

Chen and Santore, 2014) ; ou d'un mélange ternaire tel que SM_{oeuf}/DOPC/Chol (25:45:30%mol; Carravilla et al., 2015). Il est possible que l'utilisation des GUV et surtout la façon de mélanger les lipides et de fabriquer les films lipidiques jouent un rôle important dans l'obtention de la séparation des phases dans les membranes. En effet, la production des GUV par éléctroformation est une méthode très délicate qui permet d'avoir des systèmes membranaires thermodynamiquement beaucoup plus stables, mais qui nécessite l'élaboration d'un protocole spécifique aux mélanges des lipides utilisés et leur température de transition de phase, la phase aqueuse, la concentration en sels… (Méléard et al., 2009; Morales-Penningston et al., 2010).

Par conséquent, nous avons décidé de renoncer à l'idée de visualiser la séparation de phases dans des membranes en 3D (vésicules) pour plusieurs raisons : (1) la fabrication des GUV par électroformation exige l'acquisition et la maîtrise de la technique peut être consommatrice de temps sans avoir la garantie de pouvoir réussir un tel système complexe, notamment en présence de la milk SM (mélange de plusieurs espèces moléculaires), et dont le diagramme de phases n'a jamais été défini dans la littérature ; (2) pour rappel, l'objectif principal de ce travail de thèse est de caractériser les propriétés mécaniques des membranes lipidiques, qu'on peut également représenter par d'autres modèles tels que les LUV, les SUV ou les bicouches de lipides supportées SLB, mieux maîtrisés. Si la taille des SUV ne permet pas de visualiser une séparation de phases, elles restent un bon modèle de membrane courbe pour obtenir des valeurs de référence à partir de l'indentation de vésicules homogènes composées d'un seul lipide polaire.

5.3.2.2. Système ternaire milk SM/DOPC/cholestérol

Dans la continuité des résultats du chapitre 4, nous souhaitions tenir compte de la présence du cholestérol dans l'étude des propriétés structurales et mécaniques des membranes de lipides polaires laitiers. En effet, cette molécule est connue pour sa capacité à modifier l'organisation des structures lipidiques (chapitre 1, section 1.1.2, Murthy et al., 2015; Simons and Vaz, 2004).

Notre stratégie a consisté à caractériser les propriétés thermiques du système ternaire milk SM/DOPC/cholestérol, ainsi que la morphologie et la stabilité des vésicules formées. Pour cela, des vésicules produites par hydratation à chaud d'un film lipidique en utilisant le tampon PIPES préalablement défini avec 10 mM de calcium et agitation au vortex ont été composées de différents rapports molaires pour lesquels nous avons fixé la quantité du mélange milk SM/DOPC (90:10 %mol) et fait varier la concentration en cholestérol. Comme dans le cas des mélanges binaires, une analyse thermique a été préalablement réalisée par DSC afin de déterminer la concentration en cholestérol pour laquelle le système ne présente plus de transition de phase gel – fluide et se trouve

donc en phase liquide ordonné. Les résultats obtenus par DSC ont montré que la composition affecte la température de transition Tm ainsi que le profil des thermogrammes. En augmentant la concentration en cholestérol, nous avons remarqué l'apparition de deux pics endothermiques. La Tm du premier endotherme se décale vers les basses températures, jusqu'à sa disparition, tandis que le second subit une diminution d'amplitude (Figure 53). Pour des concentrations supérieures à 40% mol. de cholestérol, aucune transition de phase n'a été observée, on dit alors que la milk SM et le DOPC sont bloqués en phase liquide ordonné.

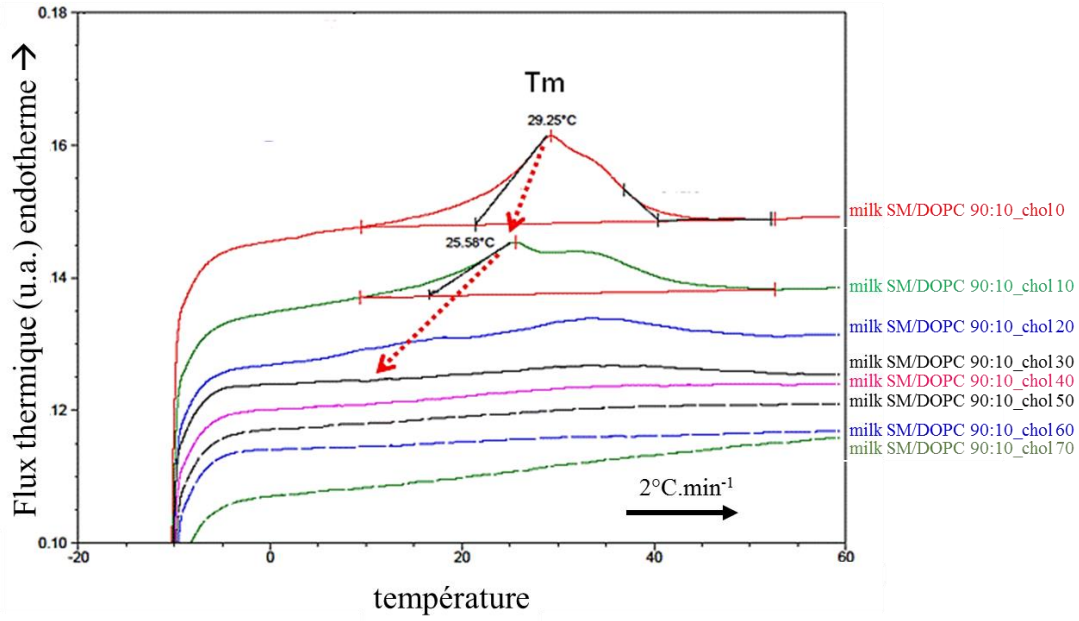


Figure 53: Thermogrammes obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) des vésicules composées de différents rapports molaires en sphingomyéline de lait (milk SM), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et cholestérol (chol) pour étudier l'effet du cholestérol sur la transition de phase. Les analyses étaient réalisées dans le tampon PIPES-NaCl à 10 mM $CaCl_2$ et à pH 6.7.

Nous avons également étudié l'effet du cholestérol sur la forme et la stabilité des vésicules en utilisant la microscopie confocale. Des suspensions de vésicules de compositions différentes ont été marquées par la sonde rouge de Nil dans le but de caractériser l'aspect général des vésicules suspendues dans la phase aqueuse à 20°C. Aucune caractérisation de la séparation de phases n'a été réalisée dans cette partie, au vu de difficultés rencontrées précédemment dans les systèmes binaires. En l'absence de cholestérol, les vésicules de milk SM sont bien dispersées dans la phase aqueuse et possèdent des structures sphériques plus ou moins facettées, résultat de leur état en phase gel (Kuntsche et al., 2011; Staneva et al., 2009). Comparativement aux vésicules de milk SM/DOPC 90:10 dans les mêmes conditions, la présence du cholestérol a généré deux phénomènes qui sont l'agrégation et la fusion des membranes (Figure 54). Dès 20 % mol. de cholestérol, alors que la transition de phase est déjà presque terminée (Figure 53), des structures non sphériques sont observées. A 50 % mol de chol, les membranes sont totalement en phase liquide ordonné (pas

de transition), ce qui augmente leur fluidité et accentue la fusion des vésicules (gros agrégats, tubes). On conclut alors que l'ajout de cholestérol sur une quantité fixe d'un mélange binaire milk SM/DOPC 90 :10 % mol. modifie les propriétés physiques des vésicules, ce qui est en accord avec les résultats de DSC.

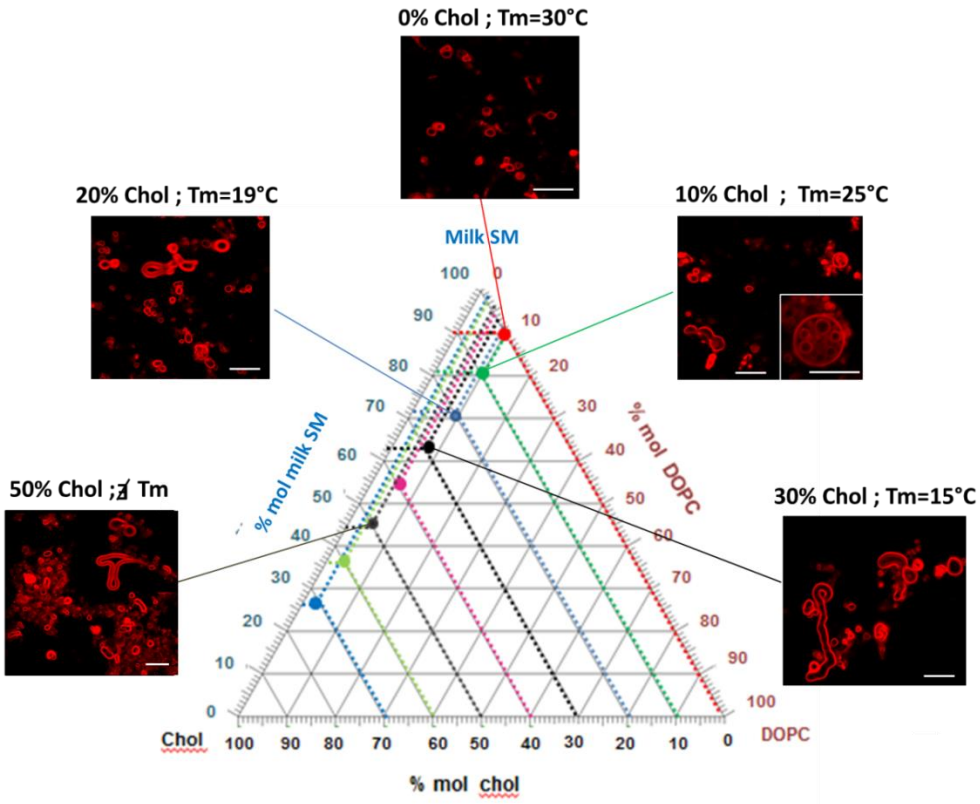


Figure 54: Images de microscopie confocale de vésicules composées de différents rapports molaires en sphingomyéline de lait (milkSM), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et cholestérol (chol) contenant différents taux de cholestérol (0, 10,20, 30, 50% mol) et marquées par une sonde fluorescente rouge de Nile. La barre d'echelle est de 10 µm.

En conclusion, les observations par microscopie confocale ont montré que les vésicules de milk SM/DOPC contenant du cholestérol perdent leur forme sphérique et sont rapidement instables. Pour la suite du travail de thèse, l'utilisation de ces vésicules ne s'est pas avérée judicieuse pour étudier l'effet du cholestérol sur les propriétés mécaniques des assemblages de lipides polaires en bicouche, notamment en présence des concentrations en chol nécessaires pour mimer des membranes en phase liquide ordonné.

Une alternative consiste en l'utilisation de bicouches lipidiques supportées (SLB), planes et immobilisées par interaction avec un substrat hydrophile (Murthy et al., 2015; Reimhult et al., 2003). Plusieurs protocoles permettant la formation de ces systèmes bidimensionnels existent et sont relativement aisés à mettre en oeuvre. Dans la littérature, les SLBs sont couramment utilisées comme système modèle pour l'étude des membranes biologiques par AFM, du fait qu'elles sont

expérimentalement adaptées au balayage par la pointe et permettent de caractériser à la fois les propriétés structurales et mécaniques (Garcia-Manyes and Sanz, 2010; Li et al., 2010; Samsonov et al., 2001), dans des conditions précises que nous discuterons au chapitre 6.

5.3.3. Diamètre et unilamellarité des vésicules

La fabrication des vésicules par une simple agitation mécanique (vortex) après réhydratation d'un film lipidique à chaud dans du tampon PIPES en présence de 10 mM de calcium permet d'obtenir de vésicules unilamellaires et de taille micrométrique (~LUV). Cependant, il faut souligner que l'agitation par vortex produit également des vésicules multilamellaires. Des vésicules multilamellaires de type vésicules incluses ou oignon ont été observées (Figure 55 D, E et C). Nous avons également remarqué l'existence d'autres types de vésicules dont l'organisation des bicouches interne forme un « réseau » comme le montrent les images A et B de la Figure 55.

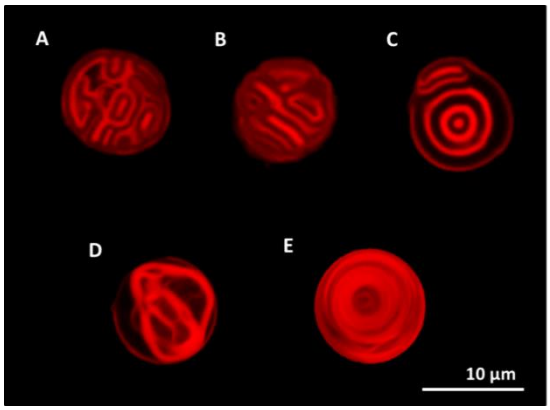


Figure 55: Exemples de différents types de vésicules multilamellaires visualisées par microscopie confocale après marquage au rouge de Nile. Les vésicules sont composées de milk SM /DOPC (80:20) (A, B et C) ou DOPC (D et E)

L'avantage d'utiliser les vésicules produites par vortex tient dans leur facilité de fabrication et leur diamètre qui est adapté à la résolution du microscope confocal qui nous a permis de les caractériser d'une manière rapide et efficace. Cependant, ce type de vésicules reste un système hétérogène et instable qui varie en fonction de sa composition chimique. La présence incontrôlable de plusieurs bicouches représente un véritable inconvénient qui empêche de mesurer les propriétés mécaniques d'une seule bicouche de lipides polaires par AFM. De plus, il nous a été difficile de former des vésicules avec une séparation de phases des vésicules biphasiques (section 5.3.2.2).

Nous avons renoncé à l'utilisation des vésicules de taille micrométrique pour la suite du travail de thèse. Nous avons donc choisi de travailler sur des vésicules unilamellaires de petite taille (SUV ; 100 – 200 nm) qui sont obtenues à partir des MLV par un processus de sonication (Hope et al., 1986). Leur diamètre, de l'ordre d'une centaine de nanomètres, ne nous permet pas de les visualiser par microscopie confocale mais est bien adapté à la caractérisation par d'autres techniques comme

la cryo-TEM ou l'AFM. Ainsi, les SUV constituent un système de choix pour réaliser des mesures mécaniques sur des bicouches lipidiques en volume, sphériques comme le globule gras, mais de composition simplifiée pour établir des références de propriétés mécaniques de membranes. En effet, la taille des SUV n'est en revanche pas adaptée pour mimer la séparation de phases des membranes biologiques et par conséquent il sera impossible d'évaluer directement sur ces objets le contraste mécanique généré par cette hétérogénéité.

Suite à ces observations, nous avons conclu que le choix du système (SLB, SUV) doit être adapté à la composition en lipides polaires et à la mesure envisagée. En effet, il a été préférable d'utiliser les SLB pour les compositions hétérogènes métastables qui ont tendance à former des agrégats ou fusionner, comme les mélanges contenant du cholestérol. Nous avons donc choisi les SLBs (Murthy et al., 2016b, 2015); et pour déterminer l'effet du cholestérol sur les membranes de milk SM (voir chapitre 6 de la thèse). Les vésicules (SUV) seront employées pour étudier des cas de compositions plus simples (Delorme and Fery, 2006; Liang et al., 2004b) pour préciser le rôle de chaque composant d'une manière indépendante et pour étudier en particulier l'effet de l'état de phase ou de la composition sur les propriétés mécaniques des membranes en comparant les vésicules de DOPC, DPPC ou de milk SM (voir chapitre 7 de la thèse).

5.4. Conditions expérimentales pour l'immobilisation des vésicules sur un support pour l'indentation par AFM

La caractérisation des propriétés mécaniques des vésicules par AFM nécessite de les immobiliser sur une surface (ou « substrat ») afin de pouvoir les indenter. L'immobilisation des vésicules dépend de la composition lipidique, de la taille, de la charge des vésicules, de la température, et de la nature de la surface (Serro et al., 2012; Takechi-Haraya et al., 2016). Nous avons donc testé plusieurs surfaces en fixant préalablement la composition (vésicules de milk SM) et l'environnement (tampon PIPES-NaCl à 10 mM $CaCl_2$; pH 6.7 ; 20°C). Notre choix cible une immobilisation maximale des vésicules tout en minimisant leur déformation lors de l'adsorption. Nous avons testé 5 substrats différents :

Verre nettoyé à l'éthanol absolu puis à l'eau déionisée (fragment de lame porte-objet en verre sodocalcique, RS France, Wissous)

Verre nettoyé à l'éthanol absolu, à l'eau déionisée puis par traitement UV/ozone pendant 10 min

Or (verre revêtu par une couche mince d'or, AU 0500 ALSI, Platypus Technologies, Madison, WI, USA) nettoyé à l'éthanol, à l'eau distillée puis par traitement UV/ozone pendant 10 min

Or (verre revêtu par une couche mince d'or) greffé avec des chaines de carboxyles qu'on obtient en immergeant les substrats d'or dans une solution composée de 2 mM de MUA (acide 11-mercaptoundécanoïque) dissous dans l'éthanol absolu. L'incubation dure 48h à 5°C ; puis les substrats sont rincés avec de l'éthanol absolu, puis à l'eau déionisée.

Silice nettoyée à l'éthanol absolu puis à l'eau déionisée, puis par traitement UV/ozone pendant 10 min

Le mica, qui est un support très courant pour l'immobilisation d'objets en microscopie AFM, a été rapidement écarté. En effet, les vésicules se déformaient significativement à l'adsorption, probablement en raison la forte densité de charge du mica et/ou du pontage ionique entre le mica hydrophile, appauvri en potassium, et les têtes de PC rendues électropositives par le calcium. Pourtant, Laney et al., (1997) ou Liang et al., (2004a) ont pu utiliser du mica pour immobiliser des vésicules, mais leurs conditions étaient différentes (présence de protéines membranaires ou absence d'ions dans le milieu, respectivement). Par ailleurs, la planéité parfaite du mica n'était pas requise pour l'immobilisation d'objets très saillants comme les vésicules, dont on n'indenterait que le sommet.

L'immobilisation des vésicules a été caractérisée à l'aide de la microscopie confocale et de l'AFM.

Dans un premier temps, nous avons observé l'adsorption et la présence des vésicules sur les différents surfaces en utilisant la microscopie confocale. Nous avons préparé des cellules avec un petit montage qui permet de visualiser la surface des substrats (Figure 56). Ces cellules sont composées d'une lame de diagnostic à cadre hydrophobe, le substrat (silice, verre, or…) collé au centre d'un puits et sur lequel est déposée la suspension de vésicules, et des espaceurs (quelques mm d'épaisseur) disposés de chaque côté du puits. La suspension de vésicules, marquée avec du rouge de Nile, a été déposé directement sur la surface étudiée. La cellule a été ensuite couverte par une lamelle couvre-objet (épaisseur ~150 µm, RS France) afin de piéger la suspension entre les deux surfaces par capillarité. La hauteur des cellules, qui dépend des espaceurs, devait établir une distance entre l'oculaire et la surface du substrat de 300 µm maximum (maximum de la profondeur de champ de l'objectif). La cellule a ensuite été disposée à l'envers sur la platine du microscope inversé, afin que la surface des substrats soit exposée au faisceau, à travers la fine lame de verre. Si elle avait été disposée à l'endroit, l'épaisseur du fond de la cellule et l'opacité de certains substrats n'auraient pas permis d'accéder à la surface d'intérêt. Pour visualiser les vésicules, le faisceau était d'abord focalisé sur la surface interne de la lame fine, puis on se déplaçait en hauteur dans le volume, où des vésicules mobiles pouvaient être vues, jusqu'à atteindre la surface du

substrat, supposée être dense en vésicules immobiles. Une fois cette surface dépassée, la focalisation étant dans la masse du substrat où plus aucune fluorescence n'était observable, ce qui constituait un autre repère pour se placer exactement au niveau de la surface du substrat.

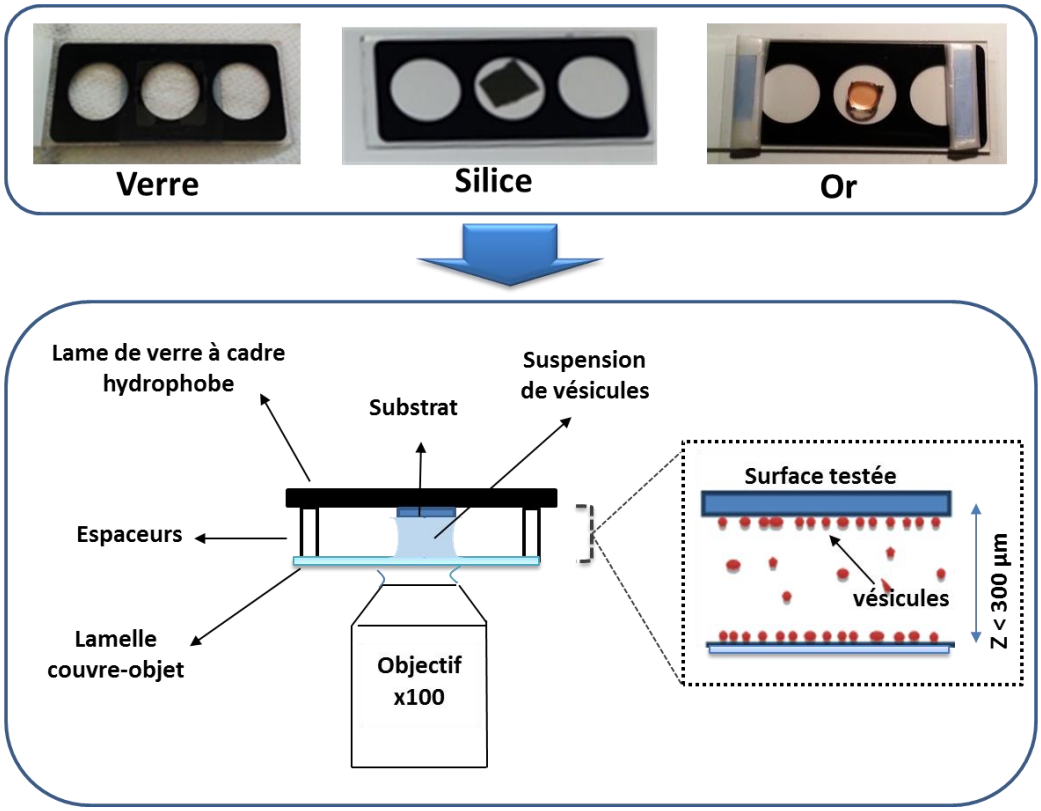


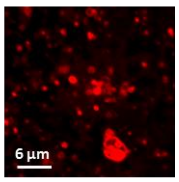
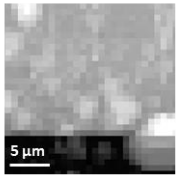
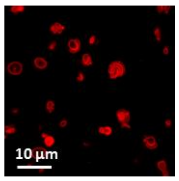
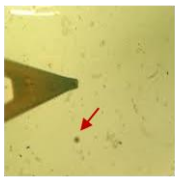
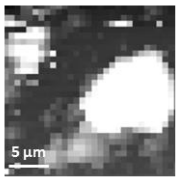
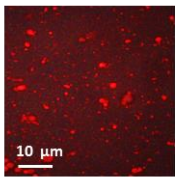
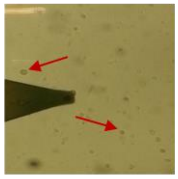
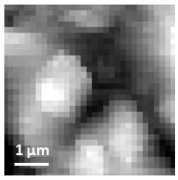
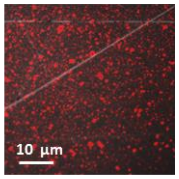
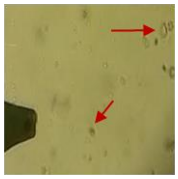
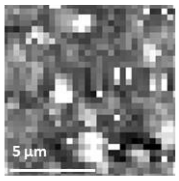
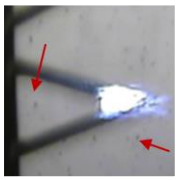
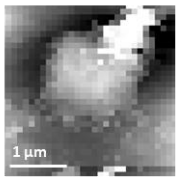
Figure 56: Schéma représentatif du montage de la cellule utilisée en microscopie confocale, avec les différentes surfaces verre, silice et or.

Dans un deuxième temps, nous avons examiné la stabilité des vésicules adsorbées par AFM. Les images en force volume ont été acquises sur les mêmes échantillons que ceux utilisés en microscopie confocale, après ouverture de la cellule. Nous avons utilisé une sonde MSNL 0.03 $N.m^{-1}$ (Bruker, Santa Barbara, CA, USA), calibrée extemporanément par la méthode du bruit de fond thermique, qui se déplaçait avec une vitesse de 2 $\mu m.s^{-1}$. La force appliquée était de l'ordre de 0.5 nN pour éviter d'endommager les vésicules. Les champs scannés avaient des dimensions variant de 20 × 20 μm^2 à 3 × 3 μm^2. Ainsi, nous avons pu tester la force d'adsorption et l'immobilisation des vésicules lors du passage de la sonde, le mode force-volume permettant d'éviter d'exercer une contrainte latérale sur les objets. Cette expérience a permis également d'estimer la déformation que les vésicules ont subie suite à l'adsorption (Dimitrievski and Kasemo, 2008; Liang et al., 2004b). En utilisant la hauteur H de la vésicule et son diamètre W à la base, qu'on a pu extraire à partir des images, on peut calculer l'angle de mouillage à l'aide de l'équation (Helstad et al., 2007) :

—

Les résultats de la caractérisation par microscopie confocale et AFM sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3 : Caractérisation de l'adsorption et de la stabilité des vésicules sur cinq différents substrats

Surface	CLSM	AFM		Caractéristiques
Verre nu				✓ Bonne densité ✓ Peu déformé (angle de contact ~ 80°) X Instabilité X Faible adsorption
Verre nettoyé aux UV				✓ Bonne densité ✓ Moyennement déformé (angle de contact ~ 66°) X Instabilité X Faible adsorption
Or greffé (COOH)				✓ Bonne densité X Moyennement déformé (angle de contact ~ 66°) ✓ Stable ✓ Bonne adsorption
Or nettoyé aux UV				✓ Bonne densité X Moyennement déformé (angle de contact ~ 63°) ✓ Stable ✓ Bonne adsorption
Silice nettoyée aux UV	Non réalisé			✓ Bonne densité X Déformé (angle de contact ~ 50°) ✓ Très Stable ✓ Très bonne adsorption

En se basant sur ces résultats, nous avons pu comparer les surfaces en termes de densité, de déformation, et de stabilité de l'immobilisation au passage de la pointe:

La densité: une bonne présence des vésicules a été observée sur toutes les surfaces en utilisant deux microscopes différents (sauf pour la silice).

La déformation : Le calcul de l'angle nous a permis de déterminer l'effet de l'adsorption sur la forme des vésicules en fonction de la surface. Avec un angle =80°, on constate que le verre nu ne déformait pratiquement pas les vésicules (compte-tenu de l'angle de la pointe AFM, qui est de 15 à 25° selon les côtés, et de l'effet de la convolution). Sur les autres surfaces, l'angle de mouillage est généralement situé entre 50° et 66°, ce qui correspond à une déformation des vésicules sous la forme d'une calotte sphérique (Colas et al., 2007; Liang et al., 2004b).

La stabilité/l'immobilisation: Malgré la réalisation de quelques images en force-volume par AFM, il a été expérimentalement difficile d'acquérir des images des vésicules adsorbées sur du verre. Sur cette surface, les vésicules qui sont peu déformées et donc probablement faiblement adsorbées, avaient toujours tendance à se déplacer avant que l'image soit complète. Au contraire, sur les autres surfaces, il était possible de réaliser plusieurs images sur le même champ sans faire bouger les vésicules. A partir de ces observations, nous avons déduit que la surface du verre (nu ou nettoyée aux UV) ne permet pas une immobilisation optimale des vésicules. En comparant ensuite l'or et la silice, nous avons constaté que les vésicules étaient plus stables sur la silice, en cohérence avec leur déformation légèrement plus élevée à l'adsorption. L'immobilisation sur la silice a également réussi pour d'autres types de vésicules comme des SUV de dipalmitoylphosphatidylcholine (Delorme and Fery, 2006).

En conclusion, nous avons opté pour des surfaces de silice lors de nos travaux sur l'étude des propriétés mécaniques des SUV par indentation en microscopie AFM.

5.5. Conclusions

La réalisation des travaux présentés dans le chapitre 5 de la thèse a été une phase préliminaire importante en vue de la caractérisation mécanique des membranes lipidiques. Nous avons vu dans ce chapitre que le choix des systèmes modèle de la MFGM dépend de plusieurs paramètres : la composition chimique et le milieu d'hydratation, qui affectent la stabilité de l'échantillon ; l'amplitude spatiale et la résolution du système de caractérisation. Les résultats présentés nous ont permis d'identifier les bonnes conditions expérimentales telles que la phase aqueuse, le modèle de bicouche (2D vs 3D) convenable à chaque composition lipidique et la surface permettant l'immobilisation des vésicules pour les travaux en AFM.

Nos choix à retenir en fonction des objectifs étaient :

Phase aqueuse: un tampon PIPES 10 mM à pH 6.7 (pH du lait) contenant 50 mM NaCl et 10 mM de $CaCl_2$. Cette teneur en calcium a été nécessaire pour avoir une bonne stabilité et dispersion des vésicules. Elle sera parfois modifiée dans le cas où on utilisera des lipides polaires chargés négativement ou pour optimiser la formation des bicouches planes (Murthy et al., 2016 ; Guyomarch et al., 2017) (voir le chapitre 6).

Composition chimique: les mélanges milk SM/DOPC ou milk SM/ DOPC/cholestérol utilisées ici comme modèle de la composition hétérogène de la MFGM se sont avérés délicats à employer. Le système binaire milk SM/DOPC (30/70 %mol) tel que dans la membrane des globules gras a des propriétés thermiques et une Tm très différente du mélange de lipides polaires de la MFGM. De plus, ces systèmes modèles ne nous ont pas permis d'avoir des vésicules stables et biphasiques. En conséquence, nous avons décidé d'utiliser des bicouches modèles formées à partir d'un extrait de lipides polaires issus de la membrane des globules gras du lait, précédemment utilisé par Murthy et al.,(2015). Des systèmes de compositions simplifiées seront utilisées pour étudier séparément l'effet des différentes phases fluides (DOPC), gel (DPPC, milk SM) ou liquide ordonné (mélange binaire milk SM/cholestérol 50/50 %mol) sur l'élasticité des membranes.

Membranes modèles et immobilisation pour indentation AFM: le choix du système modèle est finalement opéré en fonction de la composition lipidique des échantillons. Les mélanges complexes générant une séparation de phases seront étudiés en bicouche lipidique supportée (SLB) sur une surface de mica, afin de pouvoir examiner de grandes surfaces. Les compositions simples seront étudiées sous forme de vésicules unilamellaires de petites tailles (SUV) immobilisées sur une surface de silice, afin d'examiner les propriétés élastiques de membranes en fonction de l'état de phase et de la composition, tout en tenant compte de la courbure de la membrane dans un système sphérique comme le globule gras du lait.

Chapitre 6: Quelle est l'hétérogénéité d'élasticité générée par la coexistence et le type de phases dans un modèle de la membrane du globule gras du lait ?

6.1. Introduction

Comme il a été décrit dans la synthèse bibliographique, le lait est une émulsion du type huile dans l'eau relativement instable qui peut, sous certaines conditions, subir des mécanismes de déstabilisation tels que la coalescence ou la floculation. La présence d'une membrane biologique (MFGM) autour des globules gras du lait joue un rôle très important dans la stabilité des émulsions (Mulder and Walstra, 1974). En industrie laitière, la membrane du globule gras peut être aisément modifiée suite à l'application des différents traitements mécaniques, comme le pompage, l'écrémage, l'homogénéisation ou le barattage, qui sont souvent accompagnés par des variations thermiques. Ainsi, l'altération de cette membrane peut affecter la stabilité des globules gras et par conséquent ses propriétés biologiques ou fonctionnelles, et *in fine* la qualité des produits laitiers (Evers, 2004; Stone and Rowlands, 1952). C'est dans ce contexte que se place cette partie du travail de thèse dont l'objectif principal était d'**améliorer nos connaissances sur les propriétés mécaniques de la MFGM et plus particulièrement celles générées par l'hétérogénéité de structure et de phase des lipides polaires**. Après avoir observé dans le chapitre 4 que la membrane des globules peut contenir des lipides polaires dans trois états de phase différents (fluide, gel, liquide ordonné), nous avons émis l'hypothèse qu'une coexistence de phases (par exemple gel et fluide, ou liquide-ordonnée et fluide) pouvait induire une hétérogénéité mécanique latérale susceptible d'évoluer en fonction de la température (T < Tm ou T > Tm des lipides polaires).

Notre stratégie a consisté à utiliser une méthode non invasive d'indentation par spectroscopie de force AFM. Nous avons préparé des systèmes modèles permettant de mimer la variabilité des phases de lipides polaires présentes dans la MFGM, que nous avons observés à deux températures respectivement inférieure et supérieure à la Tm de la milk SM (Tm = 34.3°C) ou de l'extrait de lipides polaires de la MFGM (Tm=36.4°C), c'est-à-dire à T= 20°C < Tm ou à T=50°C > Tm. En se basant sur les travaux préliminaires présentés dans le chapitre 5, nous avons conclu que l'utilisation de bicouches organisées en 3D, c'est-à-dire des LUV, ne sera pas convenable à cette étude car ce système ne nous a pas permis de garantir la présence d'une coexistence de phases malgré une composition hétérogène (milk SM / DOPC). De plus, ces vésicules fabriquées par vortex ont des formes peu maitrisées et instables en présence du cholestérol, ce qui empêche la bonne application de modèles mécaniques pour ces membranes en phase liquide ordonné.

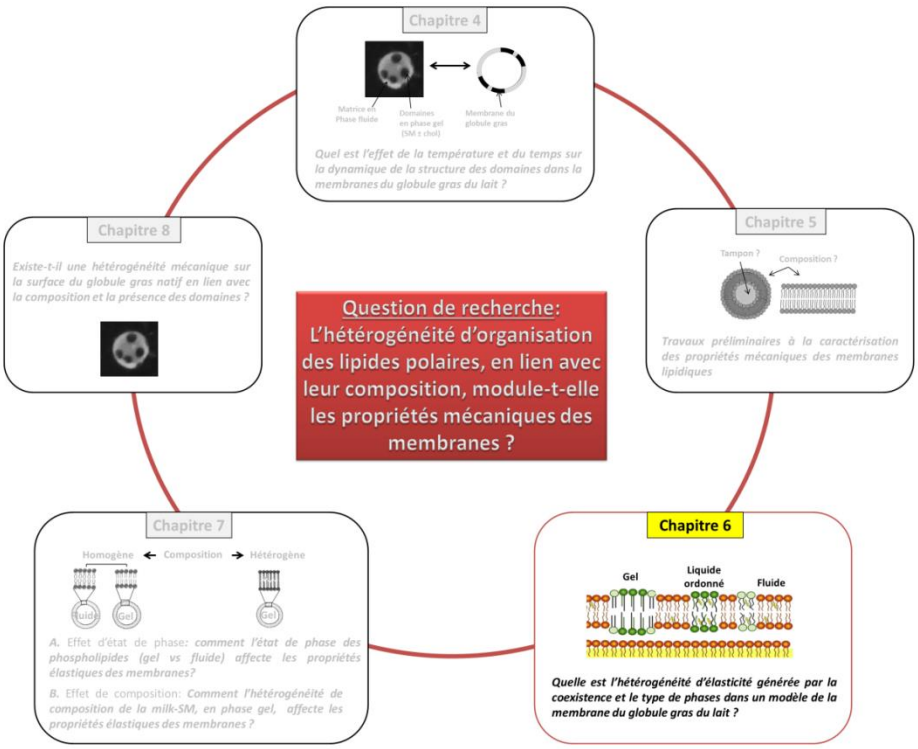
L'utilisation de SUV, plus stables, a également été écartée car ces objets sont trop petits pour visualiser une séparation de phases. Pour ces raisons, nous avons choisi de travailler sur les bicouches de lipides supportées (SLB) qui sont des systèmes bidimensionnels très utilisés en raison de leur stabilité et de leur relative facilité de fabrication (Guyomarc'h et al., 2014; Murthy et al., 2016a; Sullan et al., 2009). Nous avons utilisé un extrait lipidique de MFGM composé de 8.7% milk SM, 31.6% PC, 23.5% PE, 3.4% PI and 2.8% PS (Murthy et al., 2016a), ainsi que de la milk SM pure et un système binaire milk SM / cholestérol (50/50 %mol) en phase liquide ordonné.

Ces travaux nous ont permis :

(i) de mesurer le module de Young des domaines riches en milk SM en phase gel et celui de la phase continue fluide à 20°C et ainsi de déterminer l'hétérogénéité d'élasticité générée par la coexistence de phase dans le mélange complexe de lipides polaires de la MFGM,

(ii) d'observer la fusion des domaines riches en milk SM lors de l'élévation de température à 50°C (T > Tm milk SM), et de mesurer le module de Young du mélange de lipides polaires de la MFGM en phase fluide.

(iii) de déterminer le module de Young de membranes de milk SM en phase gel à 20°C, en phase fluide à 50°C et en phase liquide ordonné en présence du cholestérol quelle que soit la température.



6.2. Article 2: Élasticité des membranes de milk SM dans une phase liquide ordonné, gel ou fluide: investigation de l'effet de la température en absence ou présence du cholestérol

Elasticity of supported lipid membranes containing milk sphingomyelin in the gel, fluid or liquid ordered phase, determined using AFM force spectroscopy

Oumaima ET-THAKAFY‡, Fanny GUYOMARC'H‡, Christelle LOPEZ‡*

‡ STLO, INRA, Agrocampus Ouest, 35000, Rennes, France

*Corresponding author: Christelle LOPEZ

Article in preparation to be submitted to *Biochimica Biophysica Acta: Biomembranes* journal.

Abstract

The biological membrane surrounding milk fat globules exhibits lateral phase separation of lipids, interpreted as gel or liquid-ordered phase sphingomyelin-rich (milk SM) domains dispersed in a fluid continuous lipid phase. The role of the phase state of the lipids on the mechanical properties of this membrane remains poorly known. The objective of this study was to investigate whether changes in the phase state of milk SM rich domains induced by temperature (T < Tm or T > Tm) affected the Young modulus of the lipid membrane. Special attention was given to the role of cholesterol, which induces liquid-ordered lateral packing of the milk SM domains. Supported lipid bilayers composed of a milk fat globule membrane polar lipid extract, milk SM or milk SM/cholesterol (50:50 mol) were investigated at 20°C and 50°C using atomic force microscopy (AFM) imaging and force spectroscopy. At 20°C, SM-rich domains in the gel phase and the surrounding fluid phase of the MFGM polar lipid extract exhibited Young modulus values of 15-20 MPa and 4-6 MPa, respectively. Upon heating at 50°C, the milk SM-rich domains in MFGM bilayers, as well as pure milk SM bilayers, melted leading to the formation of a homogeneous membrane with similar Young modulus values to that of a fluid phase (0-5 MPa). Upon addition of cholesterol to reach 50:50 % mol. to the milk sphingomyelin (milk SM), membranes of milk SM in the liquid-ordered phase exhibited Young modulus values of a few MPa, i.e. similar to those of a fluid phase, at either 20 or 50°C. This indicated that the presence of cholesterol fluidized milk SM membranes and inhibited phase transition upon heating. These results open perspectives for the control of the stability of native or biomimetic milk fat globules towards heat.

Key words: membrane, Young modulus, lipid phase, sphingomyelin, atomic force microscopy

1. Introduction

Biological membranes are complex systems composed of a wide spectrum of lipid molecules (e.g. glycerophospholipids, sphingolipids, cholesterol) and proteins. Depending on their chemical structure, polar lipids can be organized in different phase states as a function of temperature. Moreover, lipid-lipid driven interactions occurring in the plane of the membrane can lead to phase separation and the formation of domains [1–4]. The main lipids involved in the formation of these domains exhibit higher phase transition temperature Tm than ambient temperatures, e.g. the saturated dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC; Tm = 41°C, [5] and natural sphingomyelins (Tm close to physiological temperature; [6]. Cholesterol is also known to be involved in the formation of liquid-ordered (Lo) phase domains with the high Tm lipids [7].

The biological membrane surrounding fat globules in milk, called the milk fat globule membrane (MFGM), is of special interest since it represents 160 m² per liter of milk and is involved in unique functional and biological properties, especially towards the newborn [8]. The MFGM is the interface between the triacylglycerol core of the milk fat globules and the aqueous environment of milk. It is therefore involved in many mechanisms occurring at the interface, e.g. presentation of signaling proteins or adsorption of enzymes, bacteria, viruses, that are important for the digestion of milk lipids and protection of the gastrointestinal tract. This membrane is also essential to ensure the physical stability of milk fat globules. The structure of the MFGM results from the multi-step secretion of fat globules from the epithelial cells of the mammary cells and corresponds to a trilayer of polar lipids and proteins, i.e, an inner monolayer, and an outer bilayer originating from the apical plasma membrane [9,10]. Due to its cellular origin, the MFGM contains mainly glycerophospholipids (PE, PC, PI, PS), sphingolipids, proteins, and cholesterol [11,12]. The milk-sphingomyelin (milk SM) is the main sphingolipid found in the MFGM. It represents 20 to 35% wt of the total polar lipids and exhibits specific physical properties with a Tm = 34.3°C [13]. Meanwhile, the cholesterol represents 0.3 to 0.6 % wt fat in milk, with a chol:phospholipid mass ratio of ~1:3 [14,15], and is mainly located in the MFGM [16]. In the last decade, lipid domains of micron size have been observed using confocal microscopy, *in situ* in the MFGM surrounding fat globules in milk. In analogy with cellular “rafts” [17], these microdomains were interpreted as the lateral segregation of high Tm polar lipids, notably milk SM, dispersed in a continuous fluid phase matrix of unsaturated PE, PS, PI, and PC [18–20]. Individual milk SM-rich domains are expected to be in the gel or in the liquid-ordered phase in the absence or presence of cholesterol, respectively [14]. Therefore, the gel, liquid-ordered and fluid phases are expected to coexist in the MFGM, making it a most complex colloidal system in native milk. Studies showed

that the MFGM is indeed a dynamic system in which the organization of polar lipids [21–23] and the lipid domains are highly sensitive to temperature variations and time [14,24]. Increasing knowledge about the structure of the MFGM and its physical properties is therefore of primary interest to better control storage of human milk or to design bio-inspired lipid droplets e.g. in infant milk formulas. Among other physical properties, the resistance of MFGM to deformation (elasticity) is a key parameter to evaluate the stability of the milk fat globules towards mechanical stress, such as during dairy processes. In particular, the coupled influence of shear and heat is encountered in all stabilization operations, e.g. pasteurization or homogenization.

As an evaluation of the elasticity, the calculation of the Young modulus out of force-indentation atomic force microscopy (AFM) spectroscopy experiments has proven an interesting approach to deal with as soft samples as biomembranes. Less invasive than the measurement of the yield force (or breakthrough force) of membranes, which successfully discriminate the gel, liquid-ordered and fluid phases of model supported lipid bilayers [25,26], calculation of the Young modulus also has the advantage to allow comparison with other techniques or with non-supported membrane objects [27]. In recent years, AFM determination of the Young modulus has for instance yielded values in the tens to hundreds of kPa range for the heterogeneous structure of fibroblasts [28] or other eukaryote cell membranes [29], for the decreased stiffness of cancer cells [30,31] or for the elasticity of bacterial cell wall [32]. Meanwhile, model supported lipid bilayers yield Young modulus values in the tens to hundreds MPa range [26,27,33,34]. In milk, only Balasuriya et al. [35] have reported that the Young modulus of the MFGM varied with the various fractionation or homogenization treatment applied. Unfortunately, the complexity of the milk fat globule surface did not allow direct recognition of the phases within the MFGM.

Therefore, the objective of the present work is to evaluate the Young modulus values of the different lipid phases found in bilayers made of MFGM polar lipid extract, as a protein-free model for the native MFGM [36], using AFM imaging and force spectroscopy. The behavior of the gel and liquid-ordered phases will be scrutinized with respect to temperature variation from 20 to 50°C, in order to unravel the possible role of cholesterol in stabilizing structures against environmental change. These temperatures were chosen as to stand respectively below and above the melting temperatures of the MFGM polar lipid extract (Tm=36.4°C;[13]) and of the milk SM (Tm=34.3°C; [13]). Hence, saturated polar lipids of the MFGM, and namely the milk SM, were in the gel phase at 20°C and in the liquid disordered phase (Ld) at 50°C [13]. Meanwhile, a milk SM/chol ratio of 50:50 % mol. has been shown to turn milk SM bilayers into liquid ordered phase [36], a phase state that does not show any Tm [37,38].

2. EXPERIMENTAL METHODS

2.1. Materials

Sphingomyelin from bovine milk (milk SM; purity > 99 wt%) and cholesterol (chol; from ovine wool, purity > 98 wt%) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). The MFGM polar lipid extract used in this study was the same as in Murthy et al. [13,36]. It contained polar lipids with the following relative weight percentages: 38.7% milk SM, 31.6% PC, 23.5% PE, 3.4% PI and 2.8% PS, as determined by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection [39]. Most of the long-chained saturated fatty acids were due to the high amount of milk SM, which contains ~20% wt. of C16:0, C22:0 and C24:0; as well as ~30% wt. of C23:0 and minor amounts of other chains, especially the unsaturated C24:1 **Figure 1**. Meanwhile, a majority of the long chain base of milk SM is the C18:1 sphingosine.

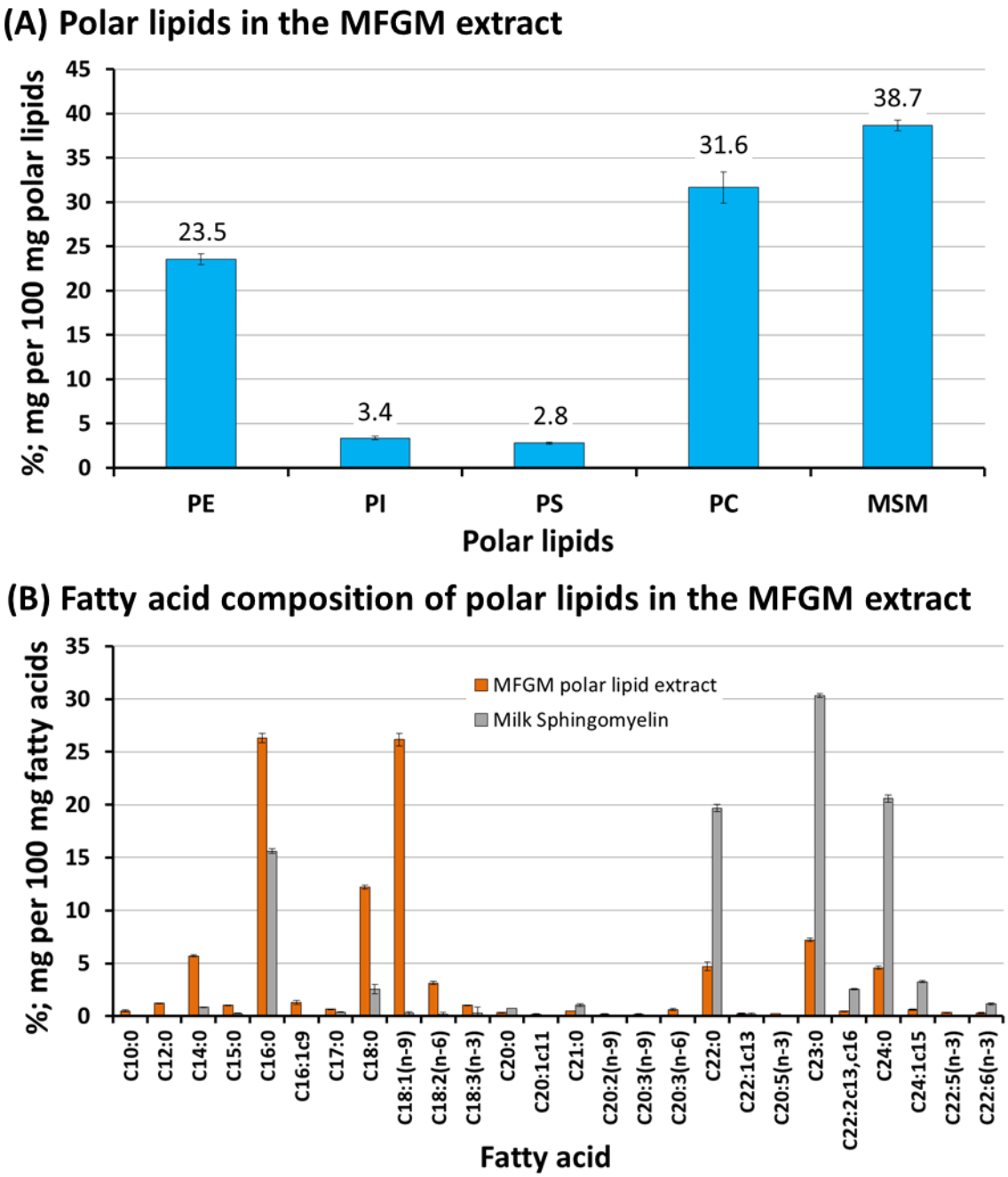


Figure 1. (A) Composition, in % weight of the total polar lipids, of the milk fat globule membrane (MFGM) extract in polar lipids PE (phosphatidylethanolamine), PI (phosphatidylinositol), PS (phosphatidylserine), PC (phosphatidylcholine) and MSM (milk sphingomyelin); (B) Composition, in % weight, of the fatty acids present in the polar lipids of the MFGM extract (in orange) and in the milk sphingomyelin as a reference (in grey).

PIPES buffer (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) was prepared as follows: PIPES 10 mM (purity ≥ 99% wt; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA), NaCl 50 mM (purity ≥ 99% wt; Sigma-Aldrich), and $CaCl_2$ 0-5 mM as indicated in the text (purity ≥ 99% wt; Sigma-Aldrich) were dissolved in Milli-Q water and adjusted to pH 6.7 using NaOH 5 M.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of small unilamellar vesicles

First, each lipid powder was carefully weighted into glass vials and dissolved using chloroform/methanol (4:1 v/v) to make mother solutions of the MFGM polar lipid extract, milk SM or cholesterol (chol). Dried lipid films were then produced by placing or mixing the appropriate amounts of the mother solutions of into glass vials, followed by evaporation of the solvent at 40°C under a gentle stream of dry nitrogen. The dried lipid films were hydrated with PIPES buffer at 60°C to reach a final concentration of 0.1 % wt for the MFGM polar lipids, or 0.01 % wt. for the milk SM and milk SM/chol 50:50 % mol, then thoroughly vortexed. PIPES-NaCl buffer without calcium was used for the MFGM polar lipids, and PIPES-NaCl with 5 mM $CaCl_2$ was used for milk SM and milk SM/chol preparations [13,40]. Then, small unilamellar vesicles (SUV) were produced by sonication at 60°C using a Q700 equipment (Q-sonica, Newtown, CT, USA) and a micro tip operating at 50% amplitude (~400 W) for 30-60 min. Noteworthy, the absence of calcium was required for the MFGM vesicles in order to ensure their stability. Those vesicles bear electronegative charge at pH 6.7 due to the presence of PI and PS, which is neutralized in presence of calcium, thus inducing aggregation [41,42]. Conversely, milk SM and milk SM/chol vesicles are electrically neutral in water due to the zwitterionic nature of the choline. The presence of calcium (and sodium, to a much lesser extent) shields the electronegative phosphate group, which results in increasing electropositivity with ca

lcium addition, thus stabilizing the vesicle via electrostatic repulsion [42,43]. Furthermore, the presence of cholesterol favored fusion between vesicles. For that reason, increased dilution and sonication time were used to produce stable milk SM/chol vesicle suspensions.

2.2.2. Dynamic light scattering

The hydrodynamic diameter Dh of the SUVs was measured at 20°C and in PIPES buffer using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) operating at a scattering angle of 173° and a wavelength of 633 nm. The mean Dh (± 5 nm) was calculated from the intensity distribution using the Stokes-Einstein relation and assuming that SUV had a spherical shape. The viscosity of the buffer was = 1.003 mPa.s at 20°C. The refractive index of the buffer was taken as 1.33. The mean diameter of SUV of MFGM polar lipid, measured in PIPES-NaCl without calcium, was 67 ± 22 nm. Meanwhile, the mean diameter of SUV of milk SM and milk SM/chol, measured in PIPES-NaCl with 5 mM of calcium, were 119 ± 58 nm and 111 ± 33 nm, respectively.

2.2.3. Atomic force microscopy (AFM) imaging and force spectroscopy

AFM imaging and force spectroscopy experiments were performed on supported lipid bilayers (SLB) in hydrated conditions. To form the planar SLB of MFGM polar lipids, 2.7 mL of PIPES-NaCl with 2 mM $CaCl_2$ buffer were pre-heated at 60°C using a temperature-controlled Bioheater open liquid cell (Asylum Research, Oxford Instruments, Santa Barbara, CA, USA) mounted with freshly cleaved mica. Then, 300 µL of the hot SUV suspension were injected into the liquid cell, to reach 0.01% wt. of lipids. Introduction of calcium ions promoted vesicule fusion onto the mica, with no effect onto the suspension stability [36]. The samples were then incubated at 60°C for 1 h using an IPP programmed incubator (Memmert, Büchenbach, Germany) and saturated humidity chambers to prevent evaporation. The liquid cells were then slowly cooled down to 20°C at a linear cooling rate of 18°C per hour (~ 0.3°C per min). For the saturated milk SM or the milk SM/chol samples, a small drop of the hot SUV suspension (~600 µL at 0.01% wt. lipids) was directly deposited onto a disk of freshly cleaved mica glued on a stainless steel substrate. The sample was then incubated at 60°C for 1 h and cooled down to 20°C at a linear cooling rate of 35°C per hour (~ 0.6°C per min). Finally, the sample was carefully immobilized onto the temperature-controlled magnetic Peltier stage of a Cooler-Heater open liquid cell set at 20°C (Asylum Research, Oxford Instruments, Santa Barbara, CA, USA).

Once equilibrated at 20°C, the SLB composed of the MFGM polar lipid extract, milk SMor milk-SM/cholesterol were carefully and extensively rinsed with the same PIPES buffer as during incubation onto mica. The SLB were then characterized by AFM at 20°C and at 50°C after their heating using the temperature controlled cells, at a rate of 0.5°C.min^{-1}.

Imaging of the SLB s was performed in contact mode using an Asylum Research MFP-3D Bio AFM (Oxford Instrument, Santa Barbara, CA, USA) and MLCT probes (nominal spring constant k ~0.03 N.m^{-1}, Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA, USA). Individual probes were calibrated extemporaneously at 20°C then 50°C using the thermal noise method. The sensitivity was taken on the deflection curves beyond the breakthrough point of the membrane, i.e. when the tip was pressed against mica. The typical scan rate was 1 Hz for 512 × 512 pixels images. Up to 8 images with different scan sizes varying from 20 × 20 µm^2 to 2 × 2 µm^2 were recorded at various locations, on three different bilayers. The height difference between the lipid domains and the continuous phase was measured using cross sections of different images.

Force mapping was performed on the same imaged area and using the same probe as for AFM imaging. Typically, an applied load of up to 200 pN and a piezo speed of 2 µm.s^{-1} were used. Then, the bilayers elasticity E was calculated by fitting the force curves using the classical Hertz model:

Where F: force, R_{tip} : tip radius (20 nm), δ : the indentation distance and ν the Poisson ratio, taken as 0.5 [44].

Analysis of variance was performed using the General Linear Model procedure of Statgraphics Plus version 5 (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ). Differences were regarded significant for $p < 0.05$.

3. RESULTS & DISCUSSION

3.1. Topography and elasticity of the MFGM polar lipid extract bilayer investigated as a function of temperature

3.1.1. T=20°C < Tm of the MFGM polar lipid extract

Figure 2 shows the topography of MFGM polar lipid bilayers and the corresponding Young modulus maps (E map) and histograms (E histogram). The topography images showed the coexistence of micrometer-wide domains (lighter zones) and a continuous phase (darker matrix). Cross section analysis of the AFM images showed that the height difference *H* between the domains (8 domains from 6 different images) and the surrounding matrix was $H \sim 0.77 \pm 0.07$ nm (**Figure 2A**). These AFM images are in agreement with previous observations of hydrated supported lipid bilayers of MFGM polar lipids extract [13,13,45]. They are also in accordance with AFM images of binary systems composed of saturated SM in the gel phase and the unsaturated phospholipid dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) as the fluid phase, i.e. milk-SM/DOPC [40,45] or egg-SM/DOPC [46].

The thick domains were interpreted as the lateral segregation of saturated polar lipids in the gel phase at 20°C, i.e. mainly milk SMbut also DPPC. The continuous phase is composed of unsaturated polar lipids that assume a loosen and thinner Ld organization at T > Tm. In the AFM images of SLB composed of MFGM polar lipid extract, subdomains were sometimes observed within the gel phase, exceeding the domains' surface by about 0.3 nm (**Figure 2B**, second image). In MFGM polar lipid extract bilayers, subdomains have been interpreted as two laterally separated gel phases due to distinct forms of interdigitated packing of the milk SM molecules [45].

The E maps recorded at 20°C clearly showed a correlation between the structural heterogeneity of the bilayers (topography by AFM imaging) and their local Young modulus values (E maps) (**Figure 2A and B, center column**). The E histograms prepared from the E maps showed a broad

range of Young modulus values, with bimodal distribution. To further investigate the Young modulus values of the polar lipids in relation to their phase state, E maps and the corresponding histograms have been recorded separately in the continuous fluid (Ld) phase or in the gel phase domains. The Young modulus of the fluid phase, rich in unsaturated polar lipids, exhibited a mean value $E_{fluid} = 6 \pm 1$ MPa with a narrow distribution ranging from 4 to 16 MPa (**Figure 2A**, in orange). In contrast, the mean Young modulus of the SM-rich gel phase domain was $E_{gel} = 10 \pm 4$ MPa with a distribution ranging from 4 to 32 MPa (**Figure 2A**, in green). This allowed us to interpret the bimodal distribution of Young modulus values obtained over the biphasic system (**Figure 2A**). By comparing different experiments (**Figure 2A and B**), it could be calculated that the average difference between the coupled Young modulus values of the gel and the fluid phases in individual images was $E = E_{gel} - E_{fluid} = 4.6 \pm 0.9$ MPa (N=5). In conclusion, bilayers composed of the MFGM polar lipid extract exhibited significantly higher Young modulus values in the gel phase domains than in the fluid phase. These results are in agreement with Picas et al. [33] who reported Young modulus values of 19 and 28 MPa, respectively, for the fluid and gel phase of a DOPC/DPPC bilayer. As the Young modulus E and the breakthrough force can be somewhat compared [27,34], the present results also agree with previous findings showing that the gel phase domains of MFGM polar lipid extract bilayers ruptured at higher force compared to the surrounding continuous fluid phase [47].

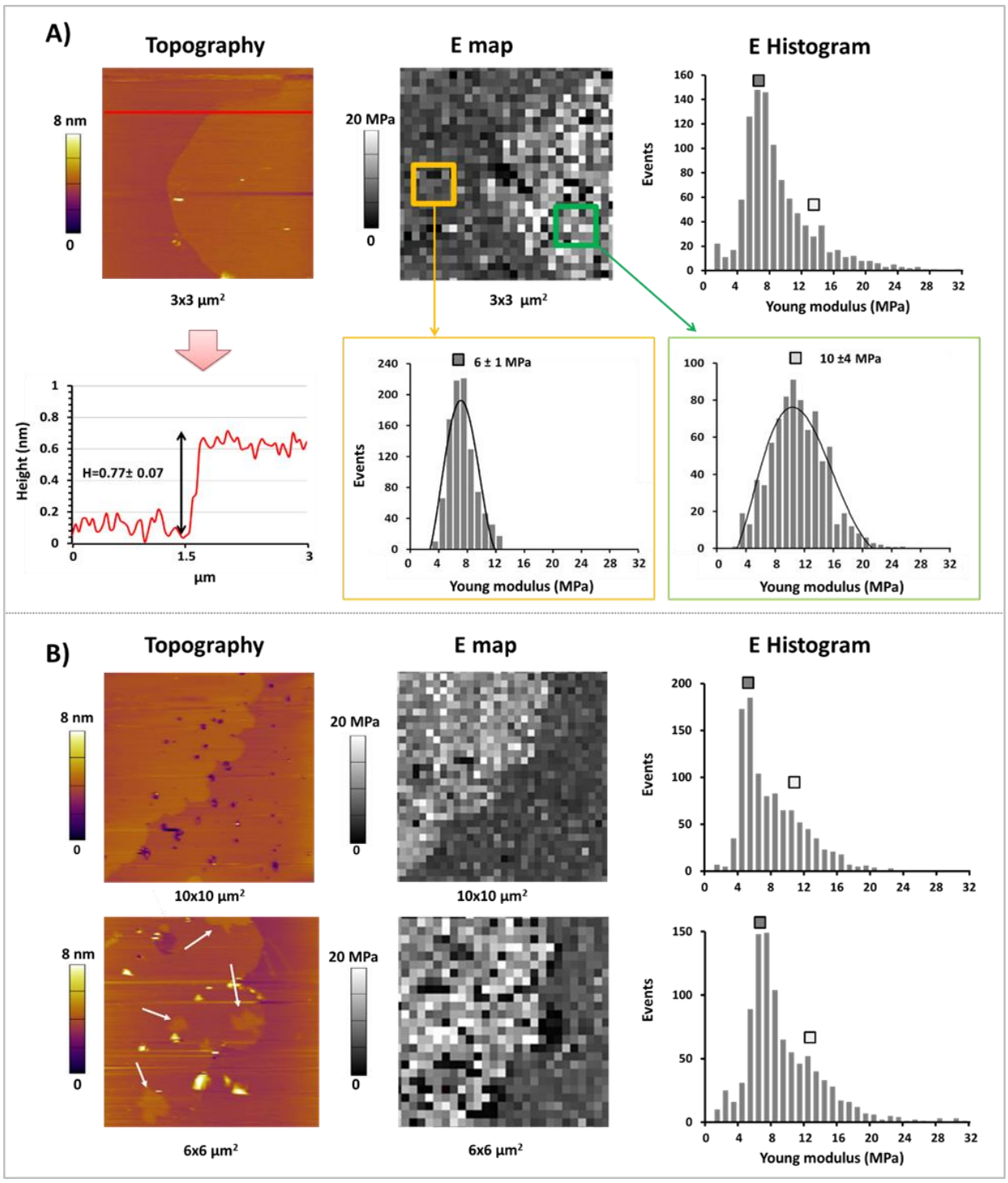


Figure 2. (A) AFM topography images and the corresponding Young modulus (E) map of supported milk fat globule membrane (MFGM) polar lipid extract bilayers. In the orange and green inserts, we show the E histograms obtained after batch analysis of the individual force curves separately recorded upon separated mapping onto the fluid phase or gel phase, respectively. (B) Typical AFM topography images, with different scan sizes, of supported lipid bilayers of mixtures of MFGM polar lipids (left column), the corresponding Young modulus (E) mapping experiments (center column), and the resulting E histograms obtained after batch analysis of the individual force curves (right column). The white arrows indicate subdomains and the colors of the square symbols refer to the maps' color scale, showing the existence of bimodal distributions. All images and force mapping experiments were performed in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7, at 20°C.

3.1.2. T=50°C > Tm of the MFGM polar lipid extract

In this set of experiments, changes in the topography and Young modulus of the MFGM polar lipid extract bilayers due to phase transition of the high-Tm lipids were investigated. **Figure 3A** shows a typical example of AFM topography images and the corresponding Young modulus map (same area) of a MFGM polar lipid bilayer, recorded at 20°C (T < Tm) then at 50°C (T > Tm) after slow heating at 0.5°C.min^{-1}. The thick gel phase milk SM-rich domain, visible in the bilayer at 20°C (**Figure 3A**), completely disappeared after heating at 50°C, leading to a homogeneous and flat membrane, in agreement with the melting of high Tm polar lipids [48–50]. **Figure 3B** shows examples of the force curves recorded on each of the observed phase at 20 or 50°C.

Furthermore, the bimodal and broad distribution of E values showing the contrast between the domain and the continuous phase at 20°C evolved toward lower and homogeneous Young modulus values of $E_{50°C}$ = 4 ± 2 MPa upon heating (**Figure 3A**), which were significantly lower to those of the continuous fluid (Ld) phase at 20°C (**Figure 2A**; $p < 0.05$). These results show that the physical state of the polar lipids, which evolves as a function of temperature, governs the lateral packing, phase separation and local elasticity of membranes. This is coherent with previous studies reporting low and homogeneous breakthrough force values in bilayers of MFGM polar lipid extract at 40°C, compared to 26°C [47]. Changes in the mechanical properties of the membrane with their phase state is a direct consequence of the order parameter of lateral lipid packing [51]. In gel phase, a tightly packed lateral organization results in an increase of the order parameter and to an enhancement of rigidity of the milk SM-rich domains within membranes of the milk polar lipid extract. An increase in temperature results in greater membrane fluidity as van der Waals interactions are disrupted and broken. Using the non-invasive measurement of the Young modulus of bilayers of a naturally complex polar lipid extract, this confirmed previous reports obtained through the perforation approach on simple lipid mixtures. The breakthrough force of dilaureoyl-, dimyristoyl-, and dipalmitoylphosphastidylcholine (DLPC, DMPC, DPPC), but not that of palmitoyloleoylphosphatidylethanolamine (POPE; [52,53], decreased sharply upon heating, as temperature crosses their respective Tm values [48,49]. The presented results were also in line with the sharp decrease of the bending modulus of phosphatiylcholine vesicles as they undertake gel Ld phase transition [54–56]. Furthermore, the decrease in Young modulus (or in breakthrough force - [47]) of the fluid phase with temperature is likely due to the increased molecular agitation and increased molecular distance between lipids upon heating of the bilayer [57]. Another reason could be that the melting of the high-Tm polar lipids modifies the

composition of the fluid phase, thereby increasing the complexity for optimal lateral packing of the molecules.

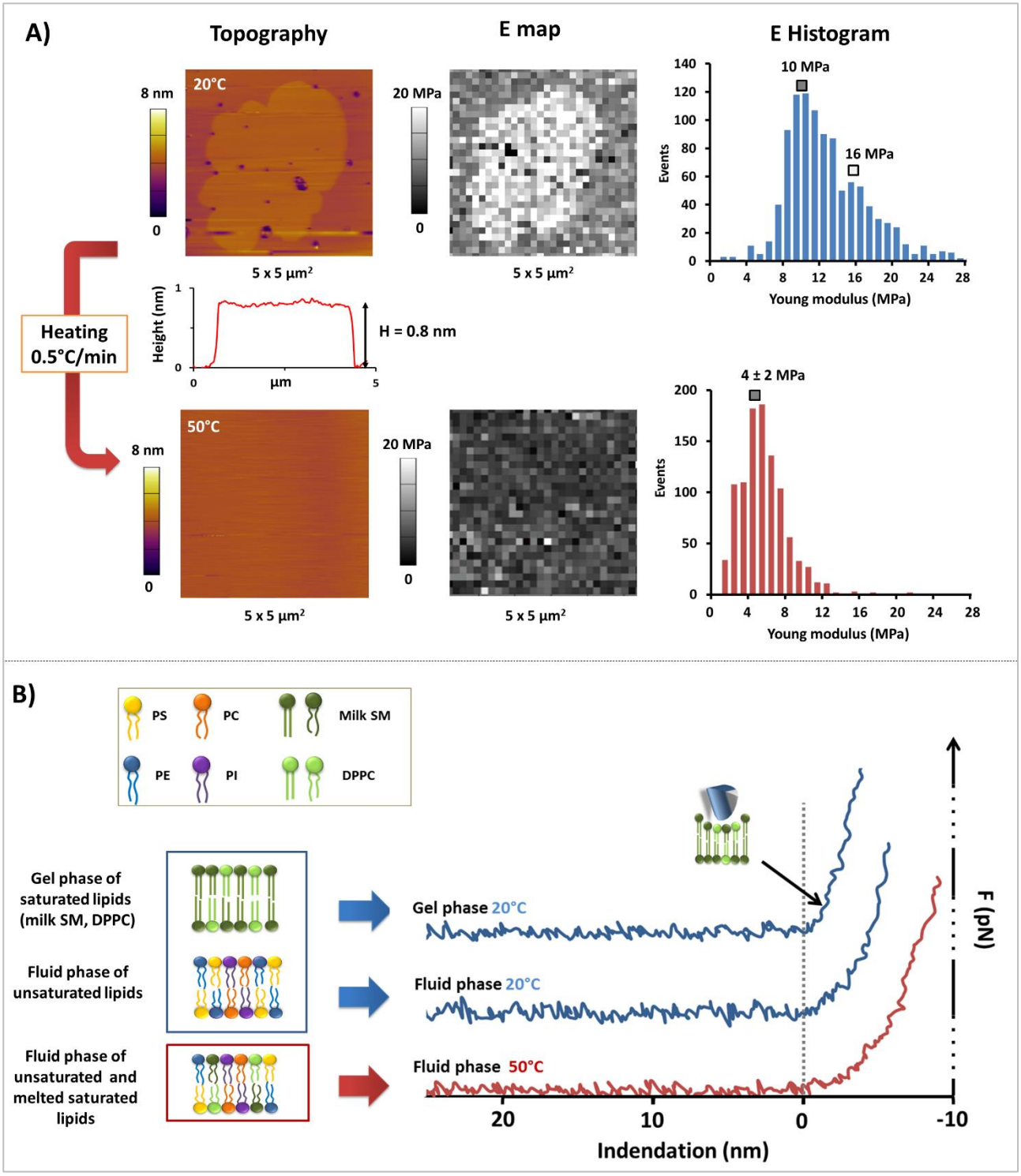


Figure 3. (A) Effect of heating on the lateral organization and the mechanical properties of MFGM polar lipids supported bilayers investigated by atomic force microscopy. AFM images and the corresponding Young modulus mapping and histograms were recorded at 20°C and 50°C in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7. (B) Typical force-distance curve recorded in the gel or fluid phases at 20°C or in the fluid phase at 50°C.

3.2. Role of phase state on the elasticity of milk SMbilayers

In the native MFGM, cholesterol may be involved in the formation of liquid-ordered (Lo) phase domains that have been observed at as elevated temperature as 60°C, e.g. above the Tm of the MFGM or of the milk SM [14]. The Young modulus values of these Lo phase domains, mainly composed of milk SMand cholesterol, need further investigation to provide information useful in a biological context. Previous reports showed that the addition of 25-30 % mol cholesterol in binary 50:50 % mol SM/DOPC bilayers induced dispersion or inversion of the domain phase [46,58–60]. Equally, the addition of cholesterol to the MFGM polar lipid extract bilayers, to reach a milk SM/chol ratio of 50:50 % mol, induced the almost complete dispersion of the Lo milk SMrich domains into the fluid (Ld) phase [13,36]. Therefore, resolution of the Young modulus mapping was expected to be too low to properly image such systems. For these reasons, it was decided to prepare milk SMand milk-SM/cholesterol bilayers, as models of the ordered-phase domains of the MFGM. In this part of the study, we therefore examined the Young modulus values of milk SMbilayers as a function of their phase state, i.e. in the gel phase (T = 20°C; [13,61]) , in the Ld phase (T = 50°C; [13,61]), and in the Lo phase (with 50 mol% of cholesterol in the bilayer, T = 20 and 50°C; [36]).

Topography images at 20 and 50°C (**Figure 4B,D,I,J**) showed that both the milk SMand the milk-SM/chol hydrated bilayers were homogeneously flat, thereby indicating that the composition and phase state of the milk SM/chol bilayers were evenly distributed. In particular, no gel/Lo phase coexistence could be suspected in the milk SM/chol bilayers at 20°C. At that temperature, the Young modulus values of milk SM in the gel phase ranged from 2 to 50 MPa with a mean value of $E_{milkSM\text{-}gel} = 18 \pm 6$ MPa. These values are slightly higher than those of the gel phase domains in MFGM lipids ($p < 0.05$). This may be explained by differences in the polar lipid compositions, where domains in the MFGM polar lipid extract may also contain other saturated molecules than the milk SM, thereby increasing the complexity and decreasing order. Furthermore, the increased molarity in calcium in the buffer may increase molecular order and the membrane rigidity [43,62] . At 50°C, all Young modulus values of milk SM membranes in the fluid Ld phase were inferior to 10 MPa, with a mean of $E_{milk\ SM\text{-}Ld} = 4.3 \pm 3$ MPa (**Figure 4 A and C**). This result showed that the melting of the gel phase state of milk SMinto the Ld phase, induced by heating the samples from 20 to 50°C, significantly decreased the Young modulus values E of the milk SM membranes. This is in agreement with the results obtained with the MFGM polar lipid extract, where the milk SM-rich domains are also expected to be in the gel phase at 20°C.

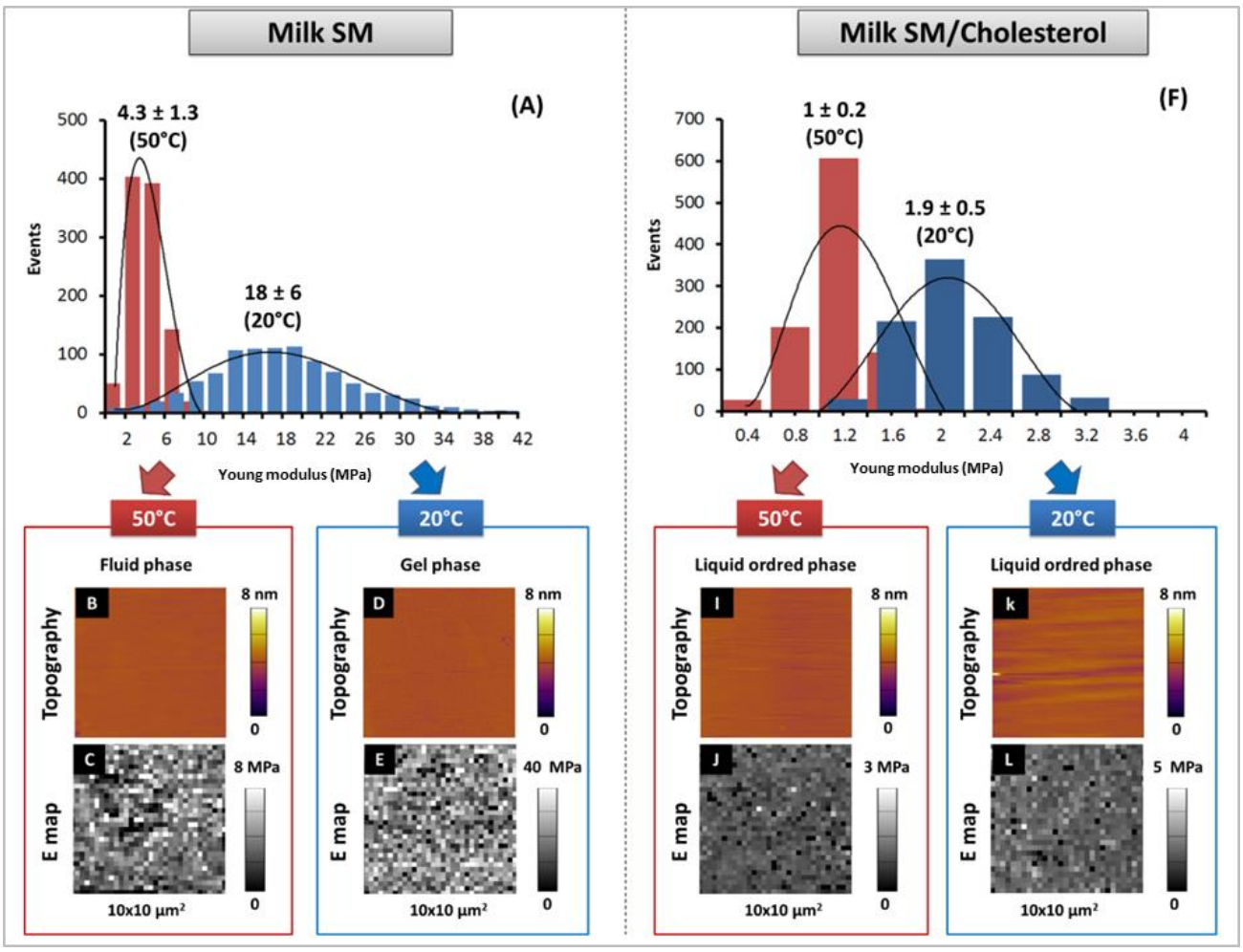


Figure 4. Effect of the phase state of milk SM, as modified by temperature and cholesterol, on the topography and Young modulus values of supported milk SM bilayers. AFM topography images, Young modulus mapping and the corresponding histograms were recorded at 20°C or 50°C in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7.

Figure 5 shows a comparison between the Young modulus values recorded on milk SM and milk SM/chol (50:50% mol) bilayers at 20°C or 50°C. In the presence of cholesterol, the Young modulus values of the milk SM bilayers in the Lo phase were $E_{milk\ SM\text{-}Lo\text{-}20°C}$ = 1.9 ± 0.5 MPa and $E_{milk\ SM\text{-}Lo\text{-}50°C}$ = 1 ± 0.2 MPa at 20°C and 50°C, respectively. Therefore, the Young modulus value of milk SM in the gel phase was higher than that of the same lipid in the Lo phase. This in accordance with the described fluidizing effect of cholesterol onto gel-phase polar lipid packing of sphingomyelins [3,4,7,63–66] or of DPPC [67]. By intercalating between lipid acyl tails, cholesterol prevents ordered packing of lipids, thus increasing their freedom of motion [65]. In the same line, cholesterol has also been shown to decrease the bending rigidity of gel-phase sphingomyelin in vesicle membranes [55,68]. The fluidizing effect of cholesterol was also indirectly observed in domains of MFGM polar lipid extract membranes, through the decrease of the height mismatch *H* and of the breakthrough force values measured onto the domains with

cholesterol addition [13,36].

Irrespective of the temperature, the Young modulus values of the milk SM/chol were however lower than those of the Ld phase of pure milk SM at 50°C (**Figure 4.B, K and L**, $p < 0.05$). This was somewhat unexpected as order of the Lo phase is normally greater than that of the Ld phase [4], thanks to the condensing effect of cholesterol that reduces molecular area of the (fluidized) saturated polar lipids in the domains [69]. Tighter lipid packing is expected to increase interactions between adjacent molecules and hence, mechanical resistance. In melted DPPC bilayers (T > Tm = 41°C), Redondo-Morata et al. [49] measured greater breakthrough force values in the presence (Lo phase) than in absence of cholesterol (Ld phase). Similarly, Liang et al. [70] showed that Egg PC bilayers (T>Tm = -15°C) exhibited higher Young modulus when cholesterol was added (i.e., in Lo phase rather than Ld). From the analysis of liposomes of several compositions with both fluorescence and AFM force spectroscopy, Takechi-Haraya et al. [71] calculated increasing bending rigidities in the order Ld < Lo < gel phase. On the other hand, interfacial elasticity has been shown to be lowest for the Lo phase, when compared to that of liquid-condensed (~gel) or liquid-expansed (~Ld) phases of sphingomyelin monolayers [72].

Finally, it could be noticed that milk SM in the Lo phase at 20°C exhibited lower Young modulus values (2 MPa) than the fluid (Ld) phase of the MFGM at the same temperature (~6 MPa). Chiantia et al. [73] or Sullan et al., [60] however reported that the force needed to puncture Lo SM-rich domains were significantly higher than for a Ld DOPC rich-phase, but this essentially holds true for amounts of cholesterol < 25 % mol. For higher amounts, both Ld and Lo phases of a biphasic saturated SM/unsaturated polar lipids bilayers merge into similar breakthrough force values [36].

Overall, we conclude that milk SM bilayers exhibited dramatically higher elasticity (tens of MPa order or magnitude) when in the gel phase, as compared with the Ld or Lo phases. The latter phases showed close Young modulus values of a few MPa, but the Lo phase seemed unexpectedly less elastic than the Ld phase [71].

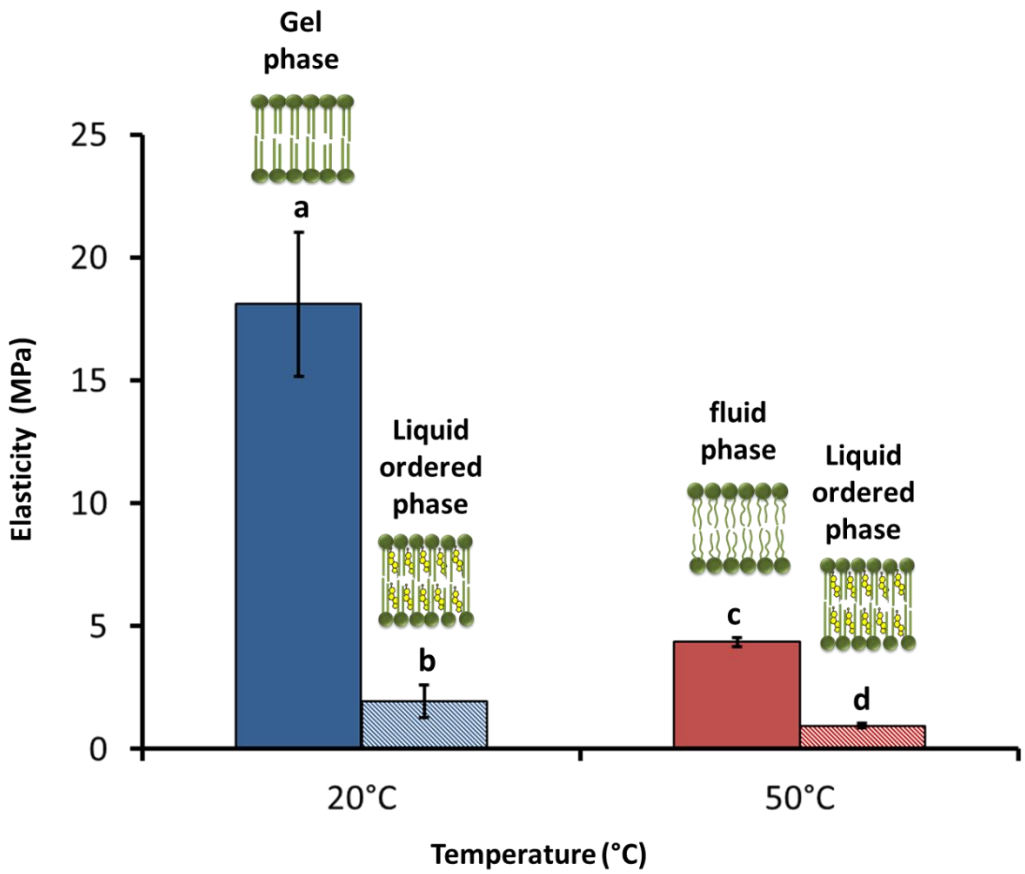


Figure 5. Comparison of the average Young modulus values obtained at 20°C or at 50°C in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7, on indenting milk SM or milk SM/chol (50:50% mol) supported bilayers.

These results show that cholesterol plays an important role in modulating the stiffness or softness of biological membranes, by fluidizing the gel phase state into Lo molecular packing. Moreover, cholesterol in equimolar amount to the milk SM counterpart is capable of maintaining the membrane phase into a stable Lo structure, with almost constant elasticity with respect to the temperature. In cells, and most importantly in SM-rich cellular "rafts", cholesterol is likely to be implicated in the regulation of membrane curvature, which is important for many cellular events such as membrane fusion, budding, etc [71,74–77].

In the MFGM, the cholesterol content is in the order of 1 mol of chol for ~2 mol of polar lipids, i.e. over 1 to 1 molecule with respect to the milk SM only. Meanwhile, the human erythrocyte membrane contains up to 45 % mol of cholesterol [78,79]. Even though the distribution and fluxes of cholesterol in cells are complex [80], this indicates that gel phase is probably inhibited in many biologically relevant situations, even though indirect observations pointed to some gel phase domains in the MFGM [14]. The high amounts of cholesterol in plasmatic membranes, compared to those used in model vesicle or supported membranes, may account for the lower Young modulus

values generally found when directly probing cells or milk fat globules. Research is still necessary to more closely investigate structures of the lipid phases actually existing in biological membranes and their role in the modulation of some of the cells functional properties [79,81]. In the case of the milk fat globule, these research open perspectives for a better understanding of its reactivity towards mechanical or heat stresses, and hence for a better control of its maneuverability during dairy operations. Finally, better knowledge of the MFGM and its physical properties will help the design of biomimetic milk fat globules, as improved substitutes for the protein-emulsified oil droplets currently used in infant formula milks.

4. CONCLUSION

Combination of AFM imaging and the non-invasive mapping of the Young modulus values of MFGM, milk SM and milk SM/chol bilayers has evidenced direct correlation between the lipid phases and their elastic property. Among all phases, the gel phase present in domains at T<Tm exhibited largest Young modulus values of the tens of MPa order of magnitude. Meanwhile, liquid-disordered and liquid-ordered phases exhibited Young moduli of a few MPa. The fact that the Young modulus value of the Lo phase was almost invariant with temperature adds to the multiple actions of cholesterol towards polar lipid bilayers [82]. This is new evidence that the finely tuned and complex sterol/polar lipid composition of biological membranes such as the MFGM is in the core of the membranes' biological functions.

Acknowledgements

The doctoral fellowship of author Et-Thakafy was funded by INRA CEPIA and Région Bretagne (France) under the grant ARED 8806. The Asylum Research MFP 3D-BIO atomic force microscope was funded by the European Union (FEDER), the French Ministry of Education and Research, INRA, Conseil Général 35 and Rennes Métropole.

References

[1] S.L. Veatch, S.L. Keller, Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol, Biophys. J. 85 (2003) 3074–3083. doi:10.1016/S0006-3495(03)74726-2.

[2] T. Baumgart, S.T. Hess, W.W. Webb, Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension, Nature. 425 (2003) 821.

[3] R.F. De Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, Biophys. J. 85 (2003) 2406–2416.

[4] G.W. Feigenson, Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1788 (2009) 47–52. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.014.

[5] M.G. Benesch, R.N. McElhaney, A comparative calorimetric study of the effects of cholesterol and the plant sterols campesterol and brassicasterol on the thermotropic phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes, Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 1838 (2014) 1941–1949.

[6] A. Filippov, B. Munavirov, G. Gröbner, M. Rudakova, Lateral diffusion in equimolar mixtures of natural sphingomyelins with dioleoylphosphatidylcholine, Magn. Reson. Imaging. 30 (2012) 413–421. doi:10.1016/j.mri.2011.12.010.

[7] K. Simons, W.L.C. Vaz, Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes [1], Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33 (2004) 269–295. doi:10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803.

[8] C. Lopez, Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 16 (2011) 391–404. doi:10.1016/j.cocis.2011.05.007.

[9] H.W. Heid, T.W. Keenan, Intracellular origin and secretion of milk fat globules, Eur. J. Cell Biol. 84 (2005) 245–258. doi:10.1016/j.ejcb.2004.12.002.

[10] T.W. Keenan, D.J. Morré, D.E. Olson, W.N. Yunghans, S. Patton, Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland, J. Cell Biol. 44 (1970) 80–93.

[11] B.Y. Fong, C.S. Norris, A.K. MacGibbon, Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane, Int. Dairy J. 17 (2007) 275–288.

[12] T. Keenen, S. Patton, The structure of milk: implications for sampling and storage, Handb. Milk Compos. Jensen RG Ed. (1995) 5–50.

[13] A.V.R. Murthy, F. Guyomarc'h, G. Paboeuf, V. Vié, C. Lopez, Cholesterol strongly affects the organization of lipid monolayers studied as models of the milk fat globule membrane: Condensing effect and change in the lipid domain morphology, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1848 (2015) 2308–2316. doi:10.1016/j.bbamem.2015.06.014.

[14] O. Et-Thakafy, F. Guyomarc'h, C. Lopez, Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time, Food Chem. 220 (2017) 352–361. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.017.

[15] R.G. Jensen, The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000, J. Dairy Sci. 85 (2002) 295–350.

[16] R. Jensen, D. Newburg, Bovine milk lipids, Handb. Milk Compos. 546 (1995).

[17] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, Nature. 387 (1997) 569.

[18] S. Gallier, D. Gragson, R. Jiménez-Flores, D. Everett, Using Confocal Laser Scanning Microscopy To Probe the Milk Fat Globule Membrane and Associated Proteins, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 4250–4257. doi:10.1021/jf9032409.

[19] C. Lopez, M.-N. Madec, R. Jimenez-Flores, Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins, Food Chem. 120 (2010) 22–33. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.065.

[20] X. Zou, Z. Guo, Q. Jin, J. Huang, L. Cheong, X. Xu, X. Wang, Composition and microstructure of colostrum and mature bovine milk fat globule membrane, Food Chem. 185 (2015) 362–370. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.145.

[21] C. Baumrucker, T. Keenan, Membranes of mammary gland. VII. Stability of milk fat globule membrane in secreted milk, J. Dairy Sci. 56 (1973) 1092–1094.

[22] A. Jukkola, O.J. Rojas, Milk fat globules and associated membranes: Colloidal properties and processing effects, Adv. Colloid Interface Sci. 245 (2017) 92–101. doi:10.1016/j.cis.2017.04.010.

[23] S. Patton, C. Long, T. Sooka, Effect of Storing Milk on Cholesterol and Phospholipid of Skim Milk1, J. Dairy Sci. 63 (1980) 697–700.

[24] H.T.H. Nguyen, L. Ong, E. Beaucher, M.-N. Madec, S.E. Kentish, S.L. Gras, C. Lopez, Buffalo milk fat globules and their biological membrane: in situ structural investigations, Food Res. Int. 67 (2015) 35–43. doi:10.1016/j.foodres.2014.10.022.

[25] S. Garcia-Manyes, F. Sanz, Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1798 (2010) 741–749. doi:10.1016/j.bbamem.2009.12.019.

[26] J.K. Li, R.M.A. Sullan, S. Zou, Atomic Force Microscopy Force Mapping in the Study of Supported Lipid Bilayers †, Langmuir. 27 (2010) 1308–1313. doi:10.1021/la103927a.

[27] O. Et-Thakafy, N. Delorme, C. Gaillard, C. Mériadec, F. Artzner, C. Lopez, F. Guyomarc'h, Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy, Langmuir. 33 (2017) 5117–5126. doi:10.1021/acs.langmuir.7b00363.

[28] C. Rotsch, M. Radmacher, Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study, Biophys. J. 78 (2000) 520–535.

[29] N. Guz, M. Dokukin, V. Kalaparthi, I. Sokolov, If cell mechanics can be described by elastic modulus: study of different models and probes used in indentation experiments, Biophys. J. 107 (2014) 564–575.

[30] S.E. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao, J.K. Gimzewski, Nanomechanical analysis of cells from cancer patients, Nat. Nanotechnol. 2 (2007) 780–783.

[31] Q. Luo, D. Kuang, B. Zhang, G. Song, Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility, Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1860 (2016) 1953–1960. doi:10.1016/j.bbagen.2016.06.010.

[32] G. Francius, B. Tesson, E. Dague, V. Martin Jézéquel, Y.F. Dufrêne, Nanostructure and nanomechanics of live Phaeodactylum tricornutum morphotypes, Environ. Microbiol. 10 (2008) 1344–1356.

[33] L. Picas, F. Rico, S. Scheuring, Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers, Biophys. J. 102 (2012) L01–L03. doi:10.1016/j.bpj.2011.11.4001.

[34] R.M.A. Sullan, J.K. Li, S. Zou, Direct Correlation of Structures and Nanomechanical Properties of Multicomponent Lipid Bilayers, Langmuir. 25 (2009) 7471–7477. doi:10.1021/la900395w.

[35] T.S. Balasuriya, L. Ong, S.L. Gras, R.R. Dagastine, Changes in morphological and nano-mechanical properties of the milk fat globule membrane during processing, RSC Adv. 2 (2012) 2384. doi:10.1039/c2ra00844k.

[36] A.V.R. Murthy, F. Guyomarc'h, C. Lopez, Cholesterol Decreases the Size and the Mechanical Resistance to Rupture of Sphingomyelin Rich Domains, in Lipid Bilayers Studied as a Model of the Milk Fat Globule Membrane, Langmuir. 32 (2016) 6757–6765. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01040.

[37] P.R. Maulik, G.G. Shipley, N-palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine, Biochemistry (Mosc.). 35 (1996) 8025–8034.

[38] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, AFM-Based Force-Clamp Monitors Lipid Bilayer Failure Kinetics, Langmuir. 28 (2012) 6403–6410. doi:10.1021/la3005147.

[39] C. Lopez, V. Briard-Bion, O. Ménard, Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring, Food Res. Int. 58 (2014) 59–68. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.049.

[40] F. Guyomarc'h, S. Zou, M. Chen, P.-E. Milhiet, C. Godefroy, V. Vié, C. Lopez, Milk Sphingomyelin Domains in Biomimetic Membranes and the Role of Cholesterol: Morphology and Nanomechanical Properties Investigated Using AFM and Force Spectroscopy, Langmuir. 30 (2014) 6516–6524. doi:10.1021/la501640y.

[41] M. Mirza, Y. Guo, K. Arnold, C.J. va. Oss, S. Ohki, HYDROPHOBIZING EFFECT OF CATIONS ON ACIDIC PHOSPHOLIPID MEMBRANES, J. Dispers. Sci. Technol. 19 (1998) 951–962. doi:10.1080/01932699808913225.

[42] C.G. Sinn, M. Antonietti, R. Dimova, Binding of calcium to phosphatidylcholine–phosphatidylserine membranes, Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 282–283 (2006) 410–419. doi:10.1016/j.colsurfa.2005.10.014.

[43] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, Structural impact of cations on lipid bilayer models: Nanomechanical properties by AFM-force spectroscopy, Mol. Membr. Biol. 31 (2014) 17–28. doi:10.3109/09687688.2013.868940.

[44] D. Marsh, Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers, Chem. Phys. Lipids. 144 (2006) 146–159. doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.08.004.

[45] F. Guyomarc'h, M. Chen, O. Et-Thakafy, S. Zou, C. Lopez, Gel-gel phase separation within milk sphingomyelin domains revealed at the nanoscale using atomic force microscopy, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1859 (2017) 949–958. doi:10.1016/j.bbamem.2017.02.010.

[46] H.A. Rinia, M.M. Snel, J.P. van der Eerden, B. de Kruijff, Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy, FEBS Lett. 501 (2001) 92–96.

[47] A.V.R. Murthy, F. Guyomarc'h, C. Lopez, The temperature-dependent physical state of polar lipids and their miscibility impact the topography and mechanical properties of bilayer models of the milk fat globule membrane, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1858 (2016) 2181–2190. doi:10.1016/j.bbamem.2016.06.020.

[48] S. Garcia-Manyes, G. Oncins, F. Sanz, Effect of Temperature on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy, Biophys. J. 89 (2005) 4261–4274. doi:10.1529/biophysj.105.065581.

[49] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study, Langmuir. 28 (2012) 12851–12860. doi:10.1021/la302620t.

[50] H.M. Seeger, A.D. Cerbo, A. Alessandrini, P. Facci, Supported Lipid Bilayers on Mica and Silicon Oxide: Comparison of the Main Phase Transition Behavior, J. Phys. Chem. B. 114 (2010) 8926–8933. doi:10.1021/jp1026477.

[51] A. Alessandrini, P. Facci, Phase transitions in supported lipid bilayers studied by AFM, Soft Matter. 10 (2014) 7145. doi:10.1039/C4SM01104J.

[52] A. Alessandrini, H.M. Seeger, A. Di Cerbo, T. Caramaschi, P. Facci, What do we really measure in AFM punch-through experiments on supported lipid bilayers?, Soft Matter. 7 (2011) 7054. doi:10.1039/c1sm05453h.

[53] L. Picas, M.T. Montero, A. Morros, G. Oncins, J. Hernández-Borrell, Phase Changes in Supported Planar Bilayers of 1-Palmitoyl-2-oleoyl- *sn* -glycero-3-phosphoethanolamine, J. Phys. Chem. B. 112 (2008) 10181–10187. doi:10.1021/jp8037522.

[54] J. Daillant, E. Bellet-Amalric, A. Braslau, T. Charitat, G. Fragneto, F. Graner, S. Mora, F. Rieutord, B. Stidder, Structure and fluctuations of a single floating lipid bilayer, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 11639–11644.

[55] R. Dimova, Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes, Adv. Colloid Interface Sci. 208 (2014) 225–234.

[56] C.-H. Lee, W.-C. Lin, J. Wang, All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions, Phys. Rev. E. 64 (2001) 020901.

[57] P. Szekely, T. Dvir, R. Asor, R. Resh, A. Steiner, O. Szekely, A. Ginsburg, J. Mosenkis, V. Guralnick, Y. Dan, T. Wolf, C. Tamburu, U. Raviv, Effect of Temperature on the Structure of Charged Membranes, J. Phys. Chem. B. 115 (2011) 14501–14506. doi:10.1021/jp207566n.

[58] J.C. Lawrence, D.E. Saslowsky, J.M. Edwardson, R.M. Henderson, Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy, Biophys. J. 84 (2003) 1827–1832.

[59] T.P. McMullen, R.N. Lewis, R.N. McElhaney, Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines, Biochemistry (Mosc.). 32 (1993) 516–522.

[60] R.M.A. Sullan, J.K. Li, C. Hao, G.C. Walker, S. Zou, Cholesterol-Dependent Nanomechanical Stability of Phase-Segregated Multicomponent Lipid Bilayers, Biophys. J. 99 (2010) 507–516. doi:10.1016/j.bpj.2010.04.044.

[61] K. Cheng, M.-H. Ropers, C. Lopez, The miscibility of milk sphingomyelin and cholesterol is affected by temperature and surface pressure in mixed Langmuir monolayers, Food Chem. 224 (2017) 114–123. doi:10.1016/j.foodchem.2016.12.035.

[62] G. Pabst, A. Hodzic, J. Štrancar, S. Danner, M. Rappolt, P. Laggner, Rigidification of Neutral Lipid Bilayers in the Presence of Salts, Biophys. J. 93 (2007) 2688–2696. doi:10.1529/biophysj.107.112615.

[63] T.P. McMullen, R.N. McElhaney, Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 1 (1996) 83–90.

[64] T. Mills, J. Huang, G. Feigenson, J. Nagle, Effects of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers, Gen. Physiol. Biophys. 28 (2009) 126–139. doi:10.4149/gpb_2009_02_126.

[65] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, Ordering effects of cholesterol and its analogues, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1788 (2009) 97–121. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.022.

[66] M.B. Sankaram, T.E. Thompson, Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin, Biochemistry (Mosc.). 29 (1990) 10670–10675.

[67] P. Uppamoochikkal, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Orientation of tie-lines in the phase diagram of DOPC/DPPC/cholesterol model biomembranes, Langmuir. 26 (2010) 17363–17368.

[68] R.S. Gracià, N. Bezlyepkina, R.L. Knorr, R. Lipowsky, R. Dimova, Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles, Soft Matter. 6 (2010) 1472. doi:10.1039/b920629a.

[69] J.M. Smaby, M. Momsen, V.S. Kulkarni, R.E. Brown, Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains, Biochemistry (Mosc.). 35 (1996) 5696–5704.

[70] X. Liang, G. Mao, K.Y.S. Ng, Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy, J. Colloid Interface Sci. 278 (2004) 53–62. doi:10.1016/j.jcis.2004.05.042.

[71] Y. Takechi-Haraya, K. Sakai-Kato, Y. Abe, T. Kawanishi, H. Okuda, Y. Goda, Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity, Langmuir. 32 (2016) 6074–6082. doi:10.1021/acs.langmuir.6b00741.

[72] X.-M. Li, M.M. Momsen, J.M. Smaby, H.L. Brockman, R.E. Brown, Cholesterol Decreases the Interfacial Elasticity and Detergent Solubility of Sphingomyelins †, Biochemistry (Mosc.). 40 (2001) 5954–5963. doi:10.1021/bi002791n.

[73] S. Chiantia, J. Ries, N. Kahya, P. Schwille, Combined AFM and Two-Focus SFCS Study of Raft-Exhibiting Model Membranes, ChemPhysChem. 7 (2006) 2409–2418. doi:10.1002/cphc.200600464.

[74] S. Barman, D.P. Nayak, Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells, J. Virol. 81 (2007) 12169–12178.

[75] Y. Deng, Z.A. Almsherqi, M.M. Ng, S.D. Kohlwein, Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes?, Trends Cell Biol. 20 (2010) 371–379.

[76] A.K. Saha, S.F. Dallo, A.L. Detmar, P. Osmulski, M. Gaczynska, T.H.-M. Huang, A.K. Ramasubramanian, Cellular cholesterol regulates monocyte deformation, J. Biomech. 52 (2017) 83–88. doi:10.1016/j.jbiomech.2016.12.033.

[77] S.-T. Yang, A.J.B. Kreutzberger, J. Lee, V. Kiessling, L.K. Tamm, The role of cholesterol in membrane fusion, Chem. Phys. Lipids. 199 (2016) 136–143. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003.

[78] R.A. Cooper, Cholesterol on Membrane Fluidity and Cell, in: Norm. Abnorm. Red Cell Membr. Proc. ICN-UCLA Symp. Held Keyst. Colo. March 1978, AR Liss, 1979: p. 135.

[79] R.A. Cooper, M.H. Leslie, S. Fischkoff, M. Shinitzky, S.J. Shattil, Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterols per phospholipid, Biochemistry (Mosc.). 17 (1978) 327–331.

[80] K. Simons, E. Ikonen, How cells handle cholesterol, Science. 290 (2000) 1721–1726.

[81] D. Lingwood, K. Simons, Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle, Science. 327 (2010) 46–50. doi:10.1126/science.1174621.

[82] T. Róg, I. Vattulainen, Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: What do we know about their role in raft-like membranes?, Chem. Phys. Lipids. 184 (2014) 82–104. doi:10.1016/j.chemphyslip.2014.10.004.

6.3. Bilan du chapitre 6 et perspectives

Sur la base d'un modèle proche de l'organisation des lipides polaires dans la MFGM, nous avons pu valider notre hypothèse selon laquelle l'hétérogénéité de structure induite par la coexistence de plusieurs phases conduit à une hétérogénéité mécanique dans le plan de la membrane. En effet, la caractérisation par AFM, à 20°C, des membranes modèles de MFGM a révélé la présence de deux phases différentes interprétées comme étant le résultat de la ségrégation des lipides saturés notamment la milk SM dans des domaines, et des lipides insaturés dans une phase continue. L'analyse des images AFM a montré que la différence de hauteur entre les domaines gel et la matrice fluide environnante était de ~ 0.7 nm. La combinaison de l'imagerie et de la cartographie de force AFM ont montré que les domaines riches en milk SM dans la phase gel, présentaient un module de Young plus élevé à 20 °C que celui de la phase fluide continue. Après le chauffage à 50 °C, les domaines ont subi une transition de phase gel/fluide qui s'est traduite par la disparition du contraste topographique et mécanique, avec pour résultat de faibles valeurs de module de Young (4 MPa). Dans un second temps, nous avons mesuré le module de Young sur la milk SM en phase gel, fluide et liquide ordonné formée en présencede cholestérol. Le module de Young calculé sur les membranes milk SM/chol (50:50% mol) était faible, avec des valeurs similaires à celles d'une phase fluide, de l'ordre de 2 MPa. Au contraire de la phase gel, les propriétés élastiques de ces membranes en phase liquide ordonné n'ont pas été affectées par l'augmentation de la température. En accord avec la littérature, le cholestérol a donc effectivement montré un effet fluidifiant sur les membranes de milk SM en phase gel ainsi qu'une abolition de la transition de phase, et nous montrons que l'effet sur l'élasticité des membranes est significatif.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont donc confirmé la présence d'une hétérogénéité mécanique dans le plan des membranes biologiques modèles et que le cholestérol et la température ont un fort impact sur l'organisation des molécules par conséquent sur les propriétés physiques de

leur assemblage. Cependant, le calcul du module de Young par le modèle de Hertz sur des membranes planes de faible épaisseur (4-6 nm) peut ne pas être très précis en raison des limites d'application de ce modèle théorique. Dans la prochaine étape du travail de thèse dédiée à un approfondissement du lien entre la structure moléculaire, la composition lipidique et l'élasticité des membranes, nous avons donc choisi de travailler sur des vésicules (membranes en 3D) en utilisant un modèle de calcul adapté à la géométrie de l'objet lipidique.

De ce chapitre, on retient :

L'hétérogénéité de structure des membranes modèles de la MFGM, induite par la séparation de phase des lipides, a généré une hétérogénéité de propriétés élastiques à température ambiante.

A 20°C, les domaines riches en milk SM en phase gel ont montré des propriétés élastiques plus élevées que la phase fluide de lipides insaturés, avec une différence de 5 MPa.

Sous l'effet du chauffage, le contraste structural et mécanique a disparu et les propriétés physiques de la membrane deviennent similaires à celle d'un fluide.

En présence du cholestérol, les membranes de milk SM changent d'état en passant d'une phase gel à une phase liquide ordonné, ce qui a diminué dramatiquement (9 fois) leurs propriétés mécaniques.

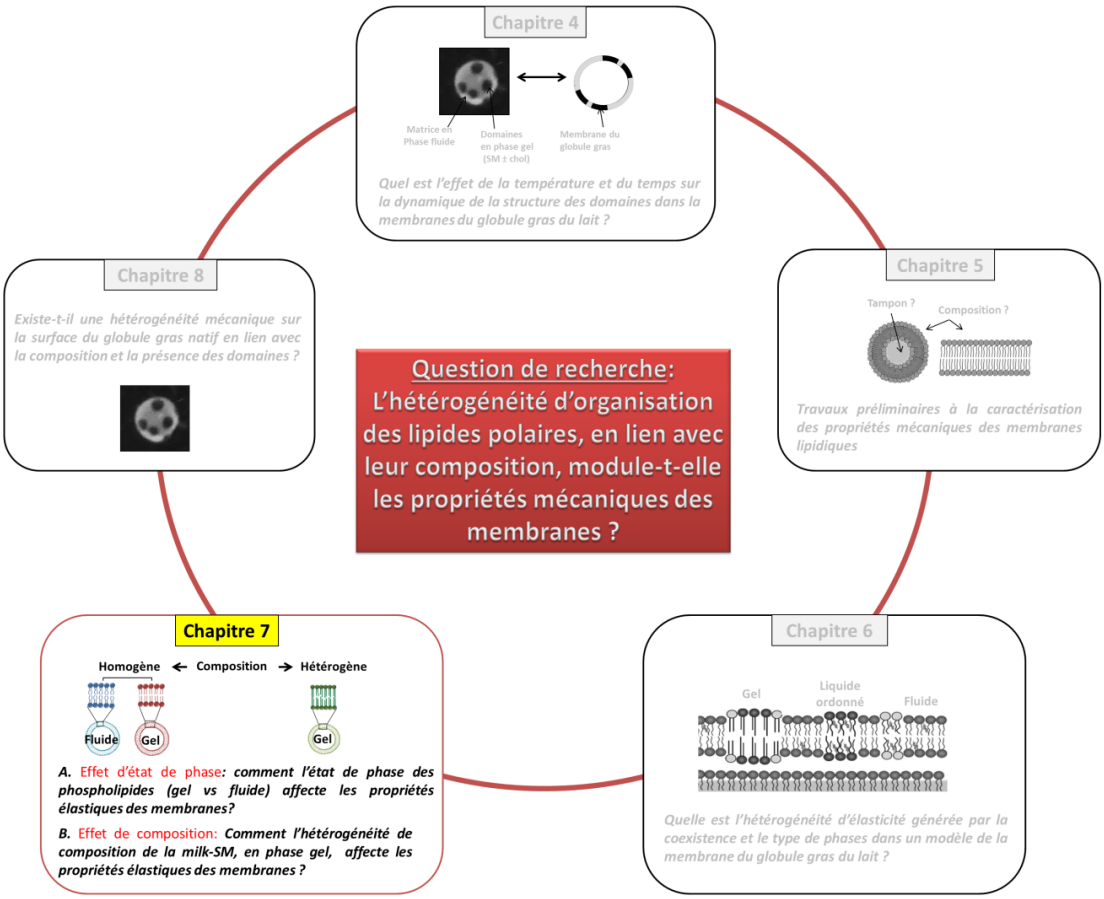
L'augmentation de la température a réduit les propriétés élastiques des membranes de milk SM en phase gel tandis qu'elles changent très peu en phase liquide ordonné en présence du cholestérol.

Chapitre 7: Comment l'état de phase des phospholipides (gel vs fluide) et l'hétérogénéité de composition de milk SM affectent les propriétés élastiques des membranes ?

7.1. Introduction

Les résultats présentés dans le quatrième et le sixième chapitre ont permis de confirmer que l'organisation des lipides polaires dans la membrane du globule gras conduit à une séparation de phases entre les acides gras saturés, qui se ségrègent en domaines en phase ordonnée, et les acides gras insaturés, qui forment une phase continue fluide. Au-delà des différences mécaniques que nous avons pu observer entre les deux phases présentes dans des membranes modèles composées d'un extrait lipidique de la MFGM, nous avons voulu aller plus loin dans la compréhension du rôle de la structure chimique de lipides sur les propriétés mécaniques des membranes. De plus, nous avons voulu aborder cette question pour des objets sphériques comme le globule gras. Nos objectifs étaient donc d'étudier (i) l'effet de l'état de phase des lipides polaires laitiers en lien avec leur structure moléculaire et (ii) l'effet de l'hétérogénéité de composition chimique sur la modulation des propriétés mécaniques des membranes. Notre stratégie a consisté à utiliser des systèmes contrôlés en composition, et de complexité croissante. Pour cela, nous avons utilisé des lipides modèles tels que la dioléoylphosphatidycholine (DOPC, insaturée O=C18 :1 ; Tm=-20°C), la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, saturée P=16:0 ; Tm= 41°C), des sphingomyélines synthétiques (palmitoylsphingomyéline, C16 :0-SM, Tm= 41°C; lignoceroylsphingomyéline, C24 :0-SM, Tm= 46°C; nervonoylsphingomyéline, C24 :1-SM, Tm= 27°C) et la sphingomyéline du lait (milk SM, Tm=35°C) qui contient plusieurs espèces moléculaires majoritairement saturées (91% de C16:0, C22:0, C23:0, C24:0 et 3% de C24:1). A partir de ces lipides polaires, des vésicules unilamellaires de petite taille (ou « liposomes ») ont été préparées et caractérisées dans les mêmes conditions en utilisant différentes techniques physiques (calorimétrie, AFM, XRD…). Les mesures de forces ont été obtenues par nanoindentation des vésicules par AFM (Delorme and Fery, 2006; Liang et al., 2004a). L'acquisition des données de nanoindentation sur des bicouches non supportées et l'utilisation d'un modèle théorique de calcul adapté à la géométrie des liposomes, ont permis de quantifier deux paramètres caractéristiques des propriétés élastiques des membranes lipidiques : le module de Young et la rigidité de courbure. Les résultats de ce chapitre sont présentés en deux parties : (1) la première sera dédiée à l'étude de l'effet de l'état de phase en comparant les propriétés physiques et mécaniques des membranes composées de DOPC ou de DPPC (insaturé vs saturé); (2) La deuxième sera consacrée à l'étude de l'effet de l'hétérogénéité de composition sur les propriétés mécaniques de la milk SM où les deux systèmes purs précédents

seront utilisés comme références. Pour pouvoir comprendre la réponse mécanique de membranes hétérogènes, comme celles contenant de la milk SM, nous avons utilisé des systèmes modèles composés de SM synthétiques de longueurs de chaînes et de degré d'insaturation différents, purs ou en mélange. L'étude par AFM à l'échelle moléculaire nous a également permis d'étudier les caractéristiques topographiques de bicouches composées de SM synthétiques. L'assemblage des SM à différentes longueurs de chaîne peut générer plusieurs phases gel, selon le type d'interdigidation formée, ce qui peut avoir des conséquences sur les propriétés thermiques et physiques de la membrane.



Ces travaux ont fait l'objet de plusieurs valorisations scientifiques.

- Ils ont été présentés dans une communication orale au cours des 7èmes Rencontres de la Biologie et de la Physique du Grand Ouest, les 23-24 juin 2016 à Nantes.

-Ils ont également été présentés sous la forme de posters :

i) Au congrès international AFM Biomed, les 11-15 avril 2016 à Porto, Portugal;

ii) Au congrès mondial de la fédération internationale du lait (IDF world dairy summit), les 16-21 octobre 2016 à Rotterdam, Pays-Bas ;

iii) Et au congrès Euro Fed Lipid, les 27-30 août 2017 à Uppsala, Suède.

- Enfin, les résultats obtenus dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Langmuir* concernant l'effet d'état de phase sur les propriétés mécaniques des membranes. Un deuxième article est en préparation et concerne les travaux réalisés sur l'effet de la composition lipidique de la milk SM. La mesure des épaisseurs des membranes de SM synthétiques a été utilisée dans un troisième article accepté dans le journal *Biochimica Biophysica Acta : Biomembranes*, en annexe de cette thèse.

7.2. Article 3: Propriétés élastiques des membranes composées de phospholipides laitiers en phase gel ou en phase fluide: indentation de liposomes par AFM

LANGMUIR

Article

pubs.acs.org/Langmuir

Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy

Oumaima Et-Thakafy,[†] Nicolas Delorme,[∥] Cédric Gaillard,[‡] Cristelle Mériadec,[§] Franck Artzner,[§] Christelle Lopez,[†] and Fanny Guyomarc'h*[,†]

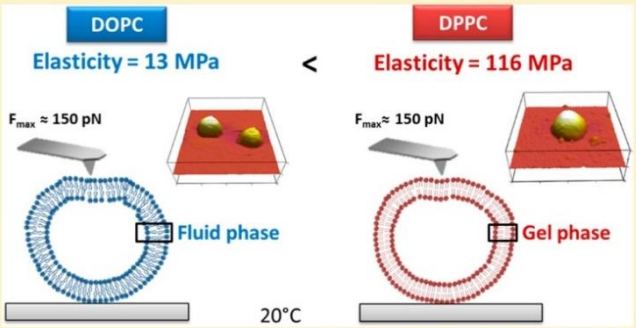
[†]STLO, INRA, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France

[‡]UR BIA 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, 44316 Nantes, France

[§]Institut de Physique de Rennes, UMR 6251, CNRS, Université de Rennes 1, 263 Av. Général Leclerc, 35042 Rennes, France

[∥]UMR CNRS 6283 Institut des Molécules et Matériaux du Mans, Université du Maine, Université Bretagne-Loire, 72000 Le Mans, France

ABSTRACT: In many liposome applications, the nanomechanical properties of the membrane envelope are essential to ensure, e.g., physical stability, protection, or penetration into tissues. Of all factors, the lipid composition and its phase behavior are susceptible to tune the mechanical properties of membranes. To investigate this, small unilamellar vesicles (SUV; diameter < 200 nm), referred to as liposomes, were produced using either unsaturated 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) or saturated 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) in aqueous buffer at pH 6.7. The respective melting temperatures of these phospholipids were −20 and 41 °C. X-ray diffraction analysis confirmed that at 20 °C DOPC was in the fluid phase and DPPC was in the gel phase. After adsorption of the liposomes onto flat silicon substrates, atomic force microscopy (AFM) was used to image and probe the mechanical properties of the liposome membrane. The resulting force−distance curves were treated using an analytical model based on the shell theory to yield the Young's modulus (E) and the bending rigidity (k_C) of the curved membranes. The mechanical investigation showed that DPPC membranes were much stiffer (E = 116 ± 45 MPa) than those of DOPC (E = 13 ± 9 MPa) at 20 °C. The study demonstrates that the employed methodology allows discrimination of the respective properties of gel- or fluid-phase membranes when in the shape of liposomes. It opens perspectives to map the mechanical properties of liposomes containing both fluid and gel phases or of biological systems.



1. INTRODUCTION

In the recent years, small unilamellar vesicles of phospholipids (<μm diameter) have gained increasing interest in various liposome technologies, e.g., as drug delivery systems in pharmacy or as protective cargo capsules for cosmetics, for nutraceuticals, or for food design.[1,2] They are also interesting models to investigate and possibly control in vivo biological signaling mechanisms involving extracellular vesicles such as the so-called exosomes.[3,4] The composition of the phospholipids, i.e., the acyl chains' saturation/unsaturation and length, impacts their phase state in the liposomes at ambient temperatures.[5] This, in turn, is likely to affect the mechanical properties of the liposomes, which are of paramount importance for these applications. Mechanical properties direct the stability, size, shape and fusion of the liposomes[6−8] as well as the membrane fluidity/rigidity or permeability and hence their loading capacity or their ability to penetrate tissues.[9−13] For example, the permeability of various saturated polar lipid membranes to glucose strongly increases as the lipid undergoes gel-to-liquid disordered (l_d) phase transition.[14] As another example, milk sphingomyelin exhibited maximum permeability at temperatures where gel-to-l_d phase transition occurs.[13] This has important consequences on the formulation and design of liposomes, as the desirable mechanical properties will differ depending on the application and temperature, e.g., storage at ambient temperature, transdermal delivery of drugs, etc. Experimental techniques to measure the mechanical properties of liposomes, such as the pipet aspiration technique, osmotic or mechanical compression, shear-induced or optical tweezers deformation[7] are often designed for large objects of the μm length scale. For liposomes at the nanoscale, such as small unilamellar vesicles, indentation measurement using atomic force microscopy (AFM) has proven a valuable and sensitive approach.[15−20] The liposomes, adsorbed onto a flat substrate,

Received: February 2, 2017
Revised: March 27, 2017
Published: May 5, 2017

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

are indented by the AFM with low penetration distances (i.e., the order of magnitude of the membrane thickness) and at as low force values as down to the pN. The major advantage of AFM over a nanoindenter is also its imaging capacity, which allows to locate liposomes and to indent them centrally, even though not perfectly normally.[16] In a pioneering study, Laney et al.[17] extracted synaptic liposomes (~110 nm diameter) from the electric organ of the electric ray *Torpedo californica*, immobilized them by adsorption onto mica and measured elastic moduli values in the range 0.2−1.3 MPa. Liang et al.[19,21,22] followed the same approach on small (40−160 nm) liposomes of egg phosphadidylcholine (mainly stearoyloleoylphosphatidylcholine, SOPC) and found that the elastic modulus increased with the addition of up to 50 mol % cholesterol from ~2 to 13 MPa. However, these authors used an adaptation of the Hertz model for their calculations that assumed the liposomes to be homogeneous filled spheres. By implementing the shell deformation theory, Delorme and Fery[16] obtained higher elasticity values of ~110 MPa by indenting DPPC (dipalmitoylphophastidylcholine) and proposed that the Hertz model underestimated the mechanical properties of the liposomes. However, due to its monounsaturation, egg PC has a melting temperature (T_m) of −15 °C and is therefore in the l_d or liquid crystalline (Lα) phase at 20 °C, while the fully saturated DPPC is in the gel or solid-ordered (s_o) phase (T_m = 41.7 °C).[22,23] Therefore, it is yet to assess whether the AFM indentation measurement combined with the shell theory interpretation is sensitive enough to discriminate liposomes with presumably different mechanical properties of their membranes, e.g. by comparing saturated and unsaturated phospholipids in different physical phases at 20 °C.

When the membranes are spread as two-dimensional supported lipid bilayers (SLBs), measurement of the rupture force of membranes using AFM indentation has proven to fully resolve mechanical differences between phospholipids with various chain lengths, saturation degrees or head groups.[24] However, calculation of the SLBs' effective elasticity using indentation of the membrane and the Hertz model requires careful and narrow experimental conditions not to be affected by the support.[25] Furthermore, direct measurement on small liposomes would encompass possible curvature effects. Indeed, their high membrane curvature may affect their mechanical properties, as lateral intermolecular distances and forces vary across the bilayer's thickness.[26,27] However, indentation measurements on 3D vesicles may be either impossible,[28] require high deformation of the objects[19] or somewhat depend on the composition of the internal medium, if different from the surrounding medium.[29] For these reasons, there is interest to assess indentation measurement of the mechanical properties of membranes directly on volumetric objects such as liposomes.

In the present study, the respective elasticities and bending rigidities of membranes of either the unsaturated phospholipid dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) or the saturated phospholipid dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) as shaped in the form of liposomes, were measured at 20 °C using AFM indentation and the shell theory. The results were discussed in light of the respective phase states of the two phospholipids at 20 °C and showed that AFM indentation is a sensitive method to assess the mechanical properties of 3D membrane objects at the nanoscale.

2. EXPERIMENTAL METHODS

2.1. Materials. Pure phospholipids 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC; 18:1; >99%) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC; 16:0; >99%) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) buffer was prepared as PIPES 10 mM (purity ≥99%; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), NaCl 50 mM (Sigma), and $CaCl_2$ 10 mM (Sigma) were dissolved in Milli-Q water and adjusted to pH 6.7 using NaOH 5 M.

2.2. Preparation of Liposomes. Samples were prepared by dissolving appropriate quantity of the lipid powder of DOPC or DPPC in glass vials with chloroform/methanol (4:1 v/v). The organic solvent was then evaporated at 40 °C under a stream of dry nitrogen. The dried lipid films were hydrated with PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 70 °C to reach a final concentration of 0.1 wt % lipids then thoroughly vortexed. Small unilamellar vesicles (SUV) were produced at 65 °C by sonication using a Q700 equipment (Q-sonica, Newtown, CT) and a microtip operating at 50% amplitude (~400 W) for 30 min. After sonication, the SUV suspension was left to cool and equilibrate at room temperature (20 °C). The SUV produced according to this protocol will be designated as "liposomes" throughout this report.

2.3. Dynamic Light Scattering (DLS). The size distribution and the average hydrodynamic diameter (D_h) of the liposomes were measured in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 20 °C by dynamic light scattering (DLS) on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). Measurements were carried out at a scattering angle of 173° and a wavelength of 633 nm. The average D_h (±5 nm) was calculated from the intensity distribution using conversion into an autocorrelation function which is then analyzed with the Stokes−Einstein relation, assuming that particles had a spherical shape. The viscosity of the solution was 1.003 mPa·s at 20 °C and the refractive index of the solvent was 1.33.

2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC). The thermotropic properties of DOPC or DPPC were measured on multilamellar vesicles using a differential scanning calorimetry (DSC) Q1000 apparatus (TA Instruments, New Castle, DE). Multilamellar vesicles (MLV) were produced by rehydration of the lipid films with PIPES−NaCl−$CaCl_2$ buffer at 65 °C to reach a final concentration of 20 wt % lipids, then thorough vortex mixing. MLV are preferred over unilamellar vesicles in order to accommodate the high bilayer concentration. They also allow higher resolution of the DSC thermograms thanks to higher cooperativity of the molecules.[30] The samples were introduced in 20 μL aluminum pans that were then hermetically sealed. An empty pan was used as a reference. The samples were heated at 2 °C·min^{-1} from −40 to 70 °C. The calibration of the calorimeter was performed with indium standard (melting point = 156.66 °C, ΔH melting = 28.41 J·g^{-1}). The thermal measurements were performed in triplicate. Standard parameters were calculated by using TA software (Universal Analysis 2000, v 4.1 D).

2.5. Temperature-Controlled X-ray Diffraction (XRD). X-ray scattering experiments were performed on the homemade Guinier beamline at IPR.[31] A two-dimensional Pilatus detector with sample to detector distance of 232 mm allowed the recording of XRD patterns in the range 0.013 Å^{-1} to 1.742 Å^{-1}, thus covering both the small and wide-angles regions of interest to characterize the lamellar structures and to identify the packing of the acyl chains, respectively. Diffraction patterns displayed series of concentric rings as a function of the radial scattering vector $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ = 1.541 Å is the wavelength of the incident beam. The channel to scattering vector q calibration of the detector was carried out with silver behenate.[32] Small volumes (around 10 μL) of samples containing DOPC or DPPC vesicles were loaded in thin quartz capillaries of 1.5 mm diameter (GLAS W. Muller, Berlin, Germany) and inserted in the setup at a controlled temperature.

2.6. Transmission Electron Microscopy (TEM). The observation of DOPC and DPPC liposomes by cryo-TEM was realized as described in previous work.[33] The samples were prepared using a cryoplunge cryo-fixation device (Gatan, Pleasanton, CA) in which a drop of the aqueous suspension was deposited on to glow-discharged

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

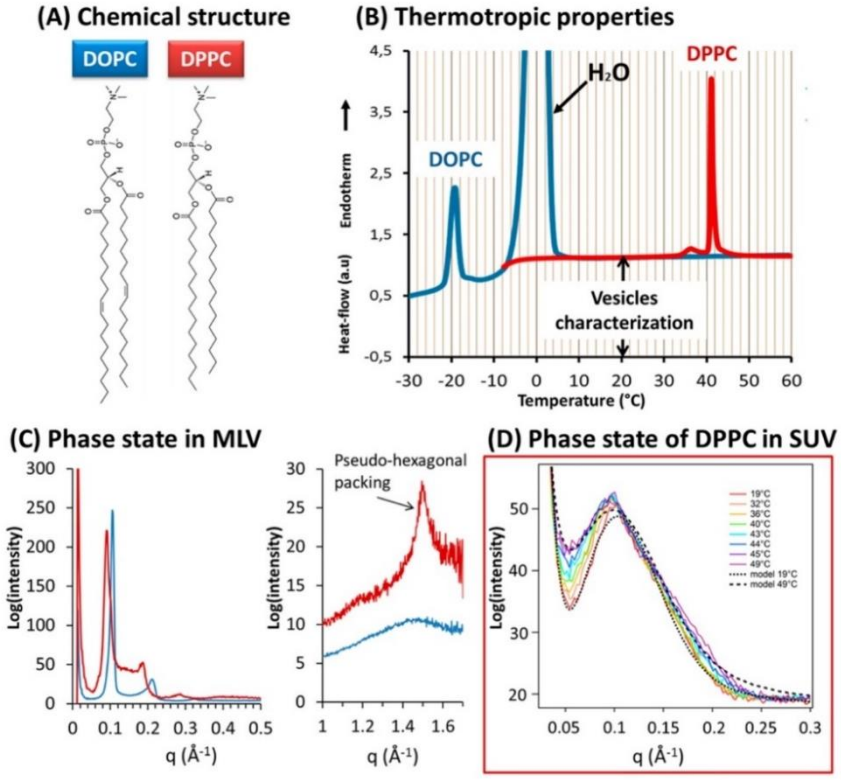


Figure 1. (A) Molecular structures of the unsaturated DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) and saturated DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine). (B) Differential scanning calorimetry thermograms of DOPC (blue trace) and DPPC (red trace) multilamellar vesicles recorded on heating at 2 °C·min^{-1}. (C) X-ray diffraction patterns of DOPC and DPPC fully hydrated multilamellar vesicles recorded at 20 °C at small (left) and wide (right) angles. (D) Small angle X-ray Scattering of DPPC SUV recorded on heating. Unilamellar SAXS model at low and high temperature are superimposed. All experiments were performed in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7.

holey-type carbon-coated grids (Ted Pella Inc., Redding, CA). The TEM grid was then prepared by blotting the drop containing the specimen to a thin liquid layer remained across the holes in the support carbon film. The liquid film was vitrified by rapidly plunging the grid into liquid ethane cooled by liquid nitrogen. The vitrified suspension of liposomes was mounted in a Gatan 910 specimen holder that was inserted in the microscope using a CT-3500-cryotransfer system (Gatan, USA) and cooled with liquid nitrogen. TEM images were then obtained from liposomes suspension preserved in vitreous ice and suspended across a hole in the supporting carbon substrate. The samples were observed under low dose conditions (<10 e$^-$·A^2), at −178 °C, using a JEM 1230 "Cryo" microscope (Jeol, Japan) operated at 80 keV and equipped with a LaB6 filament. All the micrographs were recorded on a Gatan 1.35 K × 1.04 K × 12 bit ES500W CCD camera.

2.7. Atomic Force Microscopy (AFM). *2.7.1. Indentation of Liposomes.* Simple open liquid sample cells were fabricated by gluing small (~0.5 × 1 cm^2) pieces of silicon substrate (molecular orientation 100) onto diagnostic glass slides (Thermo Scientific, Waltham, MA). After thorough cleaning of the cell with ethanol, water and UV/O_3, the liposome suspension equilibrated at 20 °C was deposited onto the clean silicon surface then left to incubate at 20 °C for 30 min. The droplet was then gently exchanged with PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 20 °C to remove the unadsorbed liposomes. The sample was then imaged in contact mode using an MFP-3D Bio AFM (Asylum Research, Santa Barbara, CA), with a typical scan rate of 1 Hz for 20 × 20 μm^2 and 256 × 256 pixels images, silicon MLCT probes (nominal spring constant $k \sim 0.03$ N.m^{-1} – Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA) calibrated extemporaneously using the thermal noise method, and loading forces typically below 1 nN. Upon adsorption onto the flat surface, the spherical liposomes deform into spherical cap geometry. AFM imaging of large area (typical size) allows localization of the adsorbed liposomes, then closer images (typically 2 × 2 μm^2 or less) were recorded and sections were drawn across the images in order to measure the individual liposome's height (H) and base width (W). The AFM probe was then positioned above the center of each liposome and individual force curves ($n > 60$) were recorded with a set point of 150 pN, a distance of 100 nm and a Z-piezo speed of 2 μm.s^{-1}. In these conditions, indentation of the AFM tip into the liposome did not exceed ~5 nm, thereby allowing measurement of the mechanical properties in the elastic regime of the membrane. The approach curves were then treated using the shell theory as described in the result section.

For data visualization and analysis, Gwyddion 2.47 software was also used, as a means to deduce the local radius of curvature (R_c) at the top of individual adsorbed liposomes over a distance of ~130 nm both sides of the apex (130 nm being the estimated radius of the membrane area affected by indentation by a 20 nm radius MLCT probe). The R_c values of individual liposomes were input in the calculation of the Young modulus (see below). Measurement of the local R_c values at the apex of individual liposomes, instead of for the complete objects, avoided errors due to imperfect (e.g., flattened) spherical cap geometry of the liposome upon adsorption, and/or errors due to convolution by the AFM tip. The latter may indeed overestimate lateral dimensions of the liposomes by as much as the tip diameter, but can be avoided as long as near-normal contact is maintained between the tip and the liposomes, which is the case when measuring R_c at their apex.

2.7.2. Measurement of the Bilayer Thickness. Immediately after sonication at 65 °C, 10 μg of the hot lipid suspension was deposited onto freshly cleaved mica in an Asylum Research open liquid cell, then incubated at 65 °C for 60 min. Slow cooling of the samples was performed using a programmed incubator as in Murthy et al.[34] to yield supported lipid bilayers (SLB). Once equilibrated at 20 °C, the bilayers were extensively rinsed and exchanged with PIPES–NaCl–$CaCl_2$ buffer. AFM imaging of the bilayers was then performed in the same buffer and in contact mode using MSNL probe (nominal spring

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

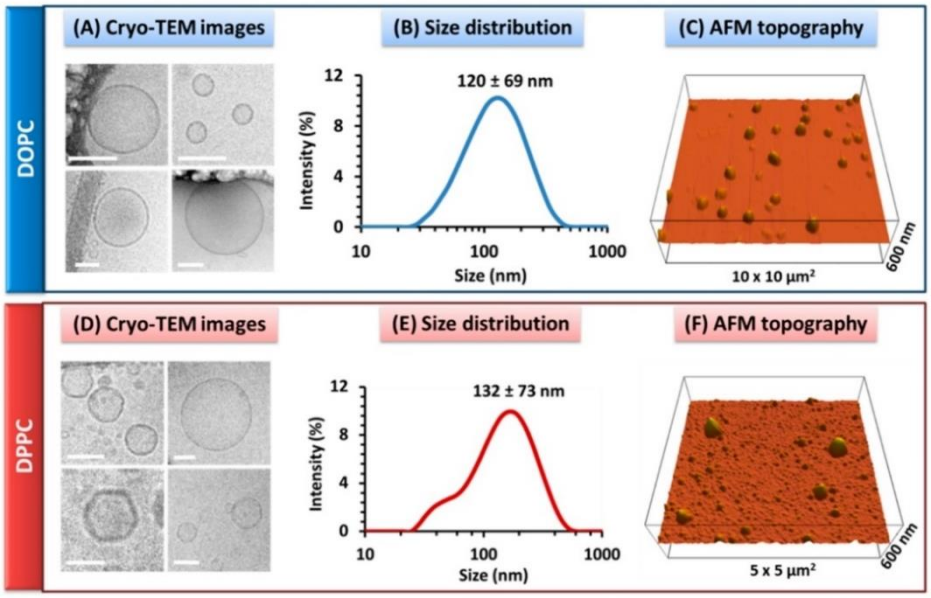


Figure 2. Characterization of the shape and size of DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) or DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) liposomes. (A, D) Cryo-TEM images of the DOPC and DPPC liposomes, respectively; scale bars are 100 nm. (B, E) Dynamic light scattering size distribution in intensity of the DOPC and DPPC liposome suspensions, respectively. (C, F) Typical AFM 3D images of DOPC and DPPC liposomes, respectively. All experiments were performed in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20 °C.

constant $k \sim 0.03$ N·m^{-1}, Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA) with the same imaging parameters already cited. The probes were calibrated extemporaneously using the thermal noise method. Force spectroscopy curves were then acquired at 20 °C by using force-volume imaging of the bilayers (typically 10 × 10 μm^2 or less) with a typical set point of 20 nN and a piezo speed of 2 μm·s^{-1}.

2.8. Statistical Analysis. The results are presented as mean value ± standard deviation. Analysis of variance was performed using the General Linear Model procedure of Statgraphics Plus version 5 (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ). Differences were significant for $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Phase State of DOPC and DPPC at 20 °C. The thermal phase behavior of unsaturated (18:1) DOPC and saturated (16:0) DPPC phospholipids (chemical structures shown in Figure 1A) was examined using DSC and the results were correlated with the structural analysis performed by XRD. Figure 1B shows the respective DSC heating thermograms of both lipids in the same conditions. For DOPC, the thermogram shows a very low temperature of L_β to L_α (gel to fluid) phase transition at $T_m = -20$ °C, in good agreement with previous reports.[11,35,36] Meanwhile, the heating of DPPC revealed two endotherms, characteristic of the L_β (gel) to $P_{\beta'}$ (ripple) transition at $T_m = 37.09$ °C and of the $P_{\beta'}$ (ripple) to L_α (fluid) transition at $T_m = 41.01$ °C, also in good agreement with previous reports.[34,35,37] XRD experiments allowed identification of the lipid phases at 20 °C (Figure 1C). For this, the MLV are interesting not only to investigate the lateral packing of the acyl chains (at large q), but also to confirm the lamellar organization of the phospholipid (at small q). For DOPC, the absence of diffraction peak at wide angles and a lamellar organization characterized at small angles, confirmed the L_α phase of DOPC at 20 °C. DPPC multilamellar vesicles exhibited a single broad peak at $q \sim 1.5$ Å^{-1} corresponding to the formation of ordered phase packed in pseudohexagonal lattice and a lamellar organization at small angles, showing the formation of a $L_{\beta'}$ organization of DPPC at 20 °C. The tilt of the acyl chains may have been induced by the multilamellar organization of the DPPC molecules in the vesicles. Since AFM experiments on DPPC molecules were performed in SUV, the ordered phase state of DPPC molecules in SUV at 20 °C was also proved by XRD experiments performed on SUV of DPPC. As previously reported in literature,[38] the high curvature of expected SUV of DPPC do not allow the recording of a peak at wide angles. Nevertheless, small angle X-ray scattering could be performed upon heating of the SUV. Both high and low temperature spectra can be fitted as an individual membrane using eq 1:

$$I(q) = \frac{1}{q^2}\left[\frac{\sin(qe_{HG}/2)}{qe_{HG}}\, e^{-(qr)^2} + \frac{\sin(qe_{CH_2}/2)}{qe_{CH_2}}\right]^2 \quad (1)$$

with e_{HG} being the headgroup thickness, e_{CH_2} being the aliphatic chain thickness, and r being the rugosity of the headgroup/water interface.

The full analysis demonstrates a contraction of 2 Å of both e_{HG} and e_{CH2} at the gel−fluid transition at 40−44 °C (Figure 1D). This showed that the DPPC molecules in SUV are sensitive to temperature and consequently in the gel phase at room temperature. In conclusion, DSC and XRD confirmed that DOPC (unsaturated; $T_m = -20$ °C) and DPPC (saturated; $T_m = 41$ °C) were respectively present in fluid and gel phases at 20 °C.

3.2. Morphology of the Liposomes at 20 °C. Electron microscopy, dynamic light scattering (DLS) and AFM imaging were used to characterize the morphology (size and shape) of the liposomes obtained after sonication (Figure 2). Cryo-TEM images showed that DOPC and DPPC vesicles were essentially unilamellar and spherically shaped. However, while DOPC liposomes consistently exhibited circular cross sections (Figure 2A), DPPC could show both rounded and/or somewhat faceted membranes (Figure 2D). The presence of angle facets was attributed to the physical gel state of DPPC at 20 °C.[39]

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

Table 1. Geometrical Parameters of Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) or Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Liposomes and Their Corresponding Membrane Thicknesses[a]

lipid	mean height H of liposomes by AFM (nm)	mean width W of liposomes by AFM (nm)	mean diameter of equivalent sphere by AFM (nm)	mean diameter of liposomes by DLS (nm)	membrane thickness by AFM (nm)
DOPC	59 ± 27	310 ± 97	150 ± 90	120 ± 69	3.91 ± 0.41
DPPC	151 ± 48	448 ± 154	296 ± 88	132 ± 73	4.93 ± 0.47

[a]The height (H) and width (W) mean values were measured using the cross section of AFM images of the liposomes and used to calculate the volume of the adsorbed liposomes, from which the mean diameter of a sphere of equivalent volume was deduced (eq 2). The mean values of DOPC and DPPC membrane thicknesses were measured using the jump distance d from breakthrough force curves (n = 30) recorded in PIPES/NaCl/$CaCl_2$ buffer, pH 6.7 at 20°C.

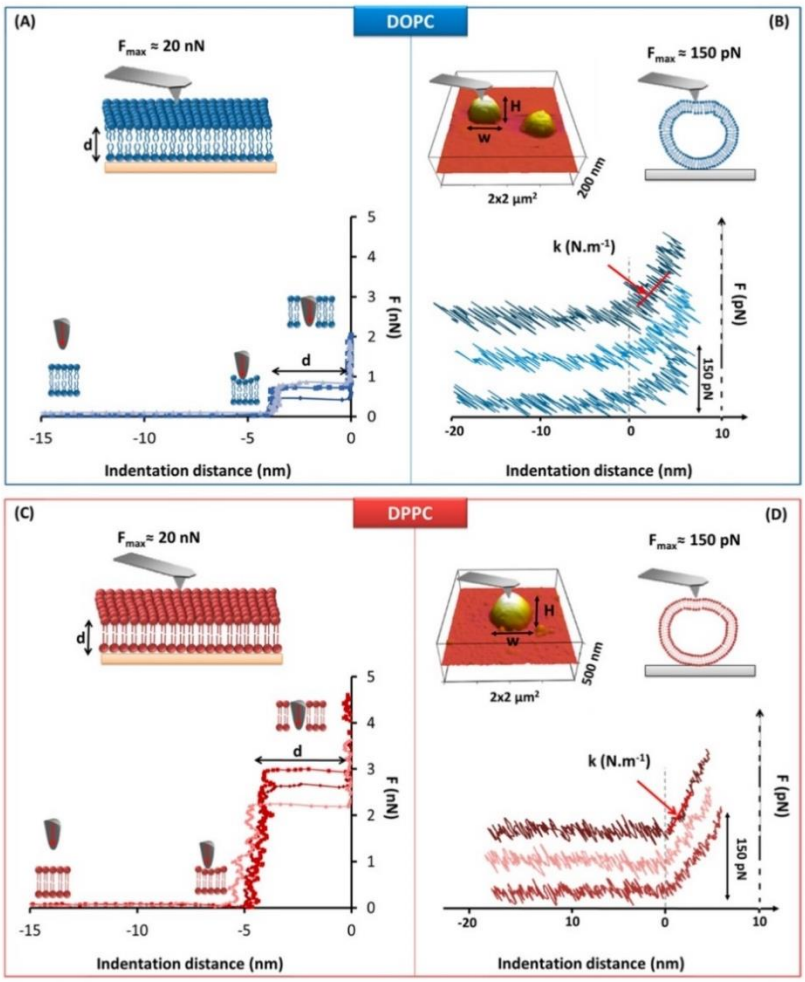


Figure 3. AFM indentation measurement on DOPC (dioleoylphosphatidylcholine, in blue) or DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine, in red) liposomes adsorbed on silicon substrate. (A, C) Breakthrough force curves obtained as a result of tip penetration into DOPC or DPPC supported lipid bilayers, respectively. The average bilayer thickness value d was measured from the jump-through distance (n = 50). (B, D) Typical force curves acquired during indentation of, respectively, DOPC or DPPC liposomes in the elastic regime; in order to infer the bilayer stiffness k from the slope after tip−membrane contact. For the sake of clarity, the force curves are shifted along the Y axis. All measurements were recorded in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20 °C.

Cryo-TEM images revealed variable liposome diameters (from tens to hundreds of nm) which corresponded to the size distribution measured by DLS (Figure 2B, E). For DOPC, the size distribution was monomodal with a mean diameter D_h at 120 ± 69 nm (Figure 2 B). Whereas, DPPC liposomes exhibited a shouldered size distribution with a mean diameter D_h of 132 ± 73 nm for the whole distribution (Figure 2E; Table 1).

In the next step, the liposomes were immobilized by adsorption onto silicon to be first imaged then indented using an AFM probe. Images recorded in contact mode showed that DOPC and DPPC liposomes were perfectly stable on the flat substrate. However, it was not possible to prevent nondestructive deformation due to adsorption, as previously reported.[19,40] The AFM images were also used to measure the height H and basal width W of adsorbed individual liposomes in order to prove that objects observed in AFM images

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

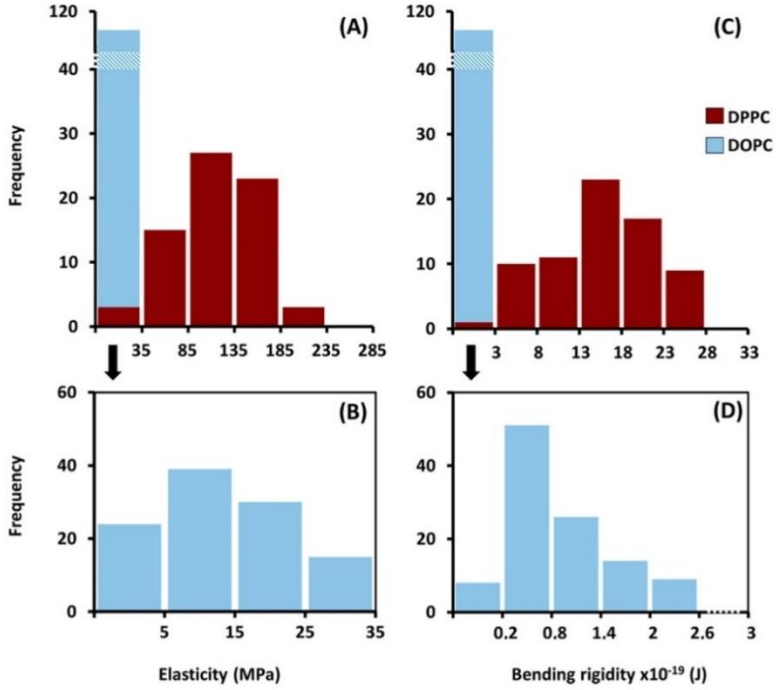


Figure 4. Distributions of the Young moduli E and of the bending rigidity k_C, independent of liposome size, of DOPC (n = 108) and DPPC (n = 71). (A, C) Superposition of both DOPC and DPPC frequency distributions for E and k_C, respectively. (B, D) Respective enlargements of the E and k_C frequency distributions for the DOPC liposomes. All measurements were recorded in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20 °C.

corresponded truly to liposomes. To do this, the adsorbed liposomes were considered to adopt a spherical cap geometry and their volume was calculated as

$$V = \frac{\pi H}{6}\left(\frac{3}{4}W^2 + H^2\right) \quad (2)$$

From eq 2, the mean diameter of a sphere of equivalent volume was inferred and compared with DLS data (Table 1; Figure 2B and E). The mean diameter values were of similar orders of magnitude in both methods; and whatever the method used, DOPC liposomes always exhibited smaller diameters than DPPC ones. This confirmed that the adsorbed objects visible on the AFM images truly were liposomes. However, the mean diameter results measured by AFM were higher than DLS probably because larger liposomes were preferably chosen out of large-area images (such as shown on Figure 2) to perform close-up views and indentation measurements (Table 1).

3.3. Mechanical Properties of Liposomes as a Function of Phase State at 20 °C. *3.3.1. Bilayer Thickness.* The average bilayer thickness d was measured in the conditions used in this work: temperature 20 °C, pH = 6.7, 50 mM NaCl and 10 mM $CaCl_2$. This measurement was performed using atomic force spectroscopy on SLB of DOPC or DPPC spread onto freshly cleaved mica. Average values of d were obtained from measurements performed on various regions of different samples (n = 50). In a typical force spectroscopy experiment, the AFM tip approaches the surface until a mechanical contact with the SLB is established. Then, the bilayer is elastically deformed by the AFM probe until the tip ruptures (breaks through) the membrane, thereby coming into contact with the substrate. The indentation vs force curves exhibited breakthrough events[23,34,41] where the jump-through distance (noted d) was assimilated as the bilayer's thickness.[34] The limitations of this measurement were discussed elsewhere[42] and efforts were taken to regard bilayer compression. Figure 3A and C shows three examples of force−distance curves for each type of lipid bilayer. The d mean values obtained were 3.91 ± 0.46 and 4.93 ± 0.47 nm for DOPC and DPPC bilayers, respectively. This thickness difference between fluid and gel phases was perfectly detected by AFM spectroscopy, in agreement with previous works.[25,43] In the literature, Nagle and Tristram-Nagle[44] also determined the thicknesses of DOPC and DPPC fully hydrated bilayers using XRD and obtained a value of 3.6 nm for DOPC in the fluid phase and of 4.4 nm for DPPC in the gel phase. It should be noted that DOPC has two unsaturated 18 hydrocarbon chains and DPPC has two fully saturated 16 hydrocarbon chains (Figure 1A). Unsaturation is the main reason that adversely affected chain elongation and molecular packing,[45] making DPPC bilayers more ordered and thicker than DOPC bilayers at room temperature.

Noteworthy, the value of the force at which the SLB ruptured (i.e., the breakthrough force) was higher for DPPC (2−3 nN) than for DOPC (<1 nN), in agreement with their respective phase states.[46−48] The lower absolute values found in the present study may be accounted for the lower ionic strength and the sharper AFM tip (radius of MNSL tip ∼2 nm) in comparison to previous works.

3.3.2. Mechanical Properties of DOPC or DPPC Liposomes. In this work, we show that AFM spectroscopy could be used to discriminate and compare the mechanical properties of very small liposomes (∼150 nm) in different phase states. Calculations of the Young modulus E and bending modulus k_C, based on the shell theory model, were done on DOPC or DPPC liposomes respectively in fluid or gel phase. In order to limit the plastic deformation, force distance curves were recorded over 100 nm distance with a set point of 150 pN

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

Table 2. Comparison of the Bending Modulus (k_C) and Young Modulus (E) Values of Liposomes or of Supported Lipid Bilayers in the Fluid or Gel Phase Reported in the Literature Using Different Techniques As Indicated[a]

ref	lipid	technique	phase	bending modulus k_C ($\times 10^{-19}$ J)	Young modulus E (MPa)
liposomes (3D)					
present work	DOPC	AFM spectroscopy	fluid	0.9	13
	DPPC	AFM spectroscopy	gel	15.50	116
16	DPPC	AFM spectroscopy	gel	*13.54*	110
21	egg PC	AFM spectroscopy	fluid	0.27	1.97
45	synthetic phospholipids (18:1)	micropipette pressurization	fluid	0.90	*12.70*
54	DMPC	phase contrast microscopy	fluid	1.27	*26*
55	DMPC	phase contrast microscopy	fluid	1.15	*24*
56	DOPC	osmotic swelling	fluid	*1.06*	15
supported bilayers (2D)					
present work	DOPC	AFM spectroscopy	fluid	0.88	27
	DPPC	AFM spectroscopy	gel	2.03	31
25	DOPC	AFM spectroscopy	fluid	1.69	19.3
	DPPC	AFM spectroscopy	gel	2.33	28.1
61	DOPC	AFM spectroscopy	fluid	*4.61*	80
	ESM/Chol	AFM spectroscopy	liquid ordered	*12.94*	140
62	DOPC	AFM spectroscopy	fluid	*8.65*	150
	ESM/Chol	AFM spectroscopy	liquid ordered	*27.72*	300

[a]Abbreviations stand for: EggPC = mixture of unsaturated (54.8 wt %) and saturated (45.2 wt %) phosphatidylcholine; DMPC = 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; ESM = egg sphingomyelin; Chol = cholesterol. Values in italics were calculated by the authors using calculations described in the Appendix (eqs A.2 and A.3).

maximal force. Typical examples are shown in Figure 3B and D. In these conditions, the approaching and retracting curves were superimposed, demonstrating the elastic behavior of the membrane (not shown). The tip-membrane contact was defined as the point where significant positive slope appeared. According to the shell theory developed by Reissner[49] and then Fery et al.,[16,50] the Young modulus E of thin-shelled spherical microcapsule under a point load scales with the bilayer's stiffness, k, which was deduced from the slope of the linear region of each force curve after the tip-membrane contact, i.e., in the small deformation region (Figure 3B and D). As k strongly depends on the size of the individual liposomes,[21] it has to be normalized by the local radius of curvature R_c of the individual liposomes[16] to describe their mechanical properties. Calculation of E requires the bilayers' stiffness k, the local radius of curvature R_c (see section 2.7.1), the bilayer's thickness d (Table1) and the Poisson ratio ν, taken as 0.5:

$$E = \frac{1}{C}\frac{kR_c\sqrt{3(1-\nu^2)}}{4d^2} \tag{3}$$

In eq 3, C is a coefficient that accounts for the double deformation of an adsorbed shell object, such as liposomes, upon indentation by the AFM tip. Indeed, whereas membrane deformation occurs at the contact point between the tip and the liposome, simultaneous deformation also occurs at the contact area between the liposome and the substrate.[51] In their recent paper, Bery et al.[52] produced calculations for a correction factor, C, to be applied as a function of the relative radii of the tip (20 nm) and liposome, and of the shell thickness relative to the radius of the liposomes (Table 1). Since that dimensions were similar for both the DOPC and DPPC liposomes, C was ~0.55 for both types of liposomes.

In another way, the mechanical properties of liposomes can be also represented by the bending rigidity k_C, which is expressed in terms of the same parameters and is also common in the literature:

$$k_C = \frac{Ed^3}{12(1-\nu^2)} \tag{4}$$

Calculation of the Young's modulus, regardless of liposome size, showed that the DPPC liposome membranes (L_β) $E = 116 \pm 45$ MPa were significantly more elastic at 20 °C than DOPC liposome membranes (L_α) which exhibited a lower value of $E = 13 \pm 9$ MPa (Figure 4A and B; $p < 0.05$). Accordingly, the liposome membranes composed of DPPC were also stiffer with $k_C = (15.5 \pm 6) \times 10^{-19}$J ($360k_BT$) than those composed of DOPC with $k_C = (0.9 \pm 0.6) \times 10^{-19}$J ($22k_BT$) (Figure 4C and D; $p < 0.05$). To verify that electrostatic repulsion was not implicated in the force curves near the contact point, we compared the results acquired on DPPC liposomes with varying surface charge, taken as the zeta potential and measured as described in Makino et al.[53] The DPPC liposomes were positively charged with a zeta potential of 18 mV in PIPES buffer (ionic strength $I = 0.09$); and barely charged with a zeta potential of 0.11 mV in PBS buffer (14 mM KH_2PO_4, 200 mM Na_2HPO_4, NaCl 1.36 M, KCl 20 mM; $I = 1.99$; pH = 7.2). The Young's modulus showed a mean value of $E = 120 \pm 39$ MPa in PBS buffer and no significant difference was found between the Young moduli values obtained in the two buffers ($p > 0.05$). This result showed that force measurement of DPPC membrane was not influenced by electrostatic interaction between the AFM probe and the liposomes.

The Young modulus was also estimated using the R_c of the whole liposome, which involves the two parameters H and W (eq A.1). The results showed that the elasticity of DPPC was higher (183 MPa) than that obtained by local R_c (116 MPa), whereas E was not significantly changed for DOPC. With either methods of R_c calculation, the results therefore showed that AFM indentation was able to detect significant differences in the elasticities of the two membranes depending on their fluid or gel phase state. However, the quantification of the mechanical properties was found very sensitive to calculation of R_c and to the liposome geometry. For these reasons, we

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

chose to compare the liposomes using the method based on the local R_c using Gwyddion in order to avoid any effect due to the form adopted by the liposomes upon adsorption.

In conclusion, the structural differences between the fluid-phase DOPC and gel-phase DPPC bilayers as evidenced by DSC and XRD, induced by the unsaturation of the acyl chains (Figure 1), resulted in significant difference in their respective mechanical responses. Hence, AFM force spectroscopy proved a sensitive method to compare the mechanical properties of small liposomes with different lipid compositions and phase states. Only few reports exist that have evaluated these mechanical parameters for similar systems of lipid membrane in 3D, especially for DOPC or DPPC using AFM spectroscopy (Table 2). Of all these studies, only Liang et al.[21] used AFM spectroscopy comparatively, on liposomes with increasing addition of cholesterol. Liang et al.[21] obtained Young's modulus of 1.97 ± 0.75 MPa, for liposomes in the fluid phase composed of egg PC (mixture of saturated and unsaturated polar lipids; mostly in the form of SOPC, stearoyl-oleoyl-phosphatidylcholine). Using an optical method, Meleard et al.[54] and Duwe and Sackmann[55] respectively obtained bending rigidities of 1.27 ± 0.09 × 10^{-19} J ($31k_BT$) or 1.15 × 10^{-19} J ($28k_BT$) for liposomes composed of the saturated polar lipid DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) in fluid phase at 40 °C (T_m = 24 °C). Rawicz et al.[45] found values of ~0.9 × 10^{-19} J for bilayers of various synthetic 18:1 phospholipids. Another group, Hantz et al.[56] used the osmotic swelling method and found values of the Young's modulus of 15 MPa for DOPC liposomes in the fluid phase at 20 °C. Delorme and Fery[16] obtained Young's moduli values of 110 ± 15 MPa for DPPC liposomes in the gel phase. Taking only account of the phase state conditions, the values available in the literature (Table 2) are in the same order of magnitude in comparison to the results showed in this work. Differences between studies could be attributed mainly to the nature of the lipids (carbon chain length, number of unsaturation), the temperature, the chosen technique or, for indentation studies, the mathematical model chosen for the calculation of R_c or E.[57,58] The presented results show that AFM indentation of liposome is a sensible method for comparison between different lipid membranes.

For the sake of comparison with the SUV (tridimensional organization), the elasticity of DPPC or DOPC membranes was calculated on the SLB (two-dimensional organization) using AFM load curves performed in the same conditions as for the breakthrough force measurement. Only a larger MLCT probe was used for better sensibility. By attempting the fit of eq 5, the Young's moduli (noted E_{SLB}) and bending modulus (noted k_{C-SLB}) were calculated using the classical Hertz model:

$$F = \frac{4E_{SLB}\sqrt{R_{tip}}\,\delta^{3/2}}{3(1-\nu^2)} \quad \text{or} \quad E_{SLB} = \frac{3}{4}\frac{k(1-\nu^2)}{\sqrt{R_{tip}\delta}} \tag{5}$$

For which corresponds a bending modulus:

$$k_{C-SLB} = \frac{E_{SLB}\delta^3}{24(1-\nu^2)} \tag{6}$$

where the parameters are the same already cited for liposome membranes. In these equations, δ is the indentation distance and R_{tip} is the nominal radius of AFM MLCT tip (~20 nm).

The use of contact mechanics using the Hertz model on SLB is limited by the effect of confinement of the sample between the tip and the underlying substrate.[59,60] Furthermore, lipid bilayers are not anisotropic materials. However, previous investigations suggested that this calculation yet has comparative interest.[25,61] On SLBs, the Young modulus (E) of DOPC was found to be 27 ± 8 MPa with a corresponding bending modulus k_C = (0.88 ± 0.25) × 10^{-19} J, while the E and k_C of DPPC were found to be 31 ± 12 MPa and (2.03 ± 0.79) × 10^{-19} J, respectively. Therefore, the E and k_C parameters of DPPC and DOPC were less distinct when measured on SLB than on SUV (Table 2). Meanwhile, more dispersed E values were reported in the literature for SLBs than for liposomes, thereby indicating the higher sensitivity of this measurement upon experimental conditions in the case of SLB[25,61,62] (Table 2). To conclude, it is showed that membranes in the gel phase were more elastic and stiffer than the membranes in fluid phase regardless the lipid organization (2D or 3D). However, the values of E and k_C were more robust when measured on liposomes than on SLBs, where the presence of the solid support affected the results depending on the indentation distance.[25] These comparisons show that liposomes are adequate systems to determine the elastic properties of lipid membranes. On the other hand, measurement of the breakthrough force is relevant for SLBs.

The structure of molecules and the intermolecular interactions that lead lipid molecules to self-assembly in bilayers, have a significant impact on the rigidity of these bilayers.[63,64] The elasticity of the membrane allows it to accommodate strain without failure, which is essential in many applications where the membrane need to resist shear stress, e.g., in transdermal application, in blood vessels, the epithelial cells of the gastrointestinal tract, etc. The hydrophobic interactions between the lipid molecules, in particular van der Waal interactions, are the major responsible of the fluidity and the rigidity of the membrane. The double bond in cis conformation interferes with hydrocarbon chain packing and destroys the cooperativity of the chain interactions in the bilayer.[65,66]

The presence of this double bonds reduces the hydrophobic interactions by increasing the distance between the hydrophobic moieties which decreases the stiffness of membrane.[45]

4. CONCLUSION

The nanoindentation of DOPC and DPPC liposomes by AFM probe at low force load was able to provide local and discriminant information on the elastic properties of bilayer membranes in 3D organization without plastic deformation. The Young's moduli E and bending rigidity values k_C of gel phase DPPC membranes is significantly higher than that of fluid phase DOPC ones at 20 °C, in agreement with their different phase state. The perspective of this work is to investigate the mechanical properties of biological membranes with complex chemical composition and fluid/gel phase coexistence. Thanks to the high lateral resolution of AFM, it is expected that phase separation and correlated nanomechanical contrast may be measured directly on model liposomes or even biological vesicles.

■ APPENDIX

The Young modulus values were also obtained using radius of curvature R_C of the whole individual liposomes. It was calculated using H and W of the individual liposomes,[67] as

$$R_C = \frac{0.25W^2 + H^2}{2H} \tag{A.1}$$

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

The mechanical data obtained from literature were expressed either as the Young modulus E, the bending rigidity k_C, or both. To complete and compare literature information in Table 2; we used the following equations to provide both parameters for each cited reference:

for liposome (shell model):

$$k_C = \frac{Ed^3}{12(1-\nu^2)} \Rightarrow E = \frac{12(1-\nu^2)k_C}{d^3} = \frac{9k_C}{d^3} \quad (A.2)$$

for supported lipid bilayer (Hertz model):

$$k_{C-SLB} = \frac{E_{SLB}d^3}{24(1-\nu^2)} \Rightarrow E_{SLB} = \frac{24(1-\nu^2)k_{C-SLB}}{d^3} = \frac{18k_{C-SLB}}{d^3} \quad (A.3)$$

where E is the Young modulus, k_C is the bending rigidity, ν is the Poisson coefficient (0.5), and d is the membrane thickness.

For publications where the membrane thickness was not provided, the following values were used to calculate the elasticity or the bending rigidity: d(DMPC) = 3.6 nm (ref 44) and d(DOPC) = 3.9 nm (present work).

AUTHOR INFORMATION

ORCID

Fanny Guyomarc'h: 0000-0002-4481-5610

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The Asylum Research MFP3D-BIO atomic force microscope was funded by the European Union (FEDER), the French Ministry of Education and Research, INRA, Conseil Général 35 and Rennes Métropole. The doctoral fellowship of author Et-Thakafy was funded by INRA CEPIA and Région Bretagne under the grant ARED 8806.

REFERENCES

(1) Lasic, D. D. Novel Applications of Liposomes. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 307−321.

(2) Liu, W.; Ye, A.; Liu, C.; Liu, W.; Singh, H. Structure and Integrity of Liposomes Prepared from Milk- or Soybean-Derived Phospholipids during in Vitro Digestion. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 499−506.

(3) Théry, C.; Ostrowski, M.; Segura, E. Membrane Vesicles as Conveyors of Immune Responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 581−593.

(4) van der Meel, R.; Fens, M. H.; Vader, P.; van Solinge, W. W.; Eniola-Adefeso, O.; Schiffelers, R. M. Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems: Lessons from the Liposome Field. *J. Controlled Release* **2014**, *195*, 72−85.

(5) Chapman, D. Phase Transitions and Fluidity Characteristics of Lipids and Cell Membranes. *Q. Rev. Biophys.* **1975**, *8*, 185−235.

(6) Lipowsky, R. Remodeling of Membrane Compartments: Some Consequences of Membrane Fluidity. *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 395.

(7) Neubauer, M. P.; Poehlmann, M.; Fery, A. Microcapsule Mechanics: From Stability to Function. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *207*, 65−80.

(8) Sitterberg, J.; Özcetin, A.; Ehrhardt, C.; Bakowsky, U. Utilising Atomic Force Microscopy for the Characterisation of Nanoscale Drug Delivery Systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 2−13.

(9) Briuglia, M.-L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D. A. Influence of Cholesterol on Liposome Stability and on in Vitro Drug Release. *Drug Delivery Transl. Res.* **2015**, *5*, 231−242.

(10) Duangjit, S.; Pamornpathomkul, B.; Opanasopit, P.; Rojanarata, T.; Obata, Y.; Takayama, K.; Ngawhirunpat, T. Role of the Charge, Carbon Chain Length, and Content of Surfactant on the Skin Penetration of Meloxicam-Loaded Liposomes. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 2005.

(11) Maherani, B.; Arab-Tehrany, E.; Kheirolomoom, A.; Cleymand, F.; Linder, M. Influence of Lipid Composition on Physicochemical Properties of Nanoliposomes Encapsulating Natural Dipeptide Antioxidant L-Carnosine. *Food Chem.* **2012**, *134*, 632−640.

(12) Tokudome, Y.; Uchida, R.; Yokote, T.; Todo, H.; Hada, N.; Kon, T.; Yasuda, J.; Hayashi, H.; Hashimoto, F.; Sugibayashi, K. Effect of Topically Applied Sphingomyelin-Based Liposomes on the Ceramide Level in a Three-Dimensional Cultured Human Skin Model. *J. Liposome Res.* **2010**, *20*, 49−54.

(13) Yoshimoto, M.; Todaka, Y. Phase Transitioninduced Rapid Permeabilization of Liposome Membranes Composed of Milk-sphingomyelin. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 226−231.

(14) Inoue, K. Permeability Properties of Liposomes Prepared from Dipalmitoyllecithin, Dimyristoyllecithin, Egg Lecithin, Rat Liver Lecithin and Beef Brain Sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1974**, *339*, 390−402.

(15) Calò, A.; Reguera, D.; Oncins, G.; Persuy, M.-A.; Sanz, G.; Lobasso, S.; Corcelli, A.; Pajot-Augy, E.; Gomila, G. Force Measurements on Natural Membrane Nanovesicles Reveal a Composition-Independent, High Young's Modulus. *Nanoscale* **2014**, *6*, 2275−2285.

(16) Delorme, N.; Fery, A. Direct Method to Study Membrane Rigidity of Small Vesicles Based on Atomic Force Microscope Force Spectroscopy. *Phys. Rev. E* **2006**, *74*, 030901.

(17) Laney, D. E.; Garcia, R. A.; Parsons, S. M.; Hansma, H. G. Changes in the Elastic Properties of Cholinergic Synaptic Vesicles as Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 806.

(18) Li, S.; Eghiaian, F.; Sieben, C.; Herrmann, A.; Schaap, I. A. Bending and Puncturing the Influenza Lipid Envelope. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 637−645.

(19) Liang, X.; Mao, G.; Simon Ng, K. Probing Small Unilamellar EggPC Vesicles on Mica Surface by Atomic Force Microscopy. *Colloids Surf., B* **2004**, *34*, 41−51.

(20) Ramachandran, S.; Quist, A. P.; Kumar, S.; Lal, R. Cisplatin Nanoliposomes for Cancer Therapy: AFM and Fluorescence Imaging of Cisplatin Encapsulation, Stability, Cellular Uptake, and Toxicity. *Langmuir* **2006**, *22*, 8156−8162.

(21) Liang, X.; Mao, G.; Ng, K. Y. S. Mechanical Properties and Stability Measurement of Cholesterol-Containing Liposome on Mica by Atomic Force Microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *278*, 53−62.

(22) Benesch, M. G.; McElhaney, R. N. A Comparative Calorimetric Study of the Effects of Cholesterol and the Plant Sterols Campesterol and Brassicasterol on the Thermotropic Phase Behavior of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer Membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838*, 1941−1949.

(23) Redondo-Morata, L.; Giannotti, M. I.; Sanz, F. Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study. *Langmuir* **2012**, *28*, 12851−12860.

(24) Garcia-Manyes, S.; Sanz, F. Nanomechanics of Lipid Bilayers by Force Spectroscopy with AFM: A Perspective. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 741−749.

(25) Picas, L.; Rico, F.; Scheuring, S. Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers. *Biophys. J.* **2012**, *102*, L01−L03.

(26) Ahmed, S.; Nikolov, Z.; Wunder, S. L. Effect of Curvature on Nanoparticle Supported Lipid Bilayers Investigated by Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13181−13190.

(27) Marbella, L. E.; Yin, B.; Spence, M. M. Investigating the Order Parameters of Saturated Lipid Molecules under Various Curvature Conditions on Spherical Supported Lipid Bilayers. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4194−4202.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

(28) Sorkin, R.; Dror, Y.; Kampf, N.; Klein, J. Mechanical Stability and Lubrication by Phosphatidylcholine Boundary Layers in the Vesicular and in the Extended Lamellar Phases. *Langmuir* **2014**, *30*, 5005−5014.
(29) Buchner Santos, E.; Morris, J. K.; Glynos, E.; Sboros, V.; Koutsos, V. Nanomechanical Properties of Phospholipid Microbubbles. *Langmuir* **2012**, *28*, 5753−5760.
(30) Prenner, E.; Chiu, M. Differential Scanning Calorimetry: An Invaluable Tool for a Detailed Thermodynamic Characterization of Macromolecules and Their Interactions. *J. Pharm. BioAllied Sci.* **2011**, *3*, 39.
(31) Bizien, T.; Ameline, J.-C.; Yager, K. G.; Marchi, V.; Artzner, F. Self-Organization of Quantum Rods Induced by Lipid Membrane Corrugations. *Langmuir* **2015**, *31*, 12148−12154.
(32) Blanton, T.; Barnes, C.; Lelental, M. Preparation of Silver Behenate Coatings to Provide Low-to Mid-Angle Diffraction Calibration. *J. Appl. Crystallogr.* **2000**, *33*, 172−173.
(33) Gaillard, C.; Douliez, J.-P. Cryo-TEM and AFM for the Characterization of Vesicle-like Nanoparticle Dispersions and Self-Assembled Supramolecular Fatty-Acid-Based Structures: A Few Examples. *Curr. Microsc. Contrib. Adv. Sci. Technol.* **2012**, *5*, 912−922.
(34) Murthy, A. V. R.; Guyomarc'h, F.; Lopez, C. Cholesterol Decreases the Size and the Mechanical Resistance to Rupture of Sphingomyelin Rich Domains, in Lipid Bilayers Studied as a Model of the Milk Fat Globule Membrane. *Langmuir* **2016**, *32*, 6757−6765.
(35) Fa, N.; Ronkart, S.; Schanck, A.; Deleu, M.; Gaigneaux, A.; Goormaghtigh, E.; Mingeot-Leclercq, M.-P. Effect of the Antibiotic Azithromycin on Thermotropic Behavior of DOPC or DPPC Bilayers. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *144*, 108−116.
(36) Fritzsching, K. J.; Kim, J.; Holland, G. P. Probing Lipid−cholesterol Interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPC/Chol Model Lipid Rafts with DSC and 13C Solid-State NMR. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2013**, *1828*, 1889−1898.
(37) Grabielle-Madelmont, C.; Perron, R. Calorimetric Studies on Phospholipid—water Systems: I. Dl-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)—water System. *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, *95*, 471−482.
(38) Boni, L. T.; Minchey, S. R.; Perkins, W. R.; Ahl, P. L.; Slater, J. L.; Tate, M. W.; Gruner, S. M.; Janoff, A. S. Curvature Dependent Induction of the Interdigitated Gel Phase in DPPC Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1993**, *1146*, 247−257.
(39) Kuntsche, J.; Horst, J. C.; Bunjes, H. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) for Studying the Morphology of Colloidal Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 120−137.
(40) Colas, J.-C.; Shi, W.; Rao, V. M.; Omri, A.; Mozafari, M. R.; Singh, H. Microscopical Investigations of Nisin-Loaded Nanoliposomes Prepared by Mozafari Method and Their Bacterial Targeting. *Micron* **2007**, *38*, 841−847.
(41) Guyomarc'h, F.; Zou, S.; Chen, M.; Milhiet, P.-E.; Godefroy, C.; Vié, V.; Lopez, C. Milk Sphingomyelin Domains in Biomimetic Membranes and the Role of Cholesterol: Morphology and Nanomechanical Properties Investigated Using AFM and Force Spectroscopy. *Langmuir* **2014**, *30*, 6516−6524.
(42) Murthy, A. V. R.; Guyomarc'h, F.; Lopez, C. The Temperature-Dependent Physical State of Polar Lipids and Their Miscibility Impact the Topography and Mechanical Properties of Bilayer Models of the Milk Fat Globule Membrane. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2016**, *1858*, 2181−2190.
(43) Leonenko, Z. V.; Finot, E.; Ma, H.; Dahms, T. E. S.; Cramb, D. T. Investigation of Temperature-Induced Phase Transitions in DOPC and DPPC Phospholipid Bilayers Using Temperature-Controlled Scanning Force Microscopy. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3783−3793.
(44) Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S. Structure of Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **2000**, *1469*, 159−195.
(45) Rawicz, W.; Olbrich, K.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 328−339.
(46) Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. Effect of Temperature on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 4261−4274.
(47) Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. Force Spectroscopy Reveals the Effect of Different Ions in the Nanomechanical Behavior of Phospholipid Model Membranes: The Case of Potassium Cation. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 66−74.
(48) Jacquot, A.; Francius, G.; Razafitianamaharavo, A.; Dehghani, F.; Tamayol, A.; Linder, M.; Arab-Tehrany, E. Morphological and Physical Analysis of Natural Phospholipids-Based Biomembranes. *PLoS One* **2014**, *9*, e107435.
(49) Reissner, E. Note on the Membrane Theory of Shell of Revolution. *J. Math. Phys.* **1947**, *26*, 290−293.
(50) Fery, A.; Weinkamer, R. Mechanical Properties of Micro- and Nanocapsules: Single-Capsule Measurements. *Polymer* **2007**, *48*, 7221−7235.
(51) Glaubitz, M.; Medvedev, N.; Pussak, D.; Hartmann, L.; Schmidt, S.; Helm, C. A.; Delcea, M. A Novel Contact Model for AFM Indentation Experiments on Soft Spherical Cell-like Particles. *Soft Matter* **2014**, *10*, 6732.
(52) Berry, J. D.; Mettu, S.; Dagastine, R. R. Precise Measurements of Capsule Mechanical Properties Using Indentation. *Soft Matter* **2017**, *13*, 1943−1947.
(53) Makino, K.; Yamada, T.; Kimura, M.; Oka, T.; Ohshima, H.; Kondo, T. Temperature-and Ionic Strength-Induced Conformational Changes in the Lipid Head Group Region of Liposomes as Suggested by Zeta Potential Data. *Biophys. Chem.* **1991**, *41*, 175−183.
(54) Meleard, P.; Gerbeaud, C.; Pott, T.; Fernandez-Puente, L.; Bivas, I.; Mitov, M. D.; Dufourcq, J.; Bothorel, P. Bending Elasticities of Model Membranes: Influences of Temperature and Sterol Content. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2616.
(55) Duwe, H.; Sackmann, E. Bending Elasticity and Thermal Excitations of Lipid Bilayer Vesicles: Modulation by Solutes. *Phys. A* **1990**, *163*, 410−428.
(56) Hantz, E.; Cao, A.; Escaig, J.; Taillandier, E. The Osmotic Response of Large Unilamellar Vesicles Studied by Quasielastic Light Scattering. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1986**, *862*, 379−386.
(57) Brochu, H.; Vermette, P. Young's Moduli of Surface-Bound Liposomes by Atomic Force Microscopy Force Measurements. *Langmuir* **2008**, *24*, 2009−2014.
(58) Dieluweit, S.; Csiszár, A.; Rubner, W.; Fleischhauer, J.; Houben, S.; Merkel, R. Mechanical Properties of Bare and Protein-Coated Giant Unilamellar Phospholipid Vesicles. A Comparative Study of Micropipet Aspiration and Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2010**, *26*, 11041−11049.
(59) Dimitriadis, E. K.; Horkay, F.; Maresca, J.; Kachar, B.; Chadwick, R. S. Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2798−2810.
(60) Shull, K. R. Contact Mechanics and the Adhesion of Soft Solids. *Mater. Sci. Eng., R* **2002**, *36*, 1−45.
(61) Sullan, R. M. A.; Li, J. K.; Zou, S. Direct Correlation of Structures and Nanomechanical Properties of Multicomponent Lipid Bilayers. *Langmuir* **2009**, *25*, 7471−7477.
(62) Li, J. K.; Sullan, R. M. A.; Zou, S. Atomic Force Microscopy Force Mapping in the Study of Supported Lipid Bilayers. *Langmuir* **2011**, *27*, 1308−1313.
(63) Marsh, D. Elastic Curvature Constants of Lipid Monolayers and Bilayers. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *144*, 146−159.
(64) Niggemann, G.; Kummrow, M.; Helfrich, W. The Bending Rigidity of Phosphatidylcholine Bilayers: Dependences on Experimental Method, Sample Cell Sealing and Temperature. *J. Phys. II* **1995**, *5*, 413−425.
(65) Boggs, J. M. Intermolecular Hydrogen Bonding between Lipids: Influence on Organization and Function of Lipids in Membranes. *Can. J. Biochem.* **1980**, *58*, 755−770.
(66) Slotte, J. P. The Importance of Hydrogen Bonding in Sphingomyelin's Membrane Interactions with Co-Lipids. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2016**, *1858*, 304−310.
(67) Chen, Q.; Vancso, G. J. pH Dependent Elasticity of Polystyrene-Block-Poly(acrylic Acid) Vesicle Shell Membranes by Atomic Force Microscopy. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1704−1709.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00363
Langmuir 2017, 33, 5117−5126

7.3. Article 4: Propriétés élastiques de bicouches de sphingomyéline du lait (milk SM) en phase gel: effets de l'hétérogénéité de la composition naturelle en longueur et saturation des chaînes acyles, étudiée par indentation de liposomes par AFM

Mechanical properties of milk sphingomyelin bilayer membrane in the gel phase: effects of naturally complex heterogeneity, saturation and acyl chain length investigated on liposomes using AFM

Oumaima Et-Thakafy [a], Nicolas Delorme [b], Fanny Guyomarc'h [a], Christelle Lopez [a, *]

[a] STLO, UMR1253, INRA, Agrocampus Ouest, 35000, Rennes, France

[b] UMR6283, CNRS, Institut des Molécules et Matériaux du Mans, Le Mans Université, Université Bretagne-Loire, 72000 Le Mans, France

*Corresponding author: Christelle LOPEZ

Submitted article to *chemisrty and physics of lipids* journal on 31/08/2017.

Abstract

Sphingomyelin (SM) molecules are major lipid components of plasma membranes that are involved in functional domains. Among natural SMs, that found in milk (milk SM) exhibits important acyl chain heterogeneities in terms of length and saturation, which could affect the biophysical properties and biological functions of the milk fat globule membrane or of liposome carriers. In this study, the thermotropic and mechanical properties of milk SM, synthetic C16:0-SM, C24:0-SM and the binary mixtures C16:0-SM/C24:0-SM (50:50 % mol) and C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol) bilayer membranes were investigated using differential scanning calorimetry and atomic force microscopy, respectively. Results showed that acyl chain length, heterogeneity and unsaturation affected i) the temperature of phase transition of SM bilayers, and ii) the mechanical properties of liposome (diameter < 200 nm) membranes in the gel phase, e.g. the Young modulus E and the bending rigidity k_C. This study increases our knowledge about the key role of naturally complex lipid compositions in tailoring the physical properties of biological membranes. It could be also used in liposomes development e.g. to select the suitable lipid composition according to usage.

Keywords: lipid membrane, sphingolipid, liposome, atomic force microscopy, Young modulus, acyl chain length asymmetry

1. Introduction

Biological membranes are composed of a plethora of lipid molecular species (e.g. glycerophospholipids, sphingolipids, cholesterol) organized as bilayers in which proteins are inserted. Sphingolipids are a complex group of polar lipids, among which sphingomyelin (SM) molecules are of increasing interest (Slotte, 2016, 2013). As a major constituent of mammal cell plasma membranes, SM molecules are found at particularly high concentrations in the myelin sheaths of nerve cells, in brain, eye lens and red blood cells (Maté et al., 2014; Slotte, 2013). SM is also present in membranes from egg and milk. Compared to other membrane lipids, the typical properties of SM molecules are their asymmetric molecular structure and their extensive hydrogen-bonding capacity (Slotte, 2016). They exhibit a gel to liquid-disordered phase transition temperature close to physiological temperatures (Filippov et al., 2006) and generate domains in the membrane bilayer (Simons and Vaz, 2004). Together with other sphingolipids, SM also have an important functional role as precursors of sphingolipid signalling molecules, i.e. ceramides and other sphingolipid metabolites (Duan et al., 1995; Stancevic and Kolesnick, 2010). The role of SM molecular diversity in the domain formation and stabilization, in the mechanical properties of membranes and biological significance is not completely understood. Authors reported that asymmetric phospholipids exhibited lower bending or stretching moduli than their symmetric counterparts (Ali et al., 1998; Rawicz et al., 2000). Maté and coworkers furthermore showed that the nature of the acyl chains of SM affected the rupture force of model membranes and domain formation (Maté et al., 2014). Further investigations are required to better understand the relation between the complex chemical composition of natural SMs and the mechanical properties of membranes.

Among natural SMs, those found in milk have raised specific attention for the last decade since it is edible, biocompatible, and has been reported to provide interesting nutritional and health benefits (Duan, 2005; Zanabria et al., 2013). Milk SM is located in the biological membrane surrounding the fat globules (called the milk fat globule membrane, MFGM) and in the plasma membrane of the lactating mammary cells from which the MFGM originates (Heid and Keenan, 2005; Keenan et al., 1970). Structural investigations performed by confocal laser scanning microscopy revealed the formation of milk SM rich microdomains in the MFGM surrounding fat globules in milks (Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2010; Lopez and Ménard, 2011; Nguyen et al., 2015; Zou et al., 2015; Gallier et al., 2015; Et-Thakafy et al., 2017b). Experiments performed at the nanoscale using atomic force microscopy (AFM) on supported planar lipid bilayers showed that these SM-rich domains have a higher resistance to rupture than the surrounding fluid phase

composed of unsaturated polar lipids (Murthy et al., 2016a). AFM imaging studies also reported that the complex composition of milk SM molecular species leads to gel-gel phase separation in the plane of the membrane (Guyomarc'h et al., 2014, 2017). The way the different molecular species of milk SM accommodate in the gel phase could affect the mechanical properties of the membrane, the physical stability of milk fat globules, and could be involved in biological functions (e.g. insertion of proteins in the SM-rich domains, hydrolysis by enzymes such as sphingomyelinases). The relationship between the complex chemical composition of milk-SM, its thermotropic behaviour and its mechanical properties in membranes could also affect the properties of delivery systems such as liposomes prepared with milk SM alone (Yoshimoto and Todaka, 2014) or in mixture with the whole milk polar lipids from the MFGM (Thompson and Singh, 2006), for food, cosmetic or pharmaceutical applications. However, little is known on the relationship between the heterogeneous chemical composition of milk SM membranes and their mechanical properties.

In addition to allow imaging, AFM has proven to be an adapted method to investigate by force spectroscopy the mechanical properties of supported planar membranes at the nanoscale (Maté et al., 2014; Sullan et al., 2009; Murthy et al., 2016b, 2016a). However, determination of the membrane elasticity using AFM requires careful and narrow experimental conditions not to be affected by the support (Jacquot et al., 2014; Et-Thakafy et al., 2017a). Moreover, measurement of the mechanical properties of bilayers are especially relevant on volumetric objects, such as liposomes, to take curvature of the membrane into account (Et-Thakafy et al., 2017a). So far, the mechanical properties of bilayer membranes organized as three dimensional liposomes were mostly investigated for single phospholipid compositions (Delorme and Fery, 2006; Hantz et al., 1986; Liang et al., 2004a, 2004b). It was recently showed that AFM is able to provide discriminant information on the elastic properties of curved membranes by comparing liposomes of unsaturated or saturated phospholipids in the fluid or gel phases respectively (Et-Thakafy et al., 2017a, Takechi-Haraya et al., 2016), thus opening perspectives for more detailed investigation.

The objectives of this paper were therefore to investigate the thermal and mechanical properties of SM-containing membranes, to determine the Young modulus E and the bending rigidity k_C of milk SM liposome membranes in the gel phase and to examine the effect of the complexity of the individual SM molecular species, i.e. heterogeneities in acyl chain length, composition or unsaturation. Our strategy was to measure, using AFM force spectroscopy, the indentation of liposome membranes composed of the complex but natural milk-SM, synthetic SM

molecules and binary mixtures of synthetic SM molecules (i.e. saturated acyl chains with various lengths: C16:0-SM/C24:0-SM; saturated and unsaturated acyl chains: C24:0-SM/C24:1-SM).

2. Experimental

2.1. Materials

Sphingomyelin from bovine milk (milk-SM, purity > 99%) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Milk SM has a complex chemical composition, with variations of both the acyl chain on the C1 and on the long-chain sphingoid base on the C2 (**Fig. 1A**). The majority (~44% wt.) of the long chain sphingoid base is a 18-carbon sphingosine that carries one *trans* double bond (Byrdwell and Perry, 2007). On the C2, the acyl chain ranges from 16 to 24 atoms of carbon with C16:0, C22:0 and C24:0 being about 20% wt each and C23:0 over 30% wt. Furthermore, there are a few % wt of mono-unsaturated C24:1. Therefore, the milk SM contains highly asymmetric chain lengths with chain mismatch that can induce interdigitation in the bilayer, as reported for C24:0-SM (Levin et al., 1985; Li et al., 2001).

The synthetic SM molecules N-palmitoyl-D-*erythro*-sphingosylphosphorylcholine (d18:1/16:0; C16:0-SM, purity > 99%), N-lignoceroyl-D-*erythro*-sphingosylphosphorylcholine (d18:1/24:0; C24:0-SM, purity > 99%), N-nervonoyl-D-*erythro*-sphingosylphosphorylcholine (d18:1/24:1; C24:1-SM, purity > 99%) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA; **Fig. 1B**). PIPES buffer (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) was prepared as follows: PIPES 10 mM (purity ≥ 99% wt; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA), NaCl 50 mM (purity ≥ 99% wt; Sigma-Aldrich), and $CaCl_2$ 10 mM (purity ≥ 99% wt; Sigma-Aldrich) were dissolved in Milli-Q water and adjusted to pH 6.7 using NaOH 5 M.

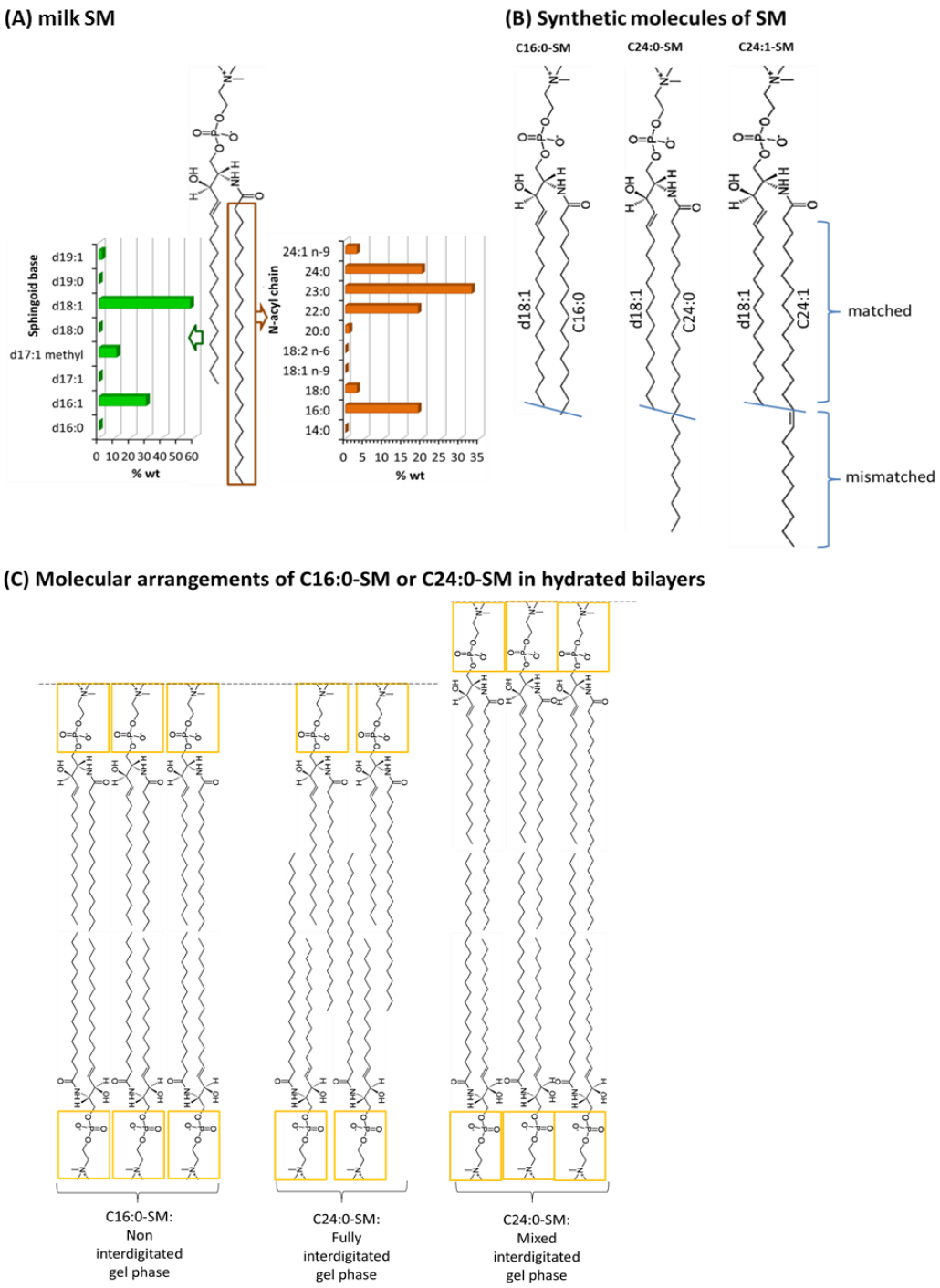


Fig. 1. (A) Structure of the milk sphingomyelin (milk SM); the left panel shows the composition of the long chain base (in green), after Byrdwell and Perry (2007); and the right panel shows the N-acyl chain composition (in orange) after the Avanti Polar Lipids web site (https://avantilipids.com). (B) Molecular structures of the synthetic palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM); lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM) and nervonoyl sphingomyelin (C24:1-SM). (C) Molecular arrangements of symmetric (C16:0-SM) or asymmetric (C24:0-SM) sphingomyelin molecules in gel-phase bilayers, showing the two possible interdigitated gel phases of the asymmetric C24:0-SM due to the mismatch between the sphingosine and the acyl chains.

2.2. Methods

2.2.1. Differential scanning calorimetry (DSC)

The lipid powders of milk-SM, C16:0-SM, C24:0-SM or C24:1-SM were dissolved in glass vials with chloroform/methanol (4:1 v/v). Appropriate stock solutions of C16:0-SM and C24:0-SM, or C24:0-SM and C24:1-SM were mixed to reach the following molar proportions: C24:0-SM/C16:0-SM (50:50 % mol) or C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol). The organic solvent was then evaporated at 50°C under a stream of dry nitrogen. The lipid films were hydrated with PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 70°C to reach a final concentration of 20 % wt lipids, and thorough vortex mixing to form multilamellar vesicles. The thermotropic properties of milk-SM, of the synthetic SM molecules C16:0-SM or C24:0-SM, and of the binary mixtures C24:0-SM/C16:0-SM (50:50 % mol) or C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol) were determined by differential scanning calorimetry (DSC) using a DSC Q1000 apparatus (TA Instruments, Newcastle, USA). The samples were introduced into 20 µL aluminum pans that were then hermetically sealed. An empty pan was used as a reference. The samples were heated at 1°C.min^{-1} from - 5°C to 80°C. The calibration of the calorimeter was performed with indium standard (melting point = 156.66°C, H melting = 28.41 J.g^{-1}). The thermal measurements were performed in triplicate. Standard parameters were calculated by the TA software (Universal Analysis 2000, v 4.1 D).

2.2.2. Preparation of liposomes

The lipid powders of milk-SM, C16:0-SM, C24:0-SM or C24:1-SM were dissolved in glass vials with chloroform/methanol (4:1 v/v). Appropriate stock solutions of C16:0-SM and C24:0-SM or of C24:0-SM and C24:1-SM were mixed to reach the following molar proportions C24:0-SM/C16:0-SM (50:50 % mol) or C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol). The organic solvent was then evaporated at 50°C under a stream of dry nitrogen. The dried lipid films were hydrated with PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 70°C to reach a final concentration of 0.1 % wt lipids then thoroughly vortexed. Small unilamellar vesicles (SUV) were produced at 65°C by sonication using a Q700 equipment (Q-sonica, Newtown, CT, USA) and a micro tip operating at 50% amplitude (~400 W) for 30 min. After sonication, the SUV suspension was left to cool and equilibrate at room temperature (20°C). The SUV produced according to this protocol will be designated as “liposomes” throughout this report.

2.2.3. Dynamic light scattering (DLS)

The size distribution and the average hydrodynamic diameter (Dh) of the liposomes were measured in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 20°C by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Measurements were carried out at a scattering angle of 173° and a wavelength of 633 nm. The average Dh (± 5 nm) was calculated

from the intensity distribution using the Stokes-Einstein relation and assuming that particles had a spherical shape. The viscosity of the solution was 1.003 mPa.s at 20°C. The refractive index of the solvent was 1.33. The DLS measurements were performed in triplicate.

2.2.4. Atomic force microscopy (AFM) imaging and force spectroscopy

2.2.4.1. Imaging and indentation of liposomes

Simple open liquid sample cells were fabricated by gluing small (~0.5 × 1 cm^2) pieces of silicon substrate (molecular orientation 100) onto diagnostic glass slides (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After thorough cleaning of the cell with ethanol, water and UV/O_3, the liposome suspension at 20°C was deposited onto the clean silicon surface then left to incubate at 20°C for 30 min. The droplet was then gently exchanged with PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 20°C to remove the un-adsorbed liposomes. The sample was then imaged in contact mode using an MFP-3D Bio AFM (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA), with a typical scan rate of 1 Hz for 20 × 20 μm^2 and 256 256 pixels images. Silicon MLCT probes (nominal spring constant *k* ~0.03 $N.m^{-1}$ – Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA, USA) were used with loading forces typically below ~1 nN. Probes were calibrated extemporaneously using the thermal noise method. When immobilized liposomes were localized, closer images (typically 2 × 2 μm^2 or less) were recorded and sections were drawn across the images in order to measure the individual liposome's height H and basal width W, hereby neglecting the tip convolution effect (tip nominal radius ~20 nm).

As previously performed (Et-Thakafy et al., 2017a), the volume V of the adsorbed liposomes was calculated as:

From which the mean diameter D of a sphere of equivalent volume was determined as:

The AFM probe was then positioned above the center of each liposome and individual force curves (n > 80) were recorded with a piezo speed of 2 $\mu m.s^{-1}$, over 100 nm distance and with a set point of 200 pN maximal force in order to determine the elastic behavior of the membranes while limiting their plastic deformation. In these conditions, indentation of the AFM tip into the liposome did not exceed ~6 nm.

2.2.4.2. Calculation of the Young modulus E and the bending rigidity k_C

The approach curves recorded by AFM were treated using the corrected thin shell theory (Berry et al., 2017; Delorme and Fery, 2006; Fery and Weinkamer, 2007; Glaubitz et al., 2014; Reissner, 1947), as described in previous work (Et-Thakafy et al., 2017a). Briefly, the equation permitting the calculation of the Young modulus E of thin-shelled spherical micro-capsule is the following:

The bilayer's stiffness k was calculated from the slope of the linear region of each force curve after the tip-membrane contact, i.e. in the small deformation region. Since k strongly depends on the size of the individual liposomes (Liang et al., 2004b), it has been normalized by the local radius of curvature R_c at the top of the individual adsorbed liposomes as already performed (Delorme and Fery, 2006; Et-Thakafy et al., 2017a). R_c was determined using the Gwyddion 2.47 software. The bilayer's thickness d was determined experimentally (see section 2.5.3.) and the Poisson ratio ν was taken as 0.5. In Equation 3, the correction factor C 0.55 was applied to take account of the double deformation of the indented liposome, as previously proposed (Berry et al., 2017; Et-Thakafy et al., 2017a). The Young modulus E is also expressed as "elasticity" throughout this report.

Using the Young modulus E values, we can also represent the mechanical properties of liposomes by the bending rigidity k_C, which is expressed in terms of the same parameters:

2.2.4.3. Measurement of the thickness of the supported lipid bilayers

Immediately after sonication at 65°C, 10 µg of each hot liposome suspension were deposited onto freshly cleaved mica in an Asylum Research open liquid cell, then incubated at this temperature for 60 min. Slow cooling of the samples was performed using a programmed incubator as in Murthy et al., (2016b) to form patches of supported planar lipid bilayers (SPLB). Once

equilibrated at 20°C, the preparations were gently and extensively rinsed with PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer to remove non-adsorbed liposomes and keep the patches of SPLB. AFM imaging of the patches of SPLB was then performed in the same PIPES buffer in contact mode using MLCT probe (nominal spring constant k ~0.07 $N.m^{-1}$ – Bruker Nano Surfaces) with the parameters cited above. All images were planefitted (0th order), masked to select the domains, flattened (1st order) then planefitted again in order to fit the surface and eliminate unwanted features from scan lines (e.g. noise, tilt). For each sample, the thickness of the bilayer (noted d) was measured from cross sections of the AFM images.

2.2.5. Statistical analysis

The results are presented as mean value ± standard deviation. Analysis of variance was performed using the General Linear Model procedure of Statgraphics Plus version 5 (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ). Differences were regarded significant for $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Thermotropic behavior of milk SM and synthetic SM bilayers

Figure 2 shows the DSC heating thermograms of the SM multilamellar vesicles recorded in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at pH 6.7. All the samples exhibited a thermotropic gel to liquid-disordered phase transition for temperatures ranging from 28 to 52°C which means that all the SM-containing bilayers were in the gel phase at 20°C (i.e. the temperature chosen for AFM measurements). Milk SM exhibited a broad and asymmetric endotherm corresponding to a gel to liquid-disordered phase transition (Shaw et al., 2012; Murthy et al., 2015) with Tm = 33°C, in agreement with previous reports (Filippov et al., 2012; Malmsten et al., 1994; Murthy et al., 2015).

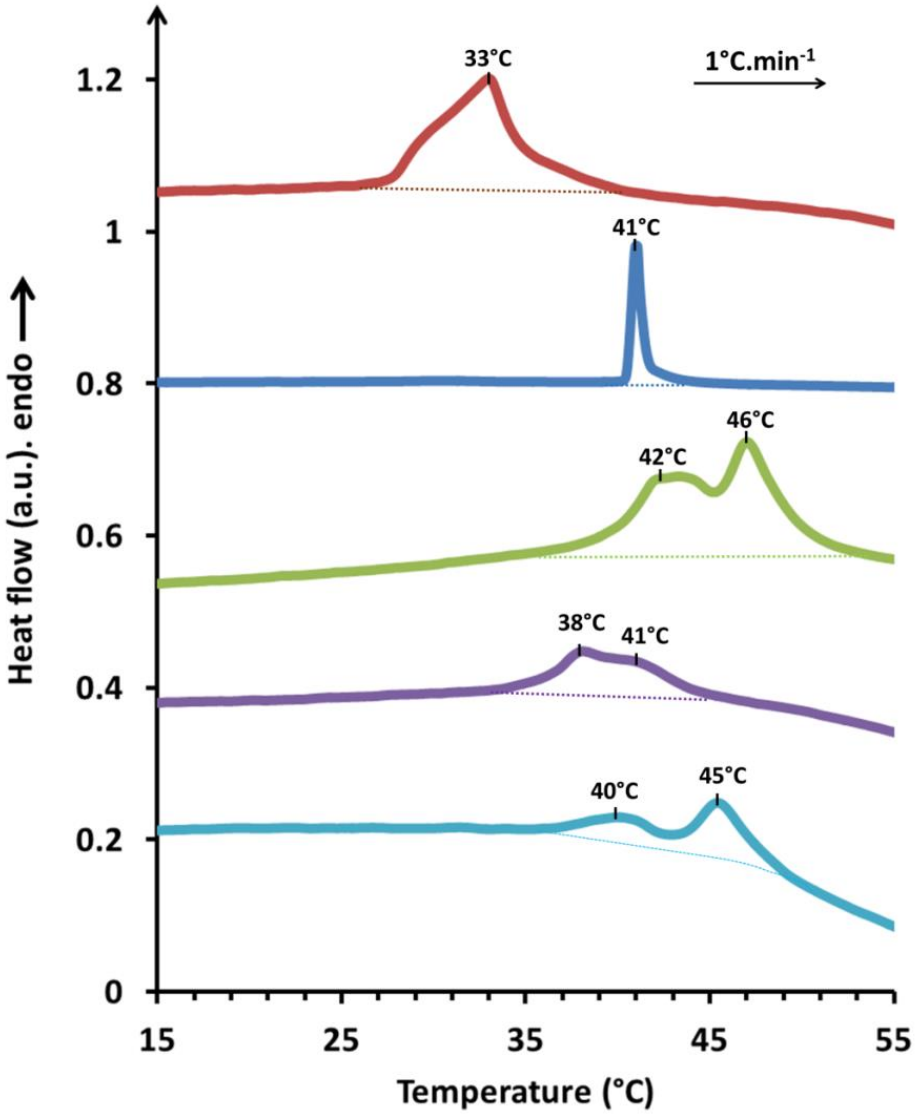


Fig. 2. Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of multilamellar vesicles prepared with milk sphingomyelin (milk-SM), palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM), lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM), their equimolar mixture C16:0-SM/C24:0-SM and the mixture of 95% mol C24:0-SM with 5% mol nervonoyl-sphingomyelin (C24:1-SM) when in the form of multilamellar vesicles in 10 mM PIPES, 50 mM NaCl and 10 mM $CaCl_2$, pH 6.7. The temperatures of the transitions of milk SM and synthetic SM liposomes are given above the respective DSC signals.

The DSC signal recorded for C16:0-SM showed a main cooperative endotherm with Tm = 41°C, in agreement with literature (Björkqvist et al., 2009; Jimenez-Rojo et al., 2014). This sharp transition results from the chemical structure of C16:0-SM molecules that exhibit sphingosine and N-acyl with similar lengths, resulting in a clear matching between the two hydrophobic moieties. The C24:0-SM bilayers exhibited 2 endotherms on heating at 42°C and 47°C (Tm), in accordance with previous studies (Björkqvist et al., 2009; Jimenez-Rojo et al., 2014). The lower Tm recorded for C16:0-SM compared to C24:0-SM means that the Tm of synthetic SM increases with the acyl chain length, as already reported (Koynova and Caffrey, 1995; Jimenez-Rojo et al., 2014).

Introduction of 50 % mol of saturated C16:0-SM had a clear effect in the signal of the pure C24:0-SM, where the two endotherms of C24:0-SM seemed to shift and converge towards lower values of 38°C and 41°C (Tm). Interestingly, the transition temperature range of the C16:0-SM/C24:0-SM mixture was lower than that of either of the two individual components, but yet higher than that of the milk-SM. This indicated a strong effect of the composition onto Tm. Meanwhile, the introduction of 5 mol% of unsaturated C24:1-SM in the C24:0-SM bilayers also induced a shift of the endotherms toward lower temperatures (i.e. T = -2°C) compared to C24:0-SM bilayers. Jimenez-Rojo et al., (2014) and Björkqvist et al., (2009) reported transition temperatures for pure C24:0-SM and C24:1-SM of ~46°C and 24°C, respectively. Both lipids exhibited complex endotherms for the gel to liquid-disordered transition, suggesting multiple gel phase organization involving tilt, hydration and partial interdigitation (Reed and Shipley, 1987; Maulik and Shipley, 1995). The unsaturated C24:1-SM melts at Tm values lower than those of its saturated counterpart, meaning a disorder in the bilayer induced by the *cis* double bond. We can conclude that the mixing of C24:0-SM with 5 % mol C24:1-SM induced a disorder in the bilayer that affected the thermotropic properties of the C24:0-SM, i.e. lowering of the temperatures of phase transition.

Altogether, the DSC thermograms showed asymmetric and complex signals, except for the C16:0-SM. These results suggested that mixture of various SM molecules, with different chain lengths and/or unsaturation, was responsible for the lower Tm value determined for milk SM layers compared to the other systems (**Fig. 2**).

3.2. Morphology of the liposomes

The vesicles formed by sonication in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at pH 6.7 were unilamellar (results not shown), as previously reported on DOPC and DPPC using the same protocol (Et-Thakafy et al., 2017a). The mean diameter D_h of the liposomes prepared by sonication and measured by DLS showed values ranging from 95 to 136 nm depending on composition (**Table 1**), in agreement with previous results on DOPC or DPPC. The smallest diameter was obtained for C16:0-SM liposomes, while all liposomes that contained C24:0-SM had D_h ~ 120 nm, possibly as a result of the length and asymmetry of the latter molecule, which may hinder compact packing and curvature. Diameter distributions in binary mixtures were monomodal, thus indicating that lipids did not part into distinct vesicles.

Table 1. Geometric parameters of the milk SM or synthetic SMs liposomes. The mean diameter (Dh – 1st column) is measured on suspensions of liposomes using dynamic light scattering (DLS). The height (H) and width (W – 3rd and 4th columns) are the average dimensions of individual liposomes adsorbed onto silicon substrate, measured using cross sections of atomic force microscopy (AFM) images at 20°C. The equivalent mean diameter D (2nd column) was calculated from that of the sphere of equivalent volume to that of the spherical cap formed by the adsorbed liposomes, using W and H.

Sample	DLS	AFM		
	Mean diameter D_h (nm)	Equivalent Mean Diameter D (nm)	Height H (nm)	Width W (nm)
Milk SM	119 ± 58	185 ± 24	99 ± 53	560 ± 290
C16:0-SM	95± 59	225 ± 68	81 ± 36	426 ± 100
C24:0-SM	119 ± 65	302 ± 27	93 ± 41	627 ± 300
C24:0-SM/C16:0-SM (50:50%mol)	122 ± 77	266 ± 90	92 ± 38	521 ± 243
C24:0-SM/C24:1-SM (95:5%mol)	136 ± 75	134 ± 32	71± 22	198 ±40

AFM imaging was used to measure the average height H and basal width W of the liposomes adsorbed onto the substrate (**Table 1**), and to calculate the mean diameter D of spheres of equivalent volume. The high width W of the adsorbed liposomes compared to their height H revealed that the liposomes deformed into spherical cap geometry upon adsorption onto the flat silicon surface, in agreement with previous reports (Liang et al., 2004b; Colas et al., 2007; Et-Thakafy et al., 2017a). The mean diameter D of the adsorbed liposomes calculated from the AFM images was somewhat larger but yet belonged to the size distribution of liposomes determined by DLS (D_h values) after SUV formation (**Table 1**). This difference may be due to the fact that larger individual liposomes were preferably chosen out of large-area images to perform close-up views and indentation measurement, while DLS considered a large number of liposomes, as previously discussed (Et-Thakafy et al., 2017a). These results indicate that liposomes adsorbed individually onto silicon, without aggregation nor coalescence.

3.3.1. Bilayer thickness of milk SM and synthetic SM molecules

The lipid bilayer thickness d is an important parameter involved in the determination of the Young modulus E of membranes using the shell theory (see section 2.5.2.). In a first set of

experiments, the thickness d of bilayers formed by milk SM, by the synthetic SMs C16:0-SM or C24:0-SM, and by the binary mixtures C16:0-SM/C24:0-SM (50:50 % mol) or C24:0/C24:1-SM (95:5 % mol) were determined. **Figure 3** shows AFM images of the supported planar lipid bilayers (SPLB) patches of SM bilayers at 20°C in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at pH=6.7. This experimental temperature was below the phase transition temperatures of the SM samples (i.e. milk SM and synthetic SM) determined by DSC (**Fig. 2**) and then, all the supported planar SM bilayers were regarded as being in the gel phase. AFM topography images allowed the determination of the average value of the thickness d of each type of bilayer in the gel phase, calculated as the height difference between the surface of the substrate and the surface of the bilayer patch (**Fig. 3;** n = 29 measurements on 5-10 patches over 2-5 images).

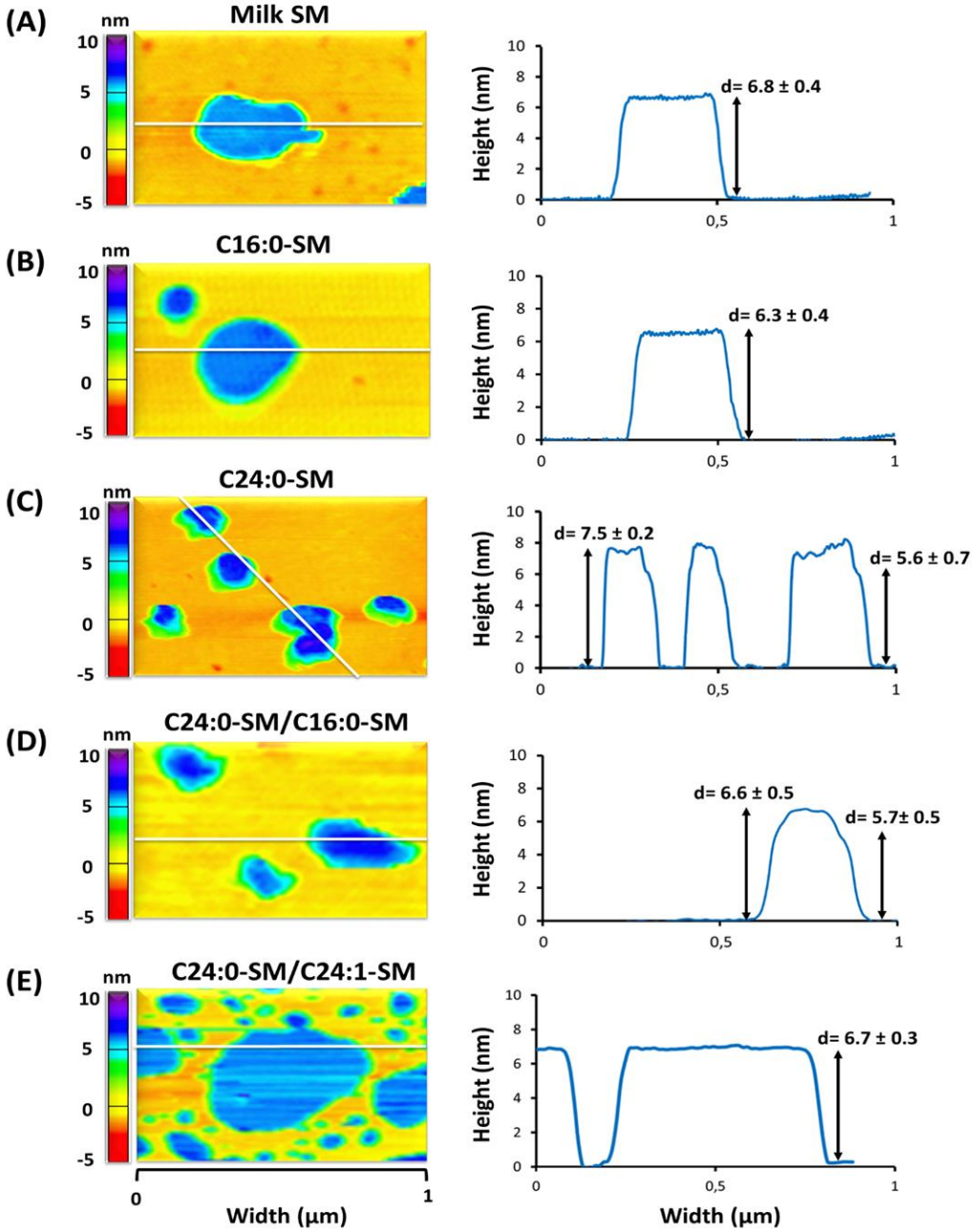


Fig. 3. Typical AFM images and the corresponding cross sections profiles of bilayer patches of: **(A)** milk sphingomyelin (Milk SM), **(B)** palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM), **(C)** lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM), **(D)** C24:0-SM/C16:0-SM 50:50 mol:mol and **(E)** C24:0-SM/ nervonoyl-sphingomyelin (C24:1-SM) 95:5 mol:mol. The value d of the bilayers thickness is measured as showed on the right panel on various regions of the images for three different samples (n=29), in aqueous PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at pH = 6.7 and at 20°C. The calculated average value of d is indicated on the figure.

For milk SM bilayers, a bilayer thickness of d_{milkSM} = 6.8 0.4 nm was determined, which is coherent with the 7.3 nm layer spacing (i.e. involving inter-layer distance) previously reported for multilamellar vesicles of milk SM using small angle X-ray diffraction (Shaw et al., 2012). The bilayer thickness determined for C16:0-SM was $d_{C16:0\text{-}SM}$ = 6.3 0.4 nm. In C24:0-SM bilayers

(**Fig. 3)**, two thicknesses of $d_{C24:0\text{-}SM}$ = 5.6 ± 0.7 nm and $d_{C24:0\text{-}SM}$ = 7.5 0.3 nm were observed. Using X-ray scattering, a periodicity of 73.5 or 71.1 Å was found for hydrated C16:0 bilayers at 29°C or C24:0-SM bilayers at 22°C, respectively (Maulik and Shipley, 1995, 1996). As previously reported (Guyomarc'h et al., 2017), the two thicknesses of C24:0-SM bilayers were respectively interpreted as the full and mixed interdigitated organization of the C24:0-SM molecules, due the length mismatch between the d18:1 sphingosine and the N-acyl chain lengths (**Fig 1**). In the binary system C16:0-SM/C24:0-SM (50:50 % mol), local variations of the thickness the bilayer were observed and attributed to distinct chain lengths and interdigitation. The lower thickness allow $d_{C16:0\text{-}SM/C24:0\text{-}SM}$ = 5.7 0.5 nm may correspond to a mixture of C16:0-SM and C24:0-SM in the full interdigitated organization, while the higher $d_{C16:0\text{-}SM/C24:0\text{-}SM}$ =6.6 0.5 nm could be attributed to C24:0-SM in the mixed interdigitated organization, as previously discussed (Guyomarc'h et al., 2017). In this peculiar context, it was decided to calculate the mechanical properties of the liposome membranes using each of the values of d for the C24:0-SM and C24:0-SM/C16:0-SM liposomes.

The bilayer thickness of the binary system C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol) was d = 6.7 0.3 nm. No smaller d value was evident from the images. This decrease in the bilayer thickness compared to C24:0-SM (d 0.8 nm) confirmed the codispersion of C24:1-SM along with C24:0-SM. Interestingly, the d values measured for the complex systems C16:0-SM/C24:0-SM (50:50 % mol) and C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol) were not significantly different to $d_{milk\text{-}SM}$. This suggested that the asymmetry in chain length as well as unsaturation affected the thickness of planar SPLB in the gel phase.

3.3.2. Mechanical properties of milk SM liposome membranes

The liposomes of milk SM obtained by sonication and equilibrated at 20°C (i.e. in the gel phase) were deposited on the flat surface of silicon to be imaged and then indented using the AFM probe at 20°C (**Fig. 4**). Individual liposomes were indented at their apex using the AFM probe, with a maximal load of 200 pN. The Young modulus E was then calculated using individual force distance curves (n > 100) and the corrected shell theory model as explained above.

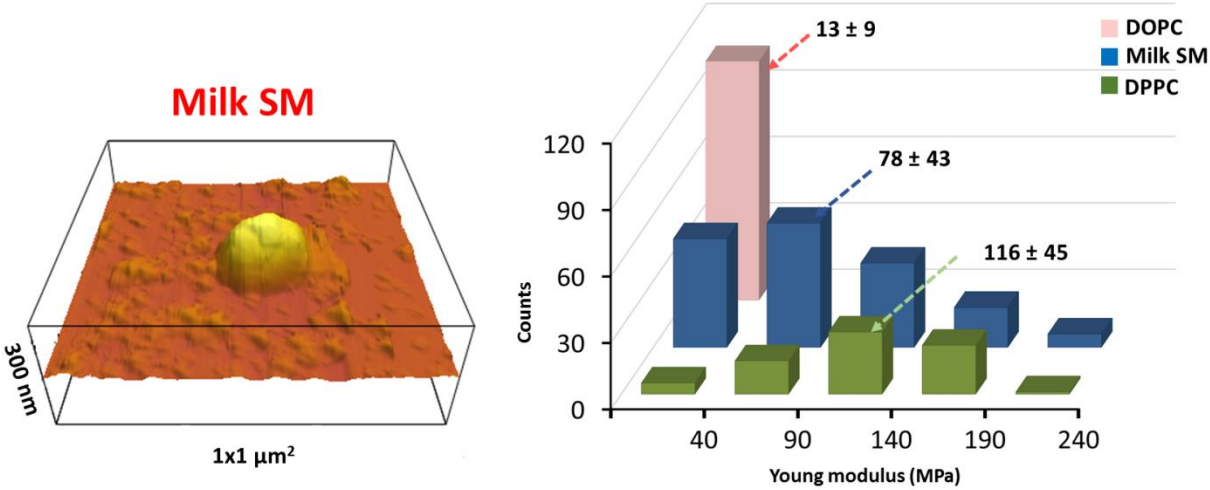


Fig. 4. Typical 3-dimensional reconstituted AFM image of a milk sphingomyelin (SM) liposome and the corresponding Young modulus distributions (n=167; blue bars) of the milk SM membranes. The results are compared with the Young modulus distributions obtained with DOPC (pink bars) and DPPC liposome membranes (green bars) in the same experimental conditions (Et-Thakafy et al., 2017a). All measurements were recorded in aqueous PIPES-NaCl-$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20°C.

The Young modulus E of milk SM liposome membranes in the gel phase showed dispersed values ranging from 1.5 to 238 MPa with a mean of E_{milkSM} = 78 ± 43 MPa. Accordingly, the mean bending rigidity of milk SMwas found to be $k_{C\text{-}milk\ SM}$ = 22 ± 15 ×10^{-19}J. These values were higher than those reported for DOPC liposome membranes in the fluid phase at 20°C (E_{DOPC} = 13 9 MPa; $k_{C\text{-}DOPC}$ = 0.9 ± 0.6×10^{-19}J). The milk SMliposome membranes in the gel phase exhibited a higher k_C than the values reported for DPPC liposomes in the gel phase using the same AFM method. This is explained by the positive dependence of k_C on bilayer thickness (Bermúdez et al., 2004; Evans, 1974; equation 4). Surprisingly, however, milk SMliposome membranes showed a lower Young modulus E than DPPC (E_{DPPC} = 116 45 MPa, $k_{C\text{-}DPPC}$ = 15.5 ± 6×10^{-19}J) (Et-Thakafy et al., 2017a). The Young modulus E of the bilayers results from resistance against lateral stretching and longitudinal strain upon compression by the AFM tip, through the multiple intermolecular interactions between adjacent molecules (Butt and Franz, 2002). Meanwhile, the bending rigidity k_C is defined as the energy required to deform and curve a membrane from its equilibrium state. This result on the Young modulus E was unexpected since milk SM is rich in saturated long acyl chains with up to 24 atoms of carbon (**Fig. 1 A**) and was expected to be stiffer than the saturated DPPC's acyl chain length with only 16 atoms of carbon. Within the phosphocholine class, Zhou et al., (2015) indeed reported increasing E values of 33 to 51 MPa for hydrated planar bilayers of symmetric C14:0- to C18-0 PCs at 25°C and in absence of calcium. Garcia-Manyes and Sanz (2010) moreover showed that the resistance of membranes to rupture

was increasingly correlated with the acyl chain length. Rupture force is somewhat correlated with compression ridigity, and hence, increases with d (Evans, 1974). Furthermore, stronger hydrogen bonding between sphingoid backbones of adjacent SM molecules, compared to that of glycerol backbones of the PC (Quinn, 2012), was expected to increase the mechanical stability of the milk SM bilayers compared to DPPC. The outcome of this comparison calls the role of sphingomyelins into question, as their relatively low elasticity, with respect to their structure, may bear important consequences on the physical properties of membrane domains (or "rafts"). It points to the roles of both the lipid composition and the asymmetry of SM species on the mechanical properties of biological membranes containing naturally complex SM, among which the milk SM (i.e. for the latter, the apical plasma membrane of the lactating cells and the milk fat globule membrane). This also holds true for liposomes formulated using the milk SM or other naturally complex SM sources. To investigate this, liposomes of controlled compositions were fabricated in order to evaluate different aspects of the heterogeneity: mixture, chain length (hence asymmetry) and unsaturation.

3.3.3. Mechanical properties of synthetic SM liposome membranes

Figure 5 shows the Young modulus E values determined for the liposome membranes composed of C16:0-SM, C24:0-SM and the binary mixtures C24:0-SM/C16:0-SM and C24:0-SM/C24:1-SM.

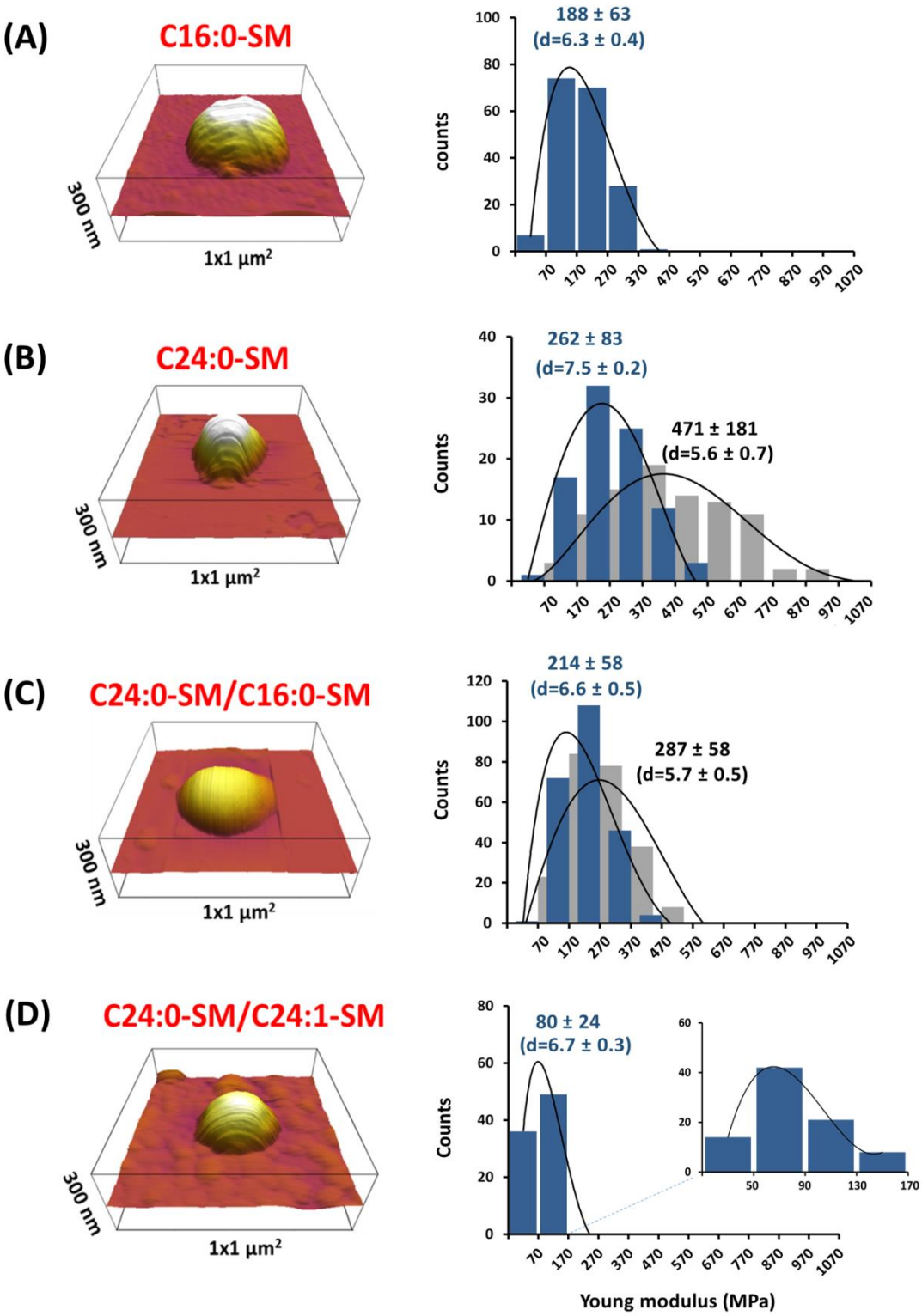


Fig. 5. Typical 3-dimensional reconstitution of AFM images of liposomes adsorbed onto silicon substrate (left panel) and the corresponding Young modulus distributions (right panel) of : **(A)** palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM; n = 180); **(B)** lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM; n = 90); **(C)** C24:0-SM/C16:0-SM (50:50%mol; n = 230) and **(D)** C24:0-SM/ nervonoyl-sphingomyelin (C24:0-SM/C24:1-SM 95:5%mol; n=85). (B) and (C) histograms show the Young modulus distributions calculated for high and low thickness of the C24:0-SM and the C24:0-SM/C16:0-SM bilayers (grey for the high thickness d, blue for low thickness d). All measurements were recorded in aqueous PIPES-NaCl-$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20°C. SM= sphingomyelin. Solid lines represent Gaussian fittings.

The mean Young modulus E values and the bending rigidity k_C values of all liposome membranes measured in this work using AFM indentation at 20°C, compared with the E and k_C values measured for DOPC and DPPC in the same experimental conditions (Et-Thakafy et al., 2017a) are presented in **Figure 6**. The mechanical properties of the milk SM liposome membrane in the gel phase were distinctly different from those of the model membranes composed of pure synthetic SM. Moreover, significant differences were clearly observed between the SM samples despite their common phase state, i.e. gel phase.

Since all segments of the molecular structure of the polar lipid exhibit interactions and are involved in the mechanical properties of membranes, they all need to be considered. Indeed, the hydrophobic moieties (hydrocarbon chains) of the polar lipids interact across the molecules through steric, hydrophobic and van der Waals intermolecular interactions while the hydrophilic region (head group) is characterized by steric and electrostatic interactions (Israelachvili et al., 1980; Quinn, 2012). At the SM/water interface region, the sphingoid or glycerol backbone is the place of important hydrogen bonding due to the presence of the hydroxyl and/or amide groups (Boggs, 1987; Quinn, 2012).

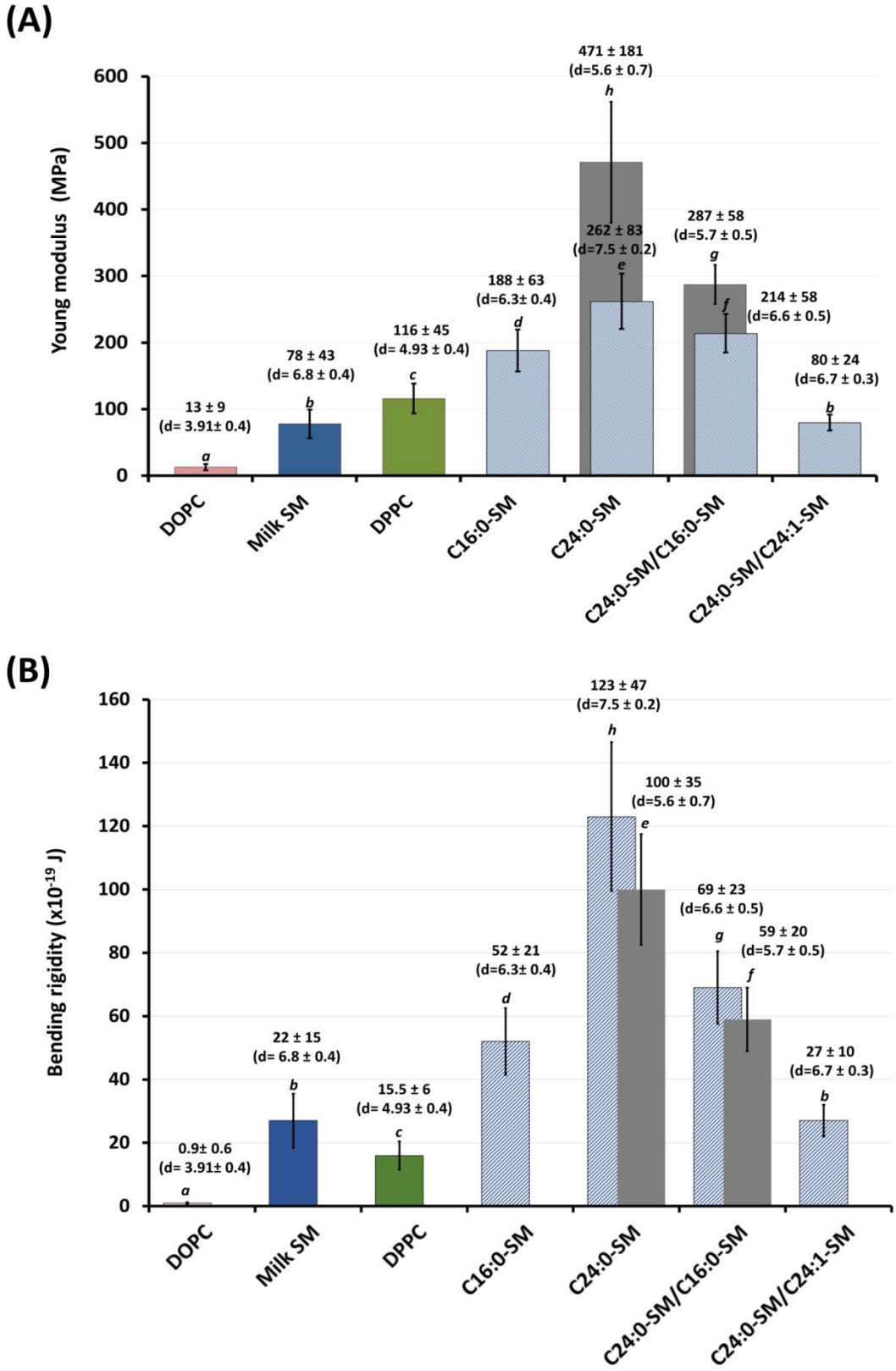


Fig. 6. Comparison of the Young modulus E (A) and bending rigidity k_C (B) values of liposomes membranes of various compositions: dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), milk sphingomyelin (milk SM), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM), lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM), C24:0-SM/C16:0-SM (50:50 % mol) and C24:0-SM/ nervonoyl-sphingomyelin (C24:0-SM/C24:1-SM=95:5%mol), determined by AFM indentation (PIPES buffer, pH= 6.7, T=20°C. Analysis of variance; Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

3.3.3.1 Role of the backbone

By comparing the C16:0-SM and DPPC bilayers, the effect of hydrogen bonding at the backbone segment could be estimated. Both molecules indeed bear a similar head, in identical aqueous environment, as well as symmetrical or near-symmetrical acyl chains on C1 and C2. In spite of the frequent *trans* unsaturation of the long chain base (**Fig. 1**), it was found that the average Young modulus of C16:0-SM liposomes ($E_{C16:0\text{-}SM}$ = 188 MPa) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of DPPC (E_{DPPC} = 116 MPa; **Fig. 4-6**). Possibly, this resulted from the higher hydrogen bonding capacity of the sphingoid backbone of SM molecules compared to that of the glycerol (Quinn, 2012), for the same N-acyl chain length and for similar molecular area in comparable conditions (~0.47 nm^2) (Smaby et al., 1994) at membrane-like surface pressure (i.e. 30 $mN.m^{-1}$; Marsh, 1996).

3.3.3.2. Role of the acyl chain length

In order to investigate the effect of the acyl chain length on the mechanical properties of liposome membranes, the synthetic SM molecules C16:0-SM and C24:0-SM were chosen, as corresponding to the extreme chain lengths found in milk SM (**Fig. 1 A**). Liposomes of C16:0-SM or C24:0-SM were imaged (**Fig. 5**) and indented in the gel phase using AFM, yielding histograms of the Young modulus E distributions with significant differences ($p < 0.05$; **Fig.5A,B; Fig. 6**). The average values determined for C16:0-SM bilayers were $E_{C16:0\text{-}SM}$ = 188 ± 63 MPa. The average Young modulus E values determined for C24:0-SM bilayers depended on the thickness of the bilayer and then on the possible interdigitation. In addition to the acyl chain length, the organization of the molecules within the bilayer should be considered. Indeed, packing in the gel phase of long chain saturated SM such as C24:0-SM involves interdigitation to minimize free space (Levin et al., 1985; Maulik and Shipley, 1995; Reed and Shipley, 1987). In the "fully interdigitated" packing, the acyl chains penetrate through the whole membrane and the ends of the sphingosine chains come opposite. In the "mixed interdigitated" packing, each acyl chain end faces the end of a sphingosine chain on the opposing leaflet. The effect of the type of interdigitation of C24:0-SM on the mechanical properties of membranes is not known. Also, the type of interdigitation formed in small liposomes (diameter < 200 nm) with high curvature constraints is not known. Therefore, we decided to calculate E and k_C for each observed thickness. Hence, $E_{C24:0\text{-}SM}$ = 262 ± 47 MPa for d = 7.5 nm (mixed interdigitated organization) or $E_{C24:0\text{-}SM}$ = 471± 181 MPa for d = 5.6 nm (full interdigitated organization). The corresponding bending rigidities were also determined where $k_{C\text{-}C16:0\text{-}SM}$ = 52 ± 21×10^{-19}J, $k_{C\text{-}C24:0\text{-}SM}$ = 123 ± 47×10^{-19}J for d = 7.5 nm (mixed interdigitated organization) and $k_{C\text{-}C24:0\text{-}SM}$ = 100 ± 35×10^{-19}J for d = 5.6 nm (full interdigitated

organization). Therefore, the Young modulus E and the bending rigidity k_C of the liposome membranes increased with the length of the N-acyl chain. Interestingly, the Young modulus distributions calculated for the C24:0-SM liposomes were monomodal, indicating that there was no obvious separation between liposomes in different molecular arrangements.

These results showed that an increase in the number of the carbon atoms in the saturated acyl chain of SM leads to an increase i) in the temperature of gel to fluid phase transition (**Fig. 2**), ii) in the maximum bilayer thickness d of the gel phase at 20°C (**Fig. 3**), iii) in the Young modulus E and the bending rigidity k_C of the liposome membranes in the gel phase (**Fig. 6**). At 30 $mN.m^{-1}$, the average area per lipid decreases for in increasing saturated chain length, i.e. from 0.525 nm^2 for C16:0-SM to 0.477 nm^2 for C24:0-SM (Li et al., 2000; Niemelä et al., 2006). This decrease in the area per lipid favors van der Waals interactions along the acyl chain (attractive interactions), and consequently enhances the ordering of the acyl chains and increases the elasticity of the liposome bilayer. However, discrepancies exist in literature about the relationship between the acyl chain length of SM molecules and the mechanical properties of the membranes. Using AFM force spectroscopy on supported planar bilayers, Maté et al. (2014) showed a significantly lower breakthrough force for C24:0-SM compared to C16:0-SM. On the other hand, the presented results were in agreement with previous results on symmetric PCs showing that the mechanical stability or the elasticity of planar lipid bilayers increased linearly with acyl chain length from C14:0 to C20:0 (Garcia-Manyes and Sanz, 2010). Previous works furthermore showed that the bending rigidity of phosphatidyl membrane in the gel phase increased with the acyl chain length (Fernandez-Puente et al., 1994) or that the decrease in bending rigidity of DMPC membrane was mainly induced by the thinning of the bilayer due to the presence of small molecules such as pentanol (Safinya et al., 1989).

3.3.3.3. Role of the heterogeneity: mixture of SM with different acyl chain lengths

In order to investigate the effect of the mixture of SM with various acyl chain lengths on the mechanical properties of membranes, liposomes composed of the binary system C16:0-SM/C24:0-SM (50:50 % mol) were prepared. The Young modulus E and bending rigidity k_C obtained on the liposome membranes of C24:0-SM/C16:0-SM were in the range E = 214 – 287 MPa and k_C = 59 - 69×10^{-19} J, respectively. In details, the calculated values were E = 214 ± 58 MPa and k_C = 69 ± 23×10^{-19}J for d = 6.6 nm attributed to the mixed interdigitated organization of C24:0-SM; or E = 287 ± 58 MPa and k_C = 59 ± 20×10^{-19}J for d = 5.7 nm attributed to C16:0-SM + C24:0-SM in the fully interdigitated organization) (**Fig. 5C and 6**). The E and k_C values determined for C16:0-SM/C24:0-SM (50:50 % mol) membranes fell between those obtained on liposomes membranes

of C16:0-SM or C24:0-SM ($p < 0.05$; **Fig.5 and 6**). This result revealed that the heterogeneity induced by the codispersion of SM molecules with various acyl chain lengths had a significant effect on the mechanical properties of lipid membranes. The decrease of both the Young modulus E and bending rigidity k_C of C24:0-SM bilayers related to the introduction of C16:0-SM seemed to reflect a destabilization effect on the stiffest lipid packing due to the chain length difference.

Furthermore, both E and k_C distributions were clearly monomodal, which suggested that liposomes contained both C16:0-SM and C24:0-SM and did not part into homogeneous vesicles of either lipid. AFM images of SLBs of equimolar C16:0-SM/C24:0-SM indeed showed that C16:0-SM and C24:0-SM closely intercalate in the plane of the bilayer, even though partitioning existed (Guyomarc'h et al., 2017). Moreover, the broad endothermic processes composed by at least two overlapped peaks and their shift towards lower temperatures (**Fig. 2**) are in favor of a mixing of C16:0-SM with C24:0-SM in the bilayers, with a lower packing order compared to C24:0-SM alone in the bilayer.

3.3.3.4. Role of the unsaturated N-acyl chains

Although unsaturated acyl chains are present in low amounts in milk SM (**Fig. 1 A**), it was suggested that they could affect the organization of SM molecules in the gel phase (Garcia-Arribas et al., 2017; Guyomarc'h et al., 2017). Therefore, one may expect consequences on the mechanical properties of the liposome membranes. Liposomes were prepared with a mixture of C24:0-SM and C24:1-SM (*cis*; double bond) at a molar ratio of 95:5 close to that of milk SM and the same number of carbon atoms for both SM (i.e. 24 atoms of carbon). The Young modulus value of C24:0-SM/C24:1-SM was found to be $E_{C24:0\text{-}SM/C24:1\text{-}SM} = 80 \pm 24$ MPa (d = 6.7 nm) with the corresponding bending rigidity $k_C = 27 \pm 10\times10^{-19}$J. Although the C24:1-SM was present in small proportion, its presence dramatically reduced the mechanical properties of the mixed membrane compared to the membrane composed of C24:0-SM ($E_{C24:0\text{-}SM} = 262$ or 471 MPa ; $k_C = 123 \pm 47\times10^{-19}$J or $100 \pm 35\times10^{-19}$J; $p < 0.05$).

These results indicate that C24:1-SM mixed with C24:0-SM and perturbed the packing of C24:0-SM molecules. This is in agreement with AFM force spectroscopy measurements showing that a significant lower breakthrough force was needed to disrupt supported planar bilayers composed of C24:1-SM compared to C24:0-SM (Maté et al., 2014), or to disrupt complex membranes were C24:1-SM was present instead of C16:0-SM (García-Arriba et al., 2017). From a structural point of view, a *cis* unsaturated double bond introduces a tilt in the hydrocarbon chain, thus disrupting the lateral lipid packing. This disruption creates free space within the bilayer that

allows additional flexibility in the neighboring chains (Li et al., 2000; Rawicz et al., 2000). At membrane-like surface pressure (i.e. 30 $mN.m^{-1}$; Marsh, 1996), the *cis* double bond in the C24:1 acyl chain increases the molecular area of the molecule compared to the saturated acyl chain containing the same number of carbon atoms: 0.607 nm^2 for C24:1-SM *versus* 0.477 nm^2 for C24:0-SM (Li et al., 2000; Niemelä et al., 2006). This decreases the van der Waals interactions along the hydrocarbon chains, with adverse consequences on the stiffness of the membrane (Boggs, 1980; Rawicz et al., 2000; Slotte, 2016). The DSC experiments performed in our study showed a decrease in the Tm in presence of C24:1-SM compared to C24:0-SM alone in the bilayers (**Fig. 2**). Hence, the disordering effect induced by the double bond of C24:1-SM was evidenced from both the thermal and mechanical properties of the bilayer membranes. However, AFM force spectroscopy appeared to be more sensitive to describe the disordering effect of C24:1-SM in the tightly packed C24:0-SM liposome bilayer.

3.4. Acyl chain asymmetry and unsaturation govern the thermotropic behaviour and mechanical properties of milk SM liposome membranes.

From a methodological point of view, we showed that the nano-indentation of milk SM or synthetic SM liposomes by AFM provides local information on the mechanical properties of unsupported bilayer membranes at the apex of liposomes (diameter 120 nm; 3D organization of the bilayer). An interesting perspective to this work could be to apply similar AFM indentation approach onto large or giant unilamellar vesicles, as recently developed by Schäfer and coworkers (Schäfer et al., 2015), in order to reach diameter and membrane curvature close to that of the milk fat globule (~ 4 µm, Lopez et al., 2011) and possibly allow force mapping of biphasic objects. At the nanoscale, we found that AFM force spectroscopy was sensitive to differences in the elasticity of membranes according to their composition and to both the lateral and longitudinal packing of SM molecules in the gel phase. As AFM force spectroscopy measurements depend on the molecular interactions between neighboring lipid molecules, elasticity parameters somehow correlated (but not entirely) with other biophysical parameters, such as the average area occupied per lipid (for single molecules) or the transition temperature from the gel to the liquid-crystalline phase (Tm) determined using DSC. From this point of view, the C24:0-SM/C24:1-SM 95:5 % mol systems exhibited a peculiar behavior, with relatively high Tm and low E.

In this study, we showed that the backbone, chain length, interdigitation (asymmetry) and unsaturation affected the thermotropic and mechanical properties of SM liposome membranes. As pure molecules, SM membranes are highly stable and tightly packed when in the gel phase. However, the introduction of dissimilar and/or shorter SM molecules alters the organization of

lipids and hence, their elasticity. The heterogeneity of acyl chains produces disorder induced by the differences in chain length and saturation (Janmey and Kinnunen, 2006). The arrangement of different SM molecules with different structures and different Tm values probably leads to organization "defects" in the bilayer's lateral packing. This alteration is pronounced in the presence of unsaturated fatty acids, as was observed for the mixture C24:0-SM/C24:1-SM (95:5 % mol). This is in agreement with previous works reporting that the structure of individual molecular species (acyl chain length, asymmetry, unsaturation) and hence the intermolecular interactions between neighboring lipids have a significant impact on various mechanical properties of these bilayers (Niggemann et al., 1995; Marsh, 2006; Garcia-Manyes and Sanz, 2010; Maté et al., 2014). This important finding not only increases our understanding of the relationship between the SM composition, their packing order in the gel phase and the consequences on liposome membranes. It also defines the heterogeneity of the acyl chain as key characteristic of the milk-SM, and probably of other natural SM sources.

The complex chemical composition of milk SM (and probably of other natural SMs) could play an important role in modeling the physical properties of biological membranes, such as to decrease the mechanical contrast between domains in the gel phase and the surrounded fluid phase of unsaturated phospholipids, to allow protein insertion or transmembrane transfers, etc... Furthermore, milk SM contains a high amount of long chain saturated acyl chains with chain mismatch, able to interdigitate. Interdigitation in the gel phase has been postulated to enhance the formation and / or stabilization of lipid domains in biological membranes (Schram and Thompson, 1995). Interdigitation of the long acyl chains into the opposing leaflet could also provide a mechanism for transmission of information across cell membranes (Schmidt et al., 1978). Among the plethora of lipid molecules, C24:1-SM is now known to be present in mammalian plasma membranes, but its influence on the physical properties of the bilayer has been poorly explored. Despite C24:1-SM is present in high amount in erythrocyte ghosts (i.e. 24 to 42.4 % of SM molecules) (Maté et al., 2014), it is present at a low weight percentage in milk SMfound in whole milk or MFGM (i.e. 3.8% wt) (Sanchez-Juanes et al., 2009). In other areas, the milk SM shows a considerable potential to be used for the development of liposome models, being an attractive compound for biocompatible pharmaceutical and cosmetic applications (Singh et al., 2012; Vesper et al., 1999). Its mechanical and thermotropic behavior (Tm near to the physiological temperature 37°C) could be advantageous to optimize the fluidity and permeability of liposome membranes for the temperature-controlled release of the encapsulated material (Singh et al., 2012; Yoshimoto and Todaka, 2014). Based on this research, it is therefore possible to control the physical properties of

liposomes by carefully selecting a membrane composition with the suitable Tm, according to well-defined objectives.

4. Conclusion

Natural sphingomyelins found in biological membranes exhibit complex compositions that may affect their physical properties in biological context. To address this, the elastic properties of unsupported and curved liposome membranes were evaluated using AFM force spectroscopy and the shell theory, to yield calculation of the Young modulus E and the bending rigidity k_C. The results showed that the length of hydrocarbon chains increases both the Young's modulus and k_C values of the membrane, whereas heterogeneity induced by mixture of various chain lengths or insaturation had an opposite effect. These results explain why the milk SM exhibited unexpectedly weak Young modulus E when in the gel phase, as compared to DPPC. This approach opens perspectives for the detailed comprehension of the mechanical properties of natural membranes, involving complex polar lipid mixtures, and for the design of versatile liposomes.

ACKNOWLEDGMENTS

The doctoral fellowship of author Et-Thakafy was funded by INRA CEPIA and Région Bretagne (France) under the grant ARED 8806. The Asylum Research MFP 3D-BIO atomic force microscope was funded by the European Union (FEDER), the French Ministry of Education and Research, INRA, Conseil Général 35 and Rennes Métropole.

REFERENCES

Ali, S., Smaby, J.M., Momsen, M.M., Brockman, H.L., Brown, R.E., 1998. Acyl chain-length asymmetry alters the interfacial elastic interactions of phosphatidylcholines. Biophys. J. 74, 338–348.

Bermúdez, H., Hammer, D.A., Discher, D.E., 2004. Effect of Bilayer Thickness on Membrane Bending Rigidity. Langmuir 20, 540–543. doi:10.1021/la035497f

Berry, J.D., Mettu, S., Dagastine, R.R., 2017. Precise measurements of capsule mechanical properties using indentation. Soft Matter 13, 1943–1947. doi:10.1039/C6SM02841A

Björkqvist, Y.J.E., Brewer, J., Bagatolli, L.A., Slotte, J.P., Westerlund, B., 2009. Thermotropic behavior and lateral distribution of very long chain sphingolipids. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1788, 1310–1320. doi:10.1016/j.bbamem.2009.02.019

Boggs, J.M., 1987. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Biomembr. 906, 353–404.

Boggs, J.M., 1980. Intermolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes. Can. J. Biochem. 58, 755–770.

Butt, H.-J., Franz, V., 2002. Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. I. Theory. Phys. Rev. E 66, 031601.

Byrdwell, W.C., Perry, R.H., 2007. Liquid chromatography with dual parallel mass spectrometry and 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy for analysis of sphingomyelin and dihydrosphingomyelin. J. Chromatogr. A 1146, 164–185. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.108

Colas, J.-C., Shi, W., Rao, V.M., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H., 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. Micron 38, 841–847.

Delorme, N., Fery, A., 2006. Direct method to study membrane rigidity of small vesicles based on atomic force microscope force spectroscopy. Phys. Rev. E 74. doi:10.1103/PhysRevE.74.030901

Duan, R.-D., 2005. Anticancer compounds and sphingolipid metabolism in the colon. In Vivo 19, 293–300.

Duan, R.-D., Nyberg, L., Nilsson, \AAke, 1995. Alkaline sphingomyelinase activity in rat gastrointestinal tract: distribution and characteristics. Biochim. Biophys. Acta BBA-Lipids Lipid Metab. 1259, 49–55.

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Mériadec, C., Artzner, F., Lopez, C., Guyomarc'h, F., 2017a. Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy. Langmuir 33, 5117–5126. doi:10.1021/acs.langmuir.7b00363

Et-Thakafy, O., Guyomarc'h, F., Lopez, C., 2017b. Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time. Food Chem. 220, 352–361. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.017

Evans, E.A., 1974. Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. Biophys. J. 14, 923–931.

Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M.D., Méléard, P., 1994. Temperature and chain length effects on bending elasticity of phosphatidylcholine bilayers. EPL Europhys. Lett. 28, 181.

Fery, A., Weinkamer, R., 2007. Mechanical properties of micro- and nanocapsules: Single-capsule measurements. Polymer 48, 7221–7235. doi:10.1016/j.polymer.2007.07.050

Filippov, A., Munavirov, B., Gröbner, G., Rudakova, M., 2012. Lateral diffusion in equimolar mixtures of natural sphingomyelins with dioleoylphosphatidylcholine. Magn. Reson. Imaging 30, 413–421. doi:10.1016/j.mri.2011.12.010

Filippov, A., Orädd, G., Lindblom, G., 2006. Sphingomyelin Structure Influences the Lateral Diffusion and Raft Formation in Lipid Bilayers. Biophys. J. 90, 2086–2092. doi:10.1529/biophysj.105.075150

Gallier, S., Gragson, D., Jiménez-Flores, R., Everett, D., 2010. Using Confocal Laser Scanning Microscopy To Probe the Milk Fat Globule Membrane and Associated Proteins. J. Agric. Food Chem. 58, 4250–4257. doi:10.1021/jf9032409

Gallier, S., Vocking, K., Post, J.A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E.M., Van Baalen, T., 2015. A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. Colloids Surf. B Biointerfaces 136, 329–339. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.09.024

Garcia-Arribas, A.B., González-Ramírez, E.J., Sot, J., Areso, I., Alonso, A., Goni, F.M., 2017. Complex effects of 24: 1 sphingolipids in membranes containing dioleoyl phosphatidylcholine and cholesterol. Langmuir.

Garcia-Manyes, S., Sanz, F., 2010. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1798, 741–749. doi:10.1016/j.bbamem.2009.12.019

Glaubitz, M., Medvedev, N., Pussak, D., Hartmann, L., Schmidt, S., Helm, C.A., Delcea, M., 2014. A novel contact model for AFM indentation experiments on soft spherical cell-like particles. Soft Matter 10, 6732. doi:10.1039/C4SM00788C

Guyomarc'h, F., Chen, M., Et-Thakafy, O., Zou, S., Lopez, C., 2017. Gel-gel phase separation within milk sphingomyelin domains revealed at the nanoscale using atomic force microscopy. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1859, 949–958. doi:10.1016/j.bbamem.2017.02.010

Guyomarc'h, F., Zou, S., Chen, M., Milhiet, P.-E., Godefroy, C., Vié, V., Lopez, C., 2014. Milk Sphingomyelin Domains in Biomimetic Membranes and the Role of Cholesterol: Morphology and Nanomechanical Properties Investigated Using AFM and Force Spectroscopy. Langmuir 30, 6516–6524. doi:10.1021/la501640y

Hantz, E., Cao, A., Escaig, J., Taillandier, E., 1986. The osmotic response of large unilamellar vesicles studied by quasielastic light scattering. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 862, 379–386.

Heid, H.W., Keenan, T.W., 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. Eur. J. Cell Biol. 84, 245–258. doi:10.1016/j.ejcb.2004.12.002

Israelachvili, J.N., Marčelja, S., Horn, R.G., 1980. Physical principles of membrane organization. Q. Rev. Biophys. 13, 121–200.

Jacquot, A., Francius, G., Razafitianamaharavo, A., Dehghani, F., Tamayol, A., Linder, M., Arab-Tehrany, E., 2014. Morphological and Physical Analysis of Natural Phospholipids-Based Biomembranes. PLoS ONE 9, e107435. doi:10.1371/journal.pone.0107435

Janmey, P.A., Kinnunen, P.K.J., 2006. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. Trends Cell Biol. 16, 538–546. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.009

Jimenez-Rojo, N., García-Arribas, A.B., Sot, J., Alonso, A., Goñi, F.M., 2014. Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl lengths: A glimpse into sphingolipid complexity. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1838, 456–464. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.010

Keenan, T.W., Morré, D.J., Olson, D.E., Yunghans, W.N., Patton, S., 1970. Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland. J. Cell Biol. 44, 80–93.

Koynova, R., Caffrey, M., 1995. Phases and phase transitions of the sphingolipids. Biochim. Biophys. Acta BBA-Lipids Lipid Metab. 1255, 213–236.

Levin, I.W., Thompson, T.E., Barenholz, Y., Huang, C.–., 1985. Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers. Biochemistry. 24, 6282–6286.

Li, X.-M., Momsen, M.M., Smaby, J.M., Brockman, H.L., Brown, R.E., 2001. Cholesterol Decreases the Interfacial Elasticity and Detergent Solubility of Sphingomyelins †. Biochemistry (Mosc.) 40, 5954–5963. doi:10.1021/bi002791n

Li, X.-M., Smaby, J.M., Momsen, M.M., Brockman, H.L., Brown, R.E., 2000. Sphingomyelin interfacial behavior: the impact of changing acyl chain composition. Biophys. J. 78, 1921–1931.

Liang, X., Mao, G., Ng, K.Y.S., 2004a. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. J. Colloid Interface Sci. 278, 53–62. doi:10.1016/j.jcis.2004.05.042

Liang, X., Mao, G., Simon Ng, K.., 2004b. Probing small unilamellar EggPC vesicles on mica surface by atomic force microscopy. Colloids Surf. B Biointerfaces 34, 41–51. doi:10.1016/j.colsurfb.2003.10.017

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., Robert, B., 2011. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. Food Chem. 125, 355–368. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.005

Lopez, C., Madec, M.-N., Jimenez-Flores, R., 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. Food Chem. 120, 22–33. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.065

Lopez, C., Ménard, O., 2011. Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. Colloids Surf. B Biointerfaces 83, 29–41. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.10.039

Malmsten, M., Bergenståhl, B., Nyberg, L., Odham, G., 1994. Sphingomyelin from milk-characterization of liquid crystalline, liposome and emulsion properties. J. Am. Oil Chem. Soc. 71, 1021–1026.

Marsh, D., 2006. Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers. Chem. Phys. Lipids 144, 146–159. doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.08.004

Marsh, D., 1996. Lateral pressure in membranes. Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Biomembr. 1286, 183–223.

Maté, S., Busto, J., García-Arribas, A., Sot, J., Vazquez, R., Herlax, V., Wolf, C., Bakás, L., Goñi, F., 2014. N-Nervonoylsphingomyelin (C24:1) Prevents Lateral Heterogeneity in Cholesterol-Containing Membranes. Biophys. J. 106, 2606–2616. doi:10.1016/j.bpj.2014.04.054

Maulik, P.R., Shipley, G.G., 1996. N-palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine. Biochemistry. 35, 8025–8034.

Maulik, P.R., Shipley, G.G., 1995. X-ray diffraction and calorimetric study of N-lignoceryl sphingomyelin membranes. Biophys. J. 69, 1909–1916.

Murthy, A.V.R., Guyomarc'h, F., Lopez, C., 2016a. The temperature-dependent physical state of polar lipids and their miscibility impact the topography and mechanical properties of

bilayer models of the milk fat globule membrane. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1858, 2181–2190. doi:10.1016/j.bbamem.2016.06.020

Murthy, A.V.R., Guyomarc'h, F., Lopez, C., 2016b. Cholesterol Decreases the Size and the Mechanical Resistance to Rupture of Sphingomyelin Rich Domains, in Lipid Bilayers Studied as a Model of the Milk Fat Globule Membrane. Langmuir 32, 6757–6765. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01040

Murthy, A.V.R., Guyomarc'h, F., Paboeuf, G., Vié, V., Lopez, C., 2015. Cholesterol strongly affects the organization of lipid monolayers studied as models of the milk fat globule membrane: Condensing effect and change in the lipid domain morphology. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1848, 2308–2316. doi:10.1016/j.bbamem.2015.06.014

Nguyen, H.T.H., Ong, L., Beaucher, E., Madec, M.-N., Kentish, S.E., Gras, S.L., Lopez, C., 2015. Buffalo milk fat globules and their biological membrane: in situ structural investigations. Food Res. Int. 67, 35–43. doi:10.1016/j.foodres.2014.10.022

Niemelä, P.S., Hyvönen, M.T., Vattulainen, I., 2006. Influence of Chain Length and Unsaturation on Sphingomyelin Bilayers. Biophys. J. 90, 851–863. doi:10.1529/biophysj.105.067371

Niggemann, G., Kummrow, M., Helfrich, W., 1995. The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers: dependences on experimental method, sample cell sealing and temperature. J. Phys. II 5, 413–425.

Quinn, P.J., 2012. Lipid–lipid interactions in bilayer membranes: Married couples and casual liaisons. Prog. Lipid Res. 51, 179–198. doi:10.1016/j.plipres.2012.01.001

Rawicz, W., Olbrich, K., McIntosh, T., Needham, D., Evans, E., 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. Biophys. J. 79, 328–339.

Reed, R.A., Shipley, G.G., 1987. Structure and metastability of N-lignocerylgalactosylsphingosine (cerebroside) bilayers. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 896, 153–164.

Reissner, E., 1947. Note on the Membrane Theory of Shell of Revolution. Stud. Appl. Math. 26, 290–293.

Safinya, C., Sirota, E., Roux, D., Smith, G., 1989. Universality in interacting membranes: the effect of cosurfactants on the interfacial rigidity. Phys. Rev. Lett. 62, 1134.

Sanchez-Juanes, F., Alonso, J.M., Zancada, L., Hueso, P., 2009. Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membranes: a comparative study. Adhesion to enterotoxigenic Escherichia coli strains. Biol. Chem. 390. doi:10.1515/BC.2009.003

Schäfer, E., Vache, M., Kliesch, T.-T., Janshoff, A., 2015. Mechanical response of adherent giant liposomes to indentation with a conical AFM-tip. Soft Matter 11, 4487–4495.

Schmidt, C., Barenholz, Y., Huang, C., Thompson, T., 1978. Monolayer coupling in sphingomyelin bilayer systems. Nature 271, 775–777.

Schram, V., Thompson, T.E., 1995. Interdigitation does not affect translational diffusion of lipids in liquid crystalline bilayers. Biophys. J. 69, 2517–2520.

Shaw, K.P., Brooks, N.J., Clarke, J.A., Ces, O., Seddon, J.M., Law, R.V., 2012. Pressure–temperature phase behaviour of natural sphingomyelin extracts. Soft Matter 8, 1070–1078. doi:10.1039/C1SM06703F

Simons, K., Vaz, W.L.C., 2004. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33, 269–295. doi:10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803

Singh, H., Thompson, A., Liu, W., Corredig, M., 2012. Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. Encapsulation Technol. Deliv. Syst. Food Ingred. Nutraceuticals Woodhead Publ. Ltd. Camb. UK 287–318.

Slotte, J.P., 2016. The importance of hydrogen bonding in sphingomyelin's membrane interactions with co-lipids. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 1858, 304–310.

Slotte, J.P., 2013. Molecular properties of various structurally defined sphingomyelins? Correlation of structure with function. Prog. Lipid Res. 52, 206–219. doi:10.1016/j.plipres.2012.12.001

Smaby, J.M., Brockman, H.L., Brown, R.E., 1994. Cholesterol's interfacial interactions with sphingomyelins and-phosphatidylcholines: hydrocarbon chain structure determines the magnitude of condensation. Biochemistry. 33, 9135–9142.

Stancevic, B., Kolesnick, R., 2010. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. FEBS Lett. 584, 1728–1740. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.026

Sullan, R.M.A., Li, J.K., Zou, S., 2009. Direct Correlation of Structures and Nanomechanical Properties of Multicomponent Lipid Bilayers. Langmuir 25, 7471–7477. doi:10.1021/la900395w

Takechi-Haraya, Y., Sakai-Kato, K., Abe, Y., Kawanishi, T., Okuda, H., & Goda, Y. (2016). Atomic force microscopic analysis of the effect of lipid composition on liposome membrane rigidity. Langmuir, 32(24), 6074-6082. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00741

Thompson, A.K., Singh, H., 2006. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. J. Dairy Sci. 89, 410–419.

Vesper, H., Schmelz, E.-M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, A.H., 1999. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. J. Nutr. 129, 1239–1250.

Yoshimoto, M., Todaka, Y., 2014. Phase transition induced rapid permeabilization of liposome membranes composed of milk sphingomyelin. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116, 226–231.

Zanabria, R., Tellez, A.M., Griffiths, M., Corredig, M., 2013. Milk fat globule membrane isolate induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. Food Funct. 4, 222–230.

Zhou, J., Liang, D., Contera, S., 2015. Effect of intra-membrane C 60 fullerenes on the modulus of elasticity and the mechanical resistance of gel and fluid lipid bilayers. Nanoscale 7, 17102–17108.

Zou, X., Guo, Z., Jin, Q., Huang, J., Cheong, L., Xu, X., Wang, X., 2015. Composition and microstructure of colostrum and mature bovine milk fat globule membrane. Food Chem. 185, 362–370. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.145

7.4. Bilan du chapitre 7 et perspectives

Dans ce chapitre, l'objectif était de déterminer l'effet de l'état de phase et de l'hétérogénéité de composition de la membrane sur ses propriétés mécaniques, en particulier élastiques. L'état de phase d'une membrane dépend essentiellement des lipides qui la composent. Dans la littérature, les lipides ont des structures moléculaires différentes généralement distinguées par le degré d'insaturation ou la longueur des chaînes hydrocarbonées. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons comparé les propriétés mécaniques de membranes dans deux états de phase différents, en comparant un lipide polaire saturé en phase gel à 20°C, la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC;16:0), avec un lipide polaire insaturé en phase fluide à la même température, la dioléoylphosphatidycholine (DOPC;18:1). Des suspensions de vésicules ont été préparées dans les mêmes conditions de tampon PIPES à 10 mM de calcium et à pH=6.7. Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour déterminer leurs propriétés morphologiques, structurales, thermotropiques et mécaniques. L'analyse des vésicules multi lamellaires (MLV) par calorimétrie différentielle a montré que le DOPC a une température de transition de phase gel(L_β)/fluide (L_α) très faible, avec Tm = -20°C. Parallèlement, le DPPC révèle deux endothermes ; le premier correspond à une transition de phase gel (L_β)/ripple (P_β') qui a lieu à Tm=37°C et le deuxième à une transition de phase ripple (P_β')/fluide (L_α) qui a lieu à Tm = 41°C. La différence d'état de phase de ces deux lipides à 20°C a été confirmée par les résultats obtenus par diffraction des rayons

X. Aux grands angles, les vésicules de DPPC (MLV) ont montré un pic à q= 1.5 $Å^{-1}$ associé à un arrangement dans une structure bien définie en réseau pseudo-hexagonal. Au contraire, le DOPC ne présentait aucun pic ce qui prouve son état désordonné ou fluide. Pour la caractérisation mécanique, nous avons travaillé sur deux systèmes différents : les vésicules unilamellaires de petite taille (SUV, organisation tridimensionnelle) et les bicouches lipidiques supportées (SLB, organisation bidimensionnelle). Pour chaque lipide, des vésicules ont été préparées puis caractérisées par DLS et TEM. La microscopie électronique TEM a permis de vérifier que les vésicules sont bien unilamellaires. La technique DLS a permis de mesurer leur diamètre, d'environ 100-150 nm, et de s'assurer que les objets observés en AFM correspondent bien à des vésicules en comparant les diamètres moyens mesurés par les deux techniques. Les vésicules ont été immobilisées sur une surface de silice afin d'imager et d'indenter les vésicules sans les déplacer. Les mesures de force par AFM ont été effectuées à 20°C en utilisant une pointe de type MLCT de constante de raideur de 0.03 $N.m^{-1}$ et en appliquant une force maximale de 200 pN. Les données obtenues sous forme de courbes de force ont été traitées selon le modèle mécanique « shell theory » adapté à la géométrie des vésicules. Nous avons montré que le module de Young (E) et la rigidité de courbure (k_C) ainsi obtenus, marqueurs des propriétés élastiques des membranes, étaient respectivement de 13 ± 9 MPa et de $0.9 \pm 0.6\times10^{-19}$J pour les vésicules de DOPC en phase fluide. Ils étaient donc plus faibles que ceux de la membrane de SUV de DPPC en phase gel (E=116 ± 45MPa ; $k_C = 15.5 \pm 6\times10^{-19}$J). En comparaison, des SLB ont été formées à partir de la fusion des mêmes SUV sur du mica, grâce à une cinétique de refroidissement bien définie passant de 60°C à 20°C. Le calcul du module de Young des SLB par AFM a également été réalisé dans les mêmes conditions que sur les vésicules, sauf que le modèle de Hertz a été utilisé pour s'adapter à la géométrie du système. Nous avons trouvé que cette approche produisait des valeurs plus dispersées et était moins discriminante que les mesures réalisées sur les vésicules. Pratiquée avec précaution (pour éviter l'effet de la compression de la membrane contre le mica), la mesure sur les SLB reste néanmoins une approche valide. En utilisant une pointe plus fine (MSNL), une distance de parcours de la pointe et une force appliquée plus élevées (20 nN), nous avons également pu perforer les SLB et mesurer la force de rupture (breakthrough force) F_B des membranes. Nous avons enregistré une F_B de 7.3 nN pour le DPPC et de 2.5 nN pour le DOPC, ce qui est significativement différent et montre que cette approche est bien adaptée pour les SLB. En revanche, elle fournit une donnée qui n'est pas comparable avec d'autres techniques, au contraire du module de Young qui peut être obtenu par différents moyens (chapitre 1, synthèse bibliographique).

De ces résultats, nous avons conclu que l'insaturation de la chaîne acyl des lipides polaires a un fort effet sur les propriétés physico-chimiques des membranes biologiques quelle que soit l'organisation de la bicouche de lipides (2D ou 3D). En effet, la présence de la double liaison introduit une courbure dans les queues hydrophobes des lipides, ce qui perturbe leur arrangement compact au sein de des bicouches, réduisant les forces d'interactions entre molécules voisines, d'où l'effet fluidifiant de la membrane et l'affaiblissement de leur élasticité.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons voulu déterminer le rôle de la composition lipidique dans la modulation des propriétés mécaniques des membranes biologiques telles que la MFGM, qui possèdent une composition complexe pour chaque classe de lipides polaires. En particulier, la milk SM qui est un composant essentiel des domaines lipidiques de la MFGM, est un bon modèle de composition hétérogène. Comme précédemment, des SUV ont été fabriquées et caractérisées dans les mêmes conditions de pH, température et tampon, à l'aide des mêmes méthodes. Les résultats ont montré que les membranes des SUV en phase gel de milk SM (Tm = 33°C) avaient respectivement un module de Young de 78 ± 43 MPa et une rigidité de courbure de 22 ± 15 $\times 10^{-19}$J. Les valeurs du module de Young des membranes de milk SM en 3D étaient plus élevées que celles obtenues en 2D (chapitre 6) de l'ordre de 10-18 MPa. Cet écart est probablement lié à la différence de molarité en calcium de la phase aqueuse volontairement utilisé pour des raisons techniques (2 et 5 mM dans le chapitre 6 pour la formation des SLB continues comme Murthy et al.,(2016a) et Guyomarc'h et al.,(2017); 10 mM Ca dans le présent chapitre pour une meilleure dispersion de liposomes). Pabst et al (2007) ont montré que le calcium augmentait l'ordre et la rigidité de bicouches d'une autre phosphocholine, le POPC.

Les membranes de liposomes de milk SM ont également montré un module de Young intermédiaire entre ceux du DOPC (13 MPa) et du DPPC (116 MPa), ce qui est contradictoire avec sa richesse en acides gras saturés de longueurs de chaînes égales ou supérieures à ceux du DPPC (milk SM : 91% de 16:0, 22:0, 23:0, 24:0 et 3% de C24:1). Cette comparaison nous a permis d'émettre deux hypothèses: les propriétés élastiques peuvent être affectées par (1) l'hétérogénéité de la composition chimique de la membrane, et/ou (2) par la présence de lipides insaturés même à faible quantité. Pour confirmer cela, nous avons choisi trois espèces moléculaires parmi les composants de la milk SM: C16:0-SM, C24:0-SM, C24 :1-SM. Le but était de comparer les élasticités (E et k_C) des membranes de compositions simples à celles des membranes de compositions hétérogènes en présence des lipides saturés ou insaturés. Ainsi, les compositions suivantes ont été utilisées pour fabriquer des vésicules: C16:0-SM, C24:0-SM, C24:0-SM/C16:0-SM à 50:50%mol, ou C24:0-SM/C24:1-SM à 95:5%mol. L'analyse par calorimétrie différentielle

a montré que les endothermes changeaient en fonction de la composition chimique des membranes. Les températures de transition de phase principale étaient de 41°C, 46°C, 41°C et 45°C pour C16:0-SM, C24:0-SM, C24:0-SM/C16:0-SM à 50:50%mol, ou C24:0-SM/C24:1-SM à 95:5%mol, respectivement, ce qui montre que tous les échantillons étaient en phase gel à 20°C. La température de transition de phase Tm augmente avec la longueur de la chaine hydrocarbonée. Par contre, elle diminue avec la complexité, notamment lorsqu'on introduit un lipide de longueur de chaîne différente (en particulier plus courte), ou un insaturé. Ainsi, la milk SM qui est le mélange le plus complexe, possède une Tm inférieure à la Tm de chacun de ses composants ou à la Tm de mélanges simples.

De la même façon, les mesures d'indentation par AFM et le calcul du module de Young ont permis les conclusions suivantes : (1) l'élasticité augmente avec la longueur des chaînes hydrocarbonées saturées, en comparant C16:0-SM (E = 188 ± 63 MPa ; k_C = 52 ± 21×10^{-19}J) et C24:0-SM (E = 262 ± 83 MPa ; k_C = 123 ± 47×10^{-19}J). (2) L'hétérogénéité de la composition modifie l'élasticité des membranes en comparant C24:0-SM/C16:0-SM à 50:50%mol (E = 214 ± 58 MPa ; k_C = 69×10^{-19} J) ou la milk SM (E = 78 ± 43 MPa ; k_C =22 ± 15 ×10^{-19}J) avec C16:0-SM ou C24:0-SM. (3) L'introduction des lipides insaturés diminue fortement l'élasticité des membranes en comparant C24:0-SM/C24:1-SM à 95:5%mol (E=80 ± 24 MPa ; k_C= 27 ± 10×10^{-19}J) avec C24:0-SM. En résumé, nous avons conclu que la composition chimique a un fort impact autant sur le comportement thermo tropique des membranes, que sur leur élasticité, les deux réponses étant fondées sur la capacité des molécules à s'arranger de façon plus ou moins compacte et homogène au sein de la membrane. Ainsi, un rôle perturbateur des chaînes insaturées, ou du mismatch entre chaînes de longueurs différentes, a été identifié.

Les résultats obtenus dans ce chapitre serviront de référence dans la suite de ce travail où nous avons essayé de caractériser l'interface membranaire du globule gras natif en combinant deux techniques physiques permettant d'établir le lien entre les propriétés structurales et mécaniques.

De ce chapitre, on retient:

Les lipides polaires laitiers, en fonction de leur structure chimique, forment des vésicules de propriétés physiques et mécaniques différentes à une température donnée (20°C).

Les propriétés élastiques d'une membrane courbe en phase fluide sont plus faibles que celles d'une membrane en phase gel.

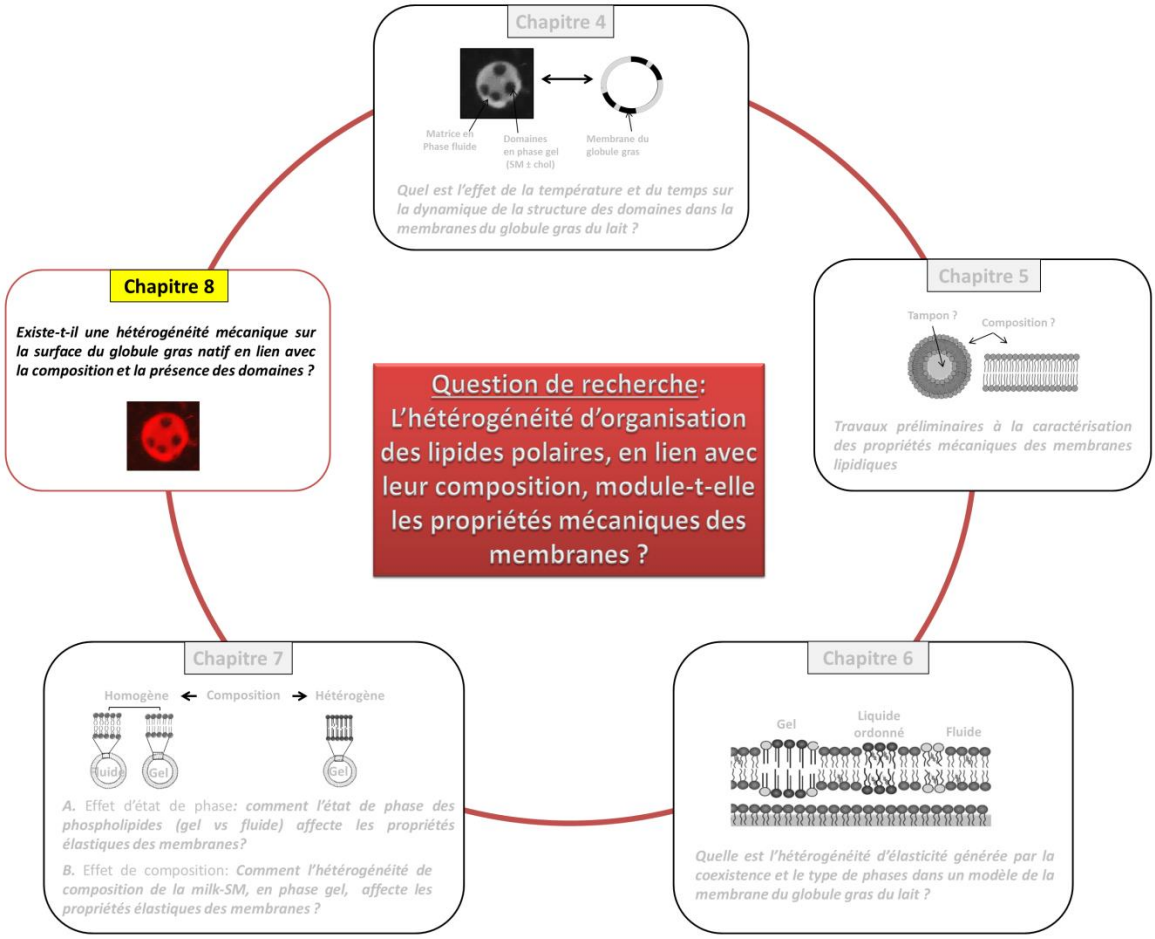
En phase gel, les propriétés élastiques d'une membrane courbe augmentent avec la longueur des chaines acyles mais diminuent en présence de plusieurs espèces moléculaires et plus encore lorsque tout ou partie d'entre elles sont insaturées.

Chapitre 8: Existe-t-il une hétérogénéité mécanique sur la surface du globule gras natif en lien avec la composition et la présence des domaines ?

8.1. Introduction

Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, le globule gras est entouré par une membrane biologique (MFGM) riche en lipides polaires et en protéines. Les différents composants s'organisent d'une manière hétérogène à la surface de la membrane induisant une hétérogénéité de structure. Lopez et al., (2010) ont mis en évidence la présence de trois phases différentes à la surface du globule gras contenant respectivement les lipides polaires saturés sous la forme de domaines en phase ordonnée, les lipides polaires insaturés en phase continue fluide et les protéines (glycoprotéines). Dans le chapitre 4, confirmé par le chapitre 6, nous avons pu compléter ces connaissances en observant que les domaines pouvaient être présents en phase gel ou liquide ordonné, en fonction de l'absence ou de la présence de cholestérol, respectivement. La membrane du globule gras protège le cœur de triglycérides et le traitement mécanique du lait entier ou de la crème peut endommager la MFGM ce qui conduit à des phénomènes d'instabilité comme le crémage, la coalescence ou la floculation (Ong et al., 2010; Stone and Rowlands, 1952). La connaissance des propriétés mécaniques de la MFGM est donc nécessaire pour comprendre les différents facteurs qui contribuent à la stabilité physique du globule gras soumis à des traitements dynamiques tels que le cisaillement. Dans les chapitres précédents, nous avons montré sur des membranes modèles composées de lipides polaires extraits de la MFGM que la ségrégation des lipides polaires saturés en domaines conduit à une hétérogénéité mécanique de la membrane (Murthy et al., 2016a), qui évolue différemment avec la température selon que ces domaines sont en phase gel ou Lo (chapitres 4 et 6). Nous avons démontré que les deux éléments clés impliqués dans la modulation de la réponse mécanique des membranes modèles sont l'état de phase et la complexité de la composition lipidique, ce qui accroît les connaissances déjà obtenues sur des modèles plus simples (Delorme and Fery, 2006; Liang et al., 2004a; Rawicz et al., 2000). Compte tenu de leur complexité, très peu de travaux ont été réalisés directement sur des membranes biologiques en vue de caractériser une éventuelle hétérogénéité mécanique liée à la présence de domaines. Récemment, ces domaines ont été observés par topographie AFM directement sur des membranes d'érythrocytes (Cai et al., 2012; Tian et al., 2014), la membrane de l'appareil de Golgi ou de mitochondrie (Tian et al., 2013; Xu et al., 2013), ou sur des vésicules issues de plantes (Naulin et al., 2014) mais aucune de ces études n'a réalisé de mesures mécaniques. Sur des cellules de mammifères, des domaines ont été observés sur des fragments de membrane de cellule

cancéreuse humaine (Orsini et al., 2012) mais la structure plus complexe impose aussi le recours à des traitements enzymatique ou chimique (Zhao et al., 2014). Sur les globules gras du lait, Balasuriya et al., (2012) ont étudié les propriétés morphologiques et nanomécaniques de la MFGM, in situ, dans des laits différemment traités. Des différences ont été observées concernant la morphologie, la rugosité et les propriétés élastiques de l'interface membranaire du globule gras, selon le type de procédé appliqué au lait, mais sans faire de mesures mécaniques résolues spatialement, qui auraient permis de visualiser une éventuelle hétérogénéité mécanique sur la surface des globules.



Les techniques combinant microscopie de fluorescence et AFM sont de plus en plus utilisées dans l'étude nanomécanique des objets naturels ou biologiques (Sato et al., 2000; Schäfer et al., 2015; Tabor et al., 2011). Ainsi, nous avons essayé d'appliquer cette technique de couplage AFM/fluorescence pour déterminer l'effet de l'hétérogénéité de structure sur les propriétés nanomécaniques de la MFGM. Le but était de repérer les microstructures en surface du globule gras sur les images de fluorescence pour acquérir des courbes force-distance par AFM avec une

grande précision (étude nanomécanique) et en déterminer l'évolution des propriétés élastiques de surface. Le marquage de la MFGM avec une sonde fluorescente Rh-DOPE (Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2011; Zou et al., 2015) permet de distinguer la phase gel supposée être riche en milk SM de la phase fluide (matrice de lipides polaires insaturés). Selon nos observations sur les objets modèles, le contraste de phase observé par microscopie de fluorescence devrait se traduire par un contraste mécanique en AFM. Une telle étude ne peut que contribuer à approfondir nos connaissances sur la membrane native complexe du globule gras en se basant sur les résultats obtenus sur des membranes modèles.

8.2. Méthodes expérimentales

8.2.1. Matériels

La suspension de globules gras natifs a été obtenue suite à un écrémage de lait bovin cru fraîchement collecté. Cette opération consiste à séparer la matière grasse de la phase aqueuse du lait ce qui donne respectivement la crème et le lait écrémé. La crème est donc environ 10 fois plus concentrée en matière grasse que le lait entier (lait entier ~35 $g.kg^{-1}$; crème ~350 $g.kg^{-1}$). Le lait est tout d'abord chauffé à 50°C afin d'éviter la cristallisation du cœur gras de triglycérides, qui peut altérer la MFGM. Ensuite, le lait a été introduit dans une écrémeuse à assiettes tronconiques solidaires concentriques, tournant à grande vitesse (Elecrem, Vanves, France). Sous l'action de la force centrifuge, les globules gras (moins denses) se dirigent vers l'intérieur i.e. l'axe de rotation, tandis que la phase aqueuse (lait écrémé) est dirigée vers la périphérie. La crème récupérée est ensuite diluée avec de l'eau déionisée à 50°C et repassée dans l'écrémeuse à plusieurs reprises (3 fois) pour un lavage optimal des globules gras. Pour permettre la caractérisation par AFM/fluorescence de globules gras individuels, la crème lavée a été diluée 20 fois dans un tampon PIPES-NaCl, et marquée en fluorescence par l'utilisation de la sonde Rh-DOPE à raison de 20 µL de sonde évaporée pour 1 mL de crème diluée.

8.2.2. Couplage AFM /Fluorescence

Le microscope à épi-fluorescence Nikon Eclipse (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) a permis de visualiser les globules marqués par fluorescence (λ= 543 nm), ainsi que de contrôler le positionnement de la pointe AFM sur les particules. Le microscope AFM utilisé, de marque Bioscope Catalyst (Bruker AXS, Karlsruhe, Allemagne), a été utilisé en milieu liquide, à température ambiante (20°C), dans le mode Peak force QNM (Quantitative Nanomechanical Mapping). La pointe utilisée est triangulaire (ScanAsyst-fluid, Bruker) avec une constante de

raideur nominale de 0.7 $N.m^{-1}$ et un diamètre d'apex de 20 nm. La force de contact entre la pointe et la surface des globules a été fixée à 1 nN au maximum de façon à minimiser le risque d'altération des surfaces molles. La vitesse d'acquisition des images est fixée à 0.2 Hz. Le mode PeakForce QNM permet d'acquérir une courbe d'approche retrait en chaque pixel de l'image AFM pour sortir de façon automatique des cartographies des propriétés viscoélastiques. Ainsi, en parallèle aux images conventionnelles de topographie et de déflection, nous avons obtenu des cartographies représentatives de la variation du module élastique, du maximum de déformation de la surface (assimilable à la profondeur d'indentation) et de la force d'adhésion entre pointe et surface (correspondant au minimum de la courbe retrait). Plus particulièrement, des informations sur l'élasticité sont obtenues par l'ajustement de la courbe d'approche ou de retrait en utilisant le modèle de Sneddon (équation 25; Sneddon, 1965) ou le modèle de Derjaguin-Muller-Toporov (DMT; équation 26; Derjaguin et al., 1975) :

Où F est la force appliquée, le demi-angle de la pointe à forme conique, ν le coefficient de poisson (=0.5, Marsh, 2006), δ la distance d'indentation, E le module de sneddon, F_{adh} la force d'adhésion, E* le module de Young réduit et R le rayon de la pointe. Pour une meilleure visualisation, les données du module élastique DMT mesurées seront représentées sur une échelle logarithmique. Ces calculs donnent deux cartographies distinctes, complémentaires, de la variation du module élastique.

L'avantage du mode PeakForce QNM dans notre cas est d'avoir la capacité de révéler des variations de contraste issues de variation des propriétés viscoélastiques même si elles sont très faibles, étant donné la très forte sensibilité de notre système. Un second avantage est lié à la longue durée de vie des pointes AFM, préservées des contaminations qui biaiseraient les mesures de force au cours de la cartographie, en raison des très faibles forces d'appui nécessaires.

Cependant, toute mesure par AFM nécessite au préalable que les globules gras soient immobilisés sur leur support, ce qui peut être réalisé par adsorption ou réaction chimique. Pour cela, plusieurs protocoles ont été testés pour déterminer les conditions expérimentales et supports adéquats pour

une stabilité suffisante des globules au cours du balayage de la pointe. La meilleure stabilité a été obtenue en immobilisant les globules gras dans les pores d'un filtre de polycarbonate (isopore track-etched membrane filters, Millipore, Molsheim, France). Pour cela, les globules gras en suspension diluée (×20) sont filtrés à travers un entonnoir de Buchner en céramique sur lequel a été déposé un filtre polycarbonate avec des pores de 3 µm de diamètre. Une fiole à filtration est utilisée de façon à appliquer une très légère dépression produite par une trompe à eau (Figure 57). Le filtre est retourné et immédiatement fixé sur le fond de la cellule liquide en verre adapté au microscope AFM, immergé dans la solution tampon, Les globules sont repérés un par un à l'aide du microscope photonique couplé à l'AFM, puis la pointe est minutieusement approchée de la particule et balayée sur une surface recouvrant entièrement le globule.

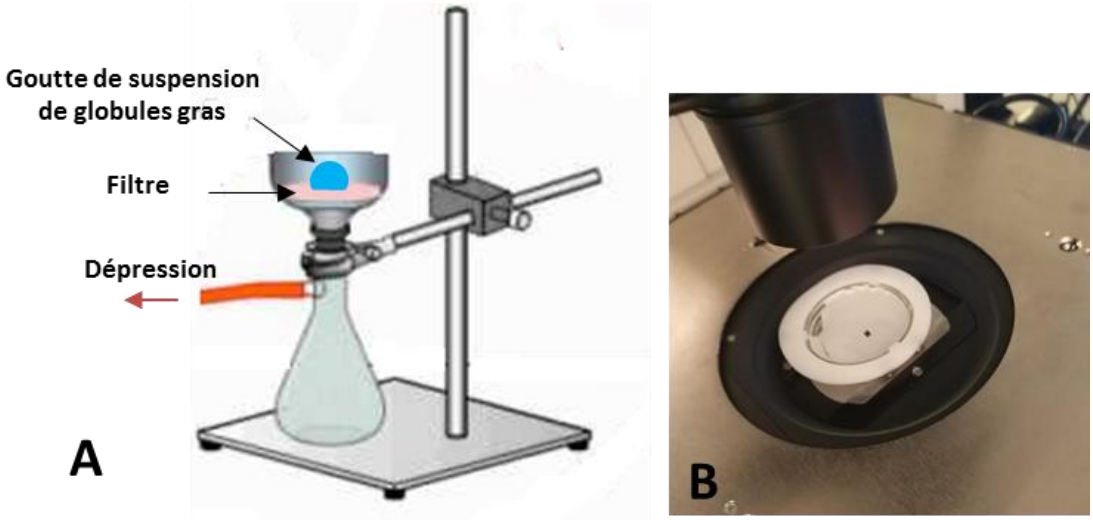


Figure 57: A) Schéma montrant l'immobilisation des globules gras sur la surface du filtre poreux ; B) Filtre déposé sur le porte échantillon du microscope AFM et de fluorescence.

8.3. Résultats et discussion

Dans un premier temps, les globules gras ont été visualisés par microscopie de fluorescence pour vérifier leur morphologie globale après les différentes étapes de préparation (écrémage, lavage, immobilisation). La Figure 58 montre les images de globules gras obtenues par microscopie photonique en contraste de phase (A) ou en fluorescence (B-E) après marquage avec la sonde fluorescente Rh-DOPE. La forme sphérique, le diamètre (1-10 µm), et la présence d'une phase continue émettant dans le rouge indiquent que la membrane biologique entourant la matière grasse des globules n'a pas été déstructurée ou altérée. Malgré la résolution du microscope à épifluorescence plus réduite que celle d'un microscope confocal, nous avons pu observer la présence de quelques domaines non fluorescents (Figure 58 C, D et E ; indiqués par des flèches blanches) montrant l'hétérogénéité de structure attendue à la surface des globules (Lopez et al., 2010; Zou et al., 2012 ; Chapitre 4). L'étape suivante de cette expérimentation était de

cartographier les propriétés nanomécaniques par AFM en mode PeakForce QNM en s'aidant du couplage par microscopie de fluorescence pour repérer les globules. Les globules présentant des domaines à leur surface sont ciblés par des repères croisés grâce auxquels la pointe AFM est positionnée avec précision sur la zone d'intérêt. Cependant, l'opacité relative du filtre de polycarbonate a rendu le positionnement de la pointe AFM très difficile lorsque celle-ci ne se situait pas à proximité d'un pore, limitant notre capacité de corréler directement une image de fluorescence d'un globule gras avec une image AFM.

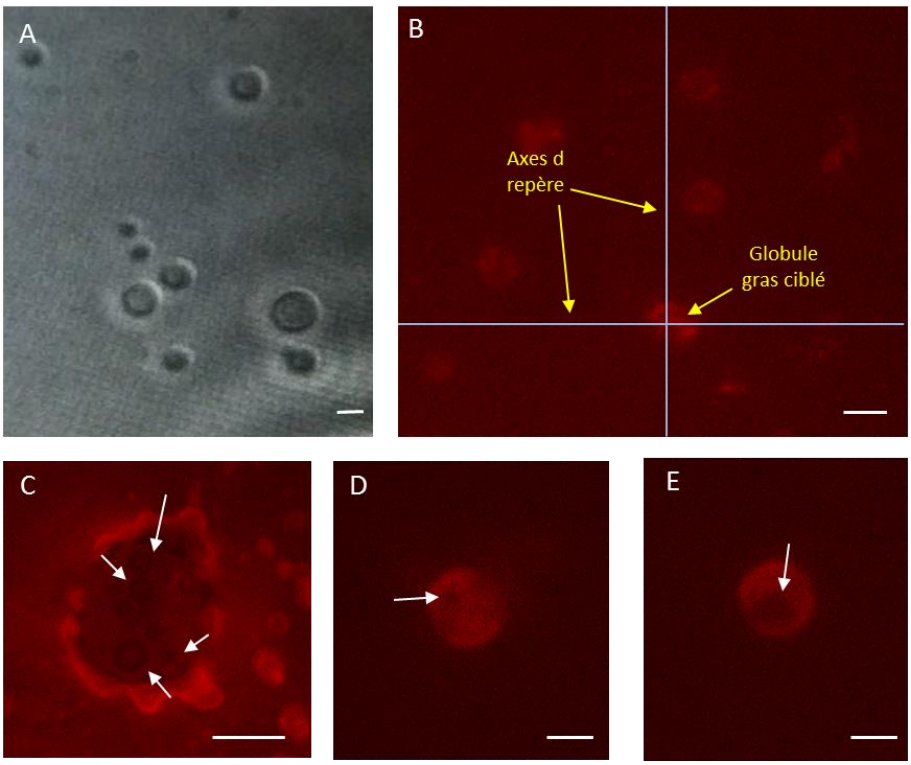


Figure 58: Images des globules gras du lait, marqués par la Rh-DOPE, obtenues par microscopie à transmission (A) et de fluorescence (B, C, D, E). La barre d'échelle est de 5 µm.

Grâce à l'AFM, nous avons pu obtenir des images à haute résolution apportant des informations sur la morphologie et les structures de surface de la MFGM native, d'une part, et les propriétés nanomécaniques, d'autre part. La forte sensibilité de mesure du mode PeakForce QNM utilisé pour cette étude ont permis de caractériser la surface fragile du globule gras dans un milieu liquide sans l'endommager. Les distances d'approche et de retrait de la pointe AFM ont été mesurées en chaque point de l'image simultanément avec la mesure de la variation de la force d'interaction pointe-surface. De là, la déconvolution des courbes approche-retrait ont permis de déduire les différentes cartographies présentées dans la Figure 59 et la Figure 60.

Les images AFM de surface 20×20 µm^2 comportent un nombre suffisant de particules pour vérifier à forte résolution spatiale la préservation de la morphologie des globules gras après leur

étape de fixation sur le filtre de polycarbonate. L'immobilité des globules gras sur ce support pendant le balayage de la pointe AFM est garantie par l'obtention d'images exploitables (Figure 59). Les images de topographie montrent la présence de particules sphériques d'un diamètre allant de 3 à 10 µm et d'une hauteur apparente de 1 à 4 µm. Ces mesures correspondent parfaitement à l'ordre de grandeur des dimensions des globules gras du lait. Il est à noter que la microscopie AFM permet de révéler de façon unique que la surface des globules natifs n'est globalement pas lisse mais arbore une nanorugosité de degré variable et que la morphologie globale n'est pas parfaitement sphérique (Figure 59 A, B, J et H). Des observations similaires ont été relevées sur des globules gras provenant d'un lait cru ou de retentat de lait ultrafiltré (Balasuriya et al., 2012). Ces différents aspects morphologiques ont été associés à l'hétérogénéité de structure de la MFGM native récemment montré par d'autres techniques de microcopie (Evers et al., 2008; Lopez, 2011; Lopez et al., 2010; Ong et al., 2010). En analysant les variations de contraste sur les cartographies de force établies à partir des modèles de Sneddon ou DMT, nous constatons des hétérogénéités sur la surface des globules gras dues aux fluctuations de leurs propriétés mécaniques (Figure 59 A, B, J et H). Ces fluctuations révèlent la présence d'une phase majoritaire quasi-continue sur la surface de module élastique plus élevé (environ 15 MPa), mais aussi l'existence de domaines dont l'élasticité est plus réduite (environ quelques centaines de kPa). De façon tout à fait similaire, la présence de plusieurs domaines distincts se retrouve en termes de déformation (profondeur de nanoindentation) et de force d'adhésion. Les domaines se déforment plus facilement et montrent une adhésion plus faible. Une déformation plus importante peut être reliée à une rigidité plus faible, et donc se retrouve logiquement avec une mesure de module élastique également plus faible. Une adhésion plus faible peut être reliée avec une capacité plus réduite d'établir des interactions moléculaires avec la pointe de nitrure de silicium. L'hétérogénéité de surface établie à partir de la variation de l'élasticité, de la déformation ou de l'adhésion a été observée sur la grande majorité des globules gras. Cependant, la surface, le nombre et la forme des domaines varient d'un globule gras à l'autre. Ceci est peut-être dû à la fraction lipidique que peut contenir chaque MFGM et qui dépend essentiellement de la synthétisation lors du mécanisme de sécrétion (Keenan and Mather, 2006). De plus, nombreux travaux ont précédemment montré par microscopie confocale que les globules gras individuels n'avaient pas forcement la même microstructure du fait de leur composition chimique probablement variable d'un individu à l'autre (Et-Thakafy et al., 2017b; Gallier et al., 2010; Lopez et al., 2010; Zou et al., 2012). Sur ces images, nous avons également remarqué la présence minoritaire de quelques particules singulières quant à leur morphologie et rugosité, et à l'absence d'hétérogénéité dans la variation de leurs propriétés mécaniques (Figure 59; entourés par des cercles jaunes, avec une forte adhésion et déformation et une faible élasticité).

Vu leur aspect lisse et plat, ces particules singulières peuvent être assimilées à des gouttelettes de matière grasse persistantes après les différentes étapes de préparation. Ainsi, pour la grande majorité des particules analysées, l'hétérogénéité mécanique est retrouvée, sous l'aspect de microdomaines de propriétés élastiques et adhérentes très faibles (Figure 59; indiqués par des flèches blanches), entourés par une phase quasi-continue dont les propriétés mécaniques sont 2 à 6 fois plus élevées. La présence supplémentaire de domaines nanométriques avec une très forte adhésion a également été observée (Figure 59 D et J ; indiqués par des flèches bleues) mais qu'on ne retrouve pas forcément contrastés en élasticité (module de DMT et de Sneddon).

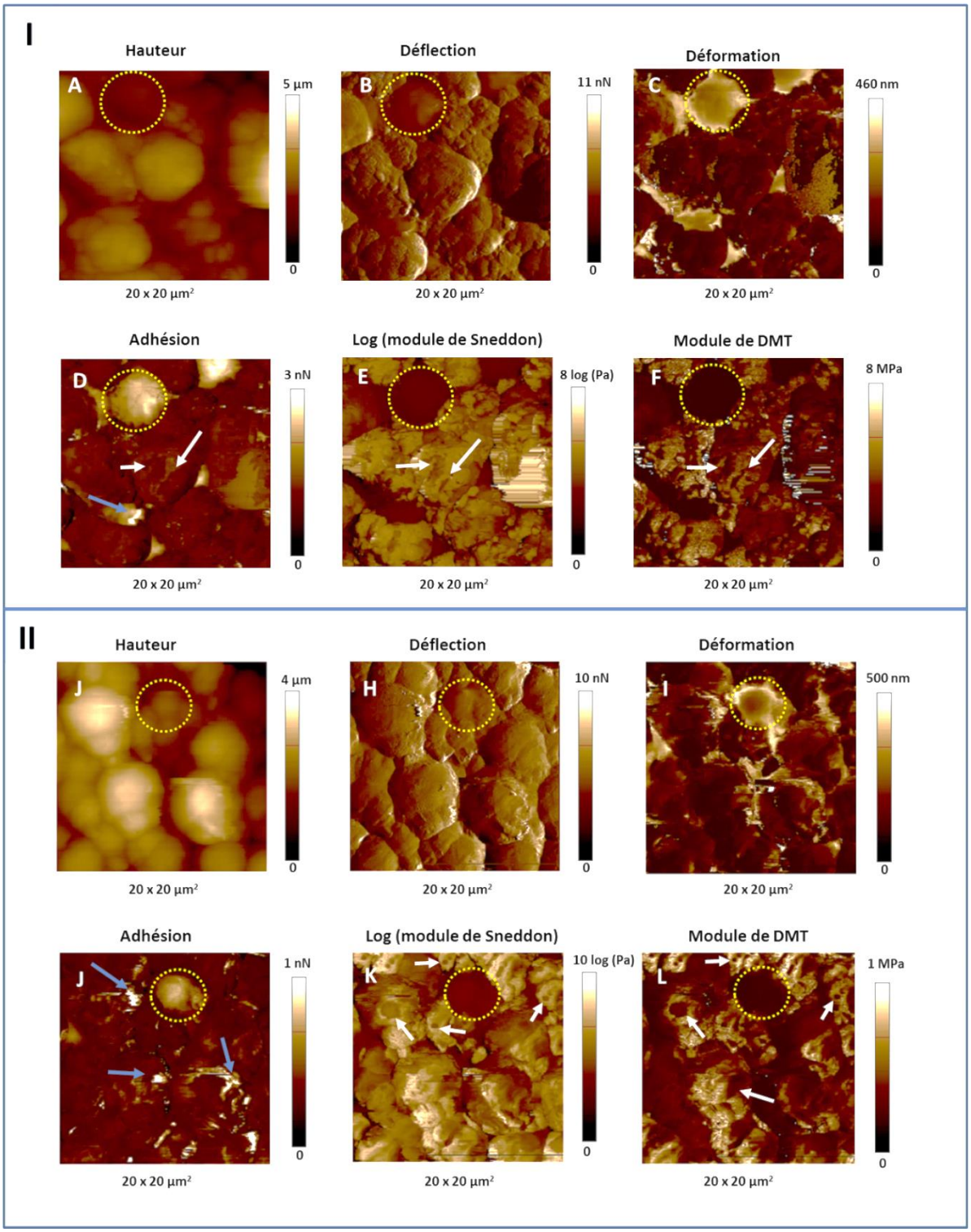


Figure 59: Cartographies AFM en mode PeakForce QNM (topographie, amplitude, déformation de surface, adhésion pointe-échantilllon, modules élastiques selon le modèle de Sneddon et DMT) acquises sur une surface de 20×20 µm2 montrant des globules gras préservés dans un tampon PIPES-NaCl à pH 6.7 et à 20°C.les flèches blanches indiquent les domaines, et les bleus indiquent les zones supposées être riche en protéines.

Pour mieux comprendre ce contraste, nous avons zoomé sur la surface de certains globules. De la même manière, la Figure 60 présente les différents paramètres décrivant les propriétés morphologiques et mécaniques de la MFGM, pour deux individus. Grâce à la résolution élevée

des images, nous avons pu repérer d'une manière plus claire la coexistence de trois phases aux comportements mécaniques différents. L'élasticité des domaines a montré des valeurs faibles où les valeurs des modules de Sneddon représentées en log ou DMT ne dépassent pas les 3 log (Pa) ou 3 MPa, respectivement. A proximité de ces domaines, nous avons aussi remarqué la présence de quelques petites zones, indiquées par des flèches bleues, de rugosité différente (Figure 60 H) et dont l'élasticité et l'adhésion (Figure 60 J et L) sont élevées. Typiquement, les valeurs du log (modules de Sneddon) ou du module DMT sont respectivement de 5 log (Pa) et de 9 MPa pour cette phase, alors que la phase continue présente des valeurs légèrement inférieures de 4 log (Pa) et de 6 MPa, respectivement ; tout en restant nettement supérieures aux valeurs constatées sur les domaines.

Les valeurs de module de Young calculées sur des systèmes modèles sont de l'ordre du MPa ou de quelques dizaines de MPa pour les bicouches de lipides polaires en phase fluide, et de quelques dizaines à quelques centaines de MPa pour les bicouches de lipides polaires en phase gel (chapitre 7, Et-Thakafy et al., 2017a). Balasuryia et al. (2012) ont montré que la surface des globules gras du lait cru est caractérisée par une faible élasticité dont la valeur moyenne du module de Young était de l'ordre de 50 kPa. En comparaison, nos résultats sont légèrement élevés mais restent assez faibles par rapport aux membranes modèles. Par rapport à ces valeurs, les modules DMT trouvés ici sont significativement plus faibles. Cet écart pourrait s'expliquer par l'application de formalismes différents pour les deux approches ; le calcul automatique étant peut-être quantitativement moins fiable (les constructeurs ne faisant pas eux-mêmes l'analogie entre ce module DMT et le module de Young).

Sur des systèmes modèles composés uniquement de lipides polaires laitiers, des paramètres comme la résistance à la rupture ou le module de Young enregistrés sur les domaines (riche en SM) en phase gel étaient plus élevés que ceux mesurés dans la phase fluide dispersante (Guyomarc'h et al., 2014; Murthy et al., 2016a). Cette différence de comportement nanomécanique peut se comprendre si l'on prend en compte la contribution des protéines, qui introduit une grande différence entre systèmes modèles et système naturel. Contrairement aux systèmes modèles, la MFGM contient 25-60 % (en masse) de protéines dont une grande partie sous forme glycosylée et localisée à la surface de la membrane (Mather, 2011). Des travaux récents ont révélé, à l'aide de la microscopie confocale, que les glycoprotéines sont réparties de façon hétérogène dans le plan de la MFGM en formant des patches ou des réseaux, localisés dans la phase continue (Evers et al., 2008; Lopez, 2011). De plus, l'agrégation de ces protéines peut augmenter la rugosité de la membrane ce qui a été récemment observé à l'interface des globules

gras homogénéisés riche en protéines (Balasuriya et al., 2012). Du fait de leur propriétés physico-chimiques, les protéines montrent d'importantes propriétés élastiques et adhésives ayant la capacité d'augmenter la rigidité de la membrane lipidique (Gosline et al., 2002; Schaap et al., 2012).

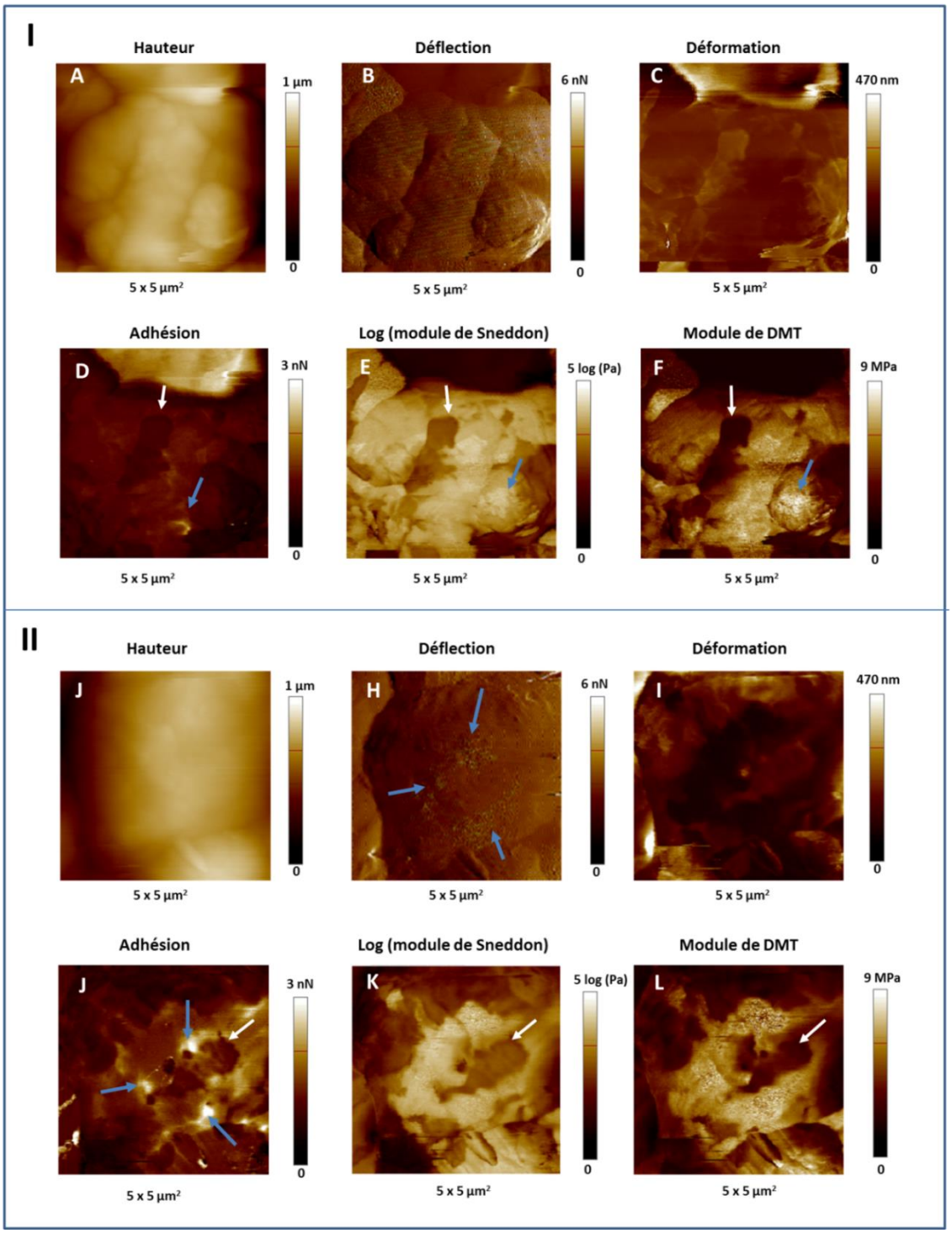


Figure 60: Cartographies AFM en mode PeakForce QNM (topographie, amplitude, déformation de surface, adhésion pointe-échantilllon, modules élastiques selon le modèle de Sneddon et DMT) acquises sur une surface de 5×5 µm2 montrant la surface de deux globules gras différents dans un milieu liquide PIPES-NaCl à pH 6.7 et à 20°C. les flèches blanches indiquent les domaines, et les bleus indiquent les zones supposées être riche en protéines.

En se basant sur ces données de la littérature, le contraste mécanique à trois phases, observé à la surface des globules gras, peut être interprété par la ségrégation latérale des lipides saturés notamment la milk SM (30% de lipides totaux, taches sombres sur la Figure 61), et par une coexistence entre les lipides insaturés et les protéines dans la phase continue, les protéines étant organisées en patches (taches très claires) ou dispersées (phase continue claire). On suppose que les modules élastiques plus élevés de la phase continue (par rapport aux domaines) sont dus à la présence de protéines membranaires dans la matrice fluide continue.

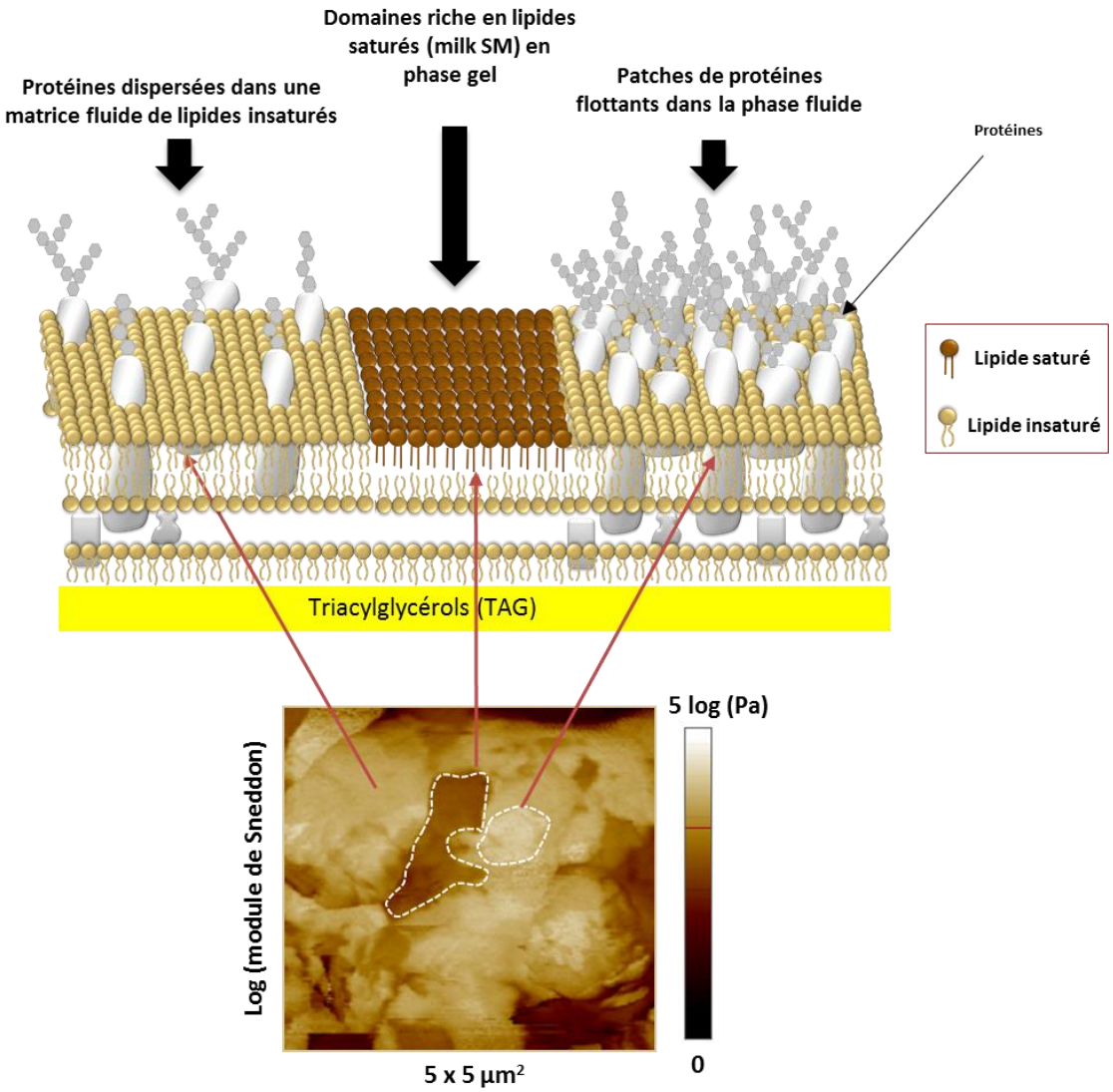


Figure 61: Schéma représentatif en 2D de la bicouche externe de la MFGM montrant les différentes compositions et structure des trois phases de propriétés mécaniques différentes observées à la surface du globule gras.

En revanche, l'interprétation plus poussée de ces résultats est rendue difficile par l'absence d'un couplage réussi entre la microscopie AFM et la microscopie de fluorescence, qui aurait permis de

prouver que les domaines identifiés par AFM correspondent bien à ceux visualisés par fluorescence.

8.4. Conclusion

Le travail présenté dans ce dernier chapitre avait pour but de vérifier si l'hétérogénéité de structure de la membrane du globule gras natif est reliée à une variation des propriétés mécaniques. Nous avons essayé de comprendre l'effet de la composition chimique complexe sur la modulation des propriétés physiques à l'échelle de la membrane biologique en mesurant les propriétés nanomécaniques des nanostructures observées. Une corrélation directe entre nanostructure et nanomécanique a été tentée en utilisant un système couplé entre microscopie d'épifluorescence et AFM. Cependant, des difficultés expérimentales liées à l'opacité du support n'ont pas permis d'obtenir un lien direct entre signal de fluorescence et mesure par AFM. Malgré cela, nous avons pu retrouver sur les surfaces molles et fragile des globules gras les émissions de fluorescence attendues, et acquérir séparément des cartographies des propriétés nanomécaniques (déformation, adhésion, module élastique selon les modèles de Sneddon et DMT) corrélées à des images de topographie AFM à haute résolution. Nous avons constaté la présence d'une certaine hétérogénéité des propriétés nanomécaniques qui montrent la coexistence de plusieurs phases distinctes, et vérifier ainsi notre précédente hypothèse. De manière inattendue, les domaines attribués à la présence dominante de milk SM en phase gel ont montré systématiquement une élasticité plus faible que la phase continue, selon les deux modèles mécaniques utilisés – Sneddon et DMT, ainsi qu'une adhésion moins importante et une déformation locale plus importante, en comparaison avec la phase continue en phase fluide. Ces résultats sont a priori contradictoires avec ce qui est logiquement attendu pour les phases pures gel et fluide, et peuvent témoigner de la complexité des systèmes biologiques natifs, qui ne contiennent pas de protéines. L'influence sur les propriétés nanomécaniques de phénomènes locaux comme l'association entre lipides polaires et protéines, ou la formation d'agrégats protéiques, pourrait expliquer les écarts constatés avec les propriétés mécaniques de phases modèles initialement pures. Au-delà de la recherche d'un couplage réussi, une perspective importante de ces travaux serait de compléter nos valeurs de références en disposant de mesures faites sur des liposomes modèles enrichis en protéines.

De ce chapitre, on retient:

Une hétérogénéité structurale et mécanique existe à la surface du globule gras du lait à 20°C.

La caractérisation par spectroscopie de force a montré la présence de trois phases de réponses mécaniques différentes.

Les propriétés mécaniques des zones supposées être les domaines riches en milk SM étaient très faibles par rapport aux deux autres phases qui les entourent. Ceci est contraire aux références que nous avons obtenues sur des membranes modèles et a été interprété par un rôle rigidifiant exercé par la présence de protéines membranaires dispersées ou ségrégées en domaines dans la phase continue fluide.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Ce travail visait à comprendre comment l'hétérogénéité d'organisation des lipides polaires, en lien avec leur composition, module les propriétés mécaniques des membranes, en particulier leurs propriétés élastiques, à l'échelle nanométrique. L'originalité de cette thèse résidait dans la mise en place d'outils non invasifs et de méthodes de calcul adaptées, en vue de la caractérisation de données telles que le module de Young ou la rigidité de courbure de membranes obtenues à partir de lipides polaires laitiers. Le challenge de cette étude était la difficulté de manipuler des membranes biologiques complexes, en particulier celle du globule gras. Dans un premier temps, l'organisation des lipides polaires a été caractérisée in situ dans le lait pour une meilleure connaissance de la microstructure de la membrane du globule gras. Grâce à l'emploi de la microscopie confocale, nous avons ainsi caractérisé la dynamique des domaines lipidiques en fonction de la température et du temps, qui sont deux paramètres importants en industrie laitière. La microstructure de la membrane du globule gras s'est révélée très sensible aux changements thermiques et à la durée de stockage. D'une part, le chauffage a entraîné la diminution de taille, la disparition, la diffusion ou la coalescence des domaines. D'autre part, un refroidissement rapide a conduit à des phénomènes de nucléation traduits par l'apparition de plusieurs petits domaines qui croissent au cours du temps de stockage pour former de gros domaines. La présence de domaines, et le fait que certains fondent à haute température et d'autres non, ont été interprétés comme la coexistence de trois phases : gel, fluide et liquide ordonné.

Dans un deuxième temps, nous sommes passés à la caractérisation mécanique des membranes modèles composés de lipides polaires laitiers. Pour nous affranchir des protéines membranaires et du cœur de triglycérides, nous avons choisi de travailler avec des bicouches lipidiques, afin de pouvoir clairement associer une réponse mécanique à une composition donnée. Associée à d'autres techniques biophysiques, l'AFM nous a permis d'évaluer les propriétés mécaniques de ces bicouches dans un milieu liquide proche de la phase aqueuse du lait. Malheureusement, nous n'avons pu réaliser de grandes vésicules unilamellaires, qui nous auraient permis à la fois d'observer la séparation des phases à l'échelle submicrométrique et de cartographier le module de Young sur la surface de ces objets, tout en ayant des informations sur leur rigidité de courbure. Pour contourner cette difficulté, plusieurs systèmes modèles ont été utilisés selon l'objectif et la composition lipidique étudiée :

- Pour étudier l'hétérogénéité mécanique liée à la présence de domaines, nous avons utilisé des bicouches supportées composées d'un mélange complexe de lipides polaires extraits de la MFGM, en présence ou non de cholestérol. Grâce à la planéité et aux grandes dimensions de ces systèmes bidimensionnels, nous avons pu indenter de grandes surfaces à l'aide de l'AFM.

Ainsi, un contraste mécanique a bien été observé en corrélation avec la présence de domaines en phase gel, qui possèdent un module de Young plus élevés que la phase fluide continue. En chauffant, ces domaines fondent et la membrane présente un module de Young uniforme, caractéristique d'une phase fluide. Si les domaines sont en phase liquide ordonné, comme nous l'avons testé sur des modèles milk SM/chol, nous montrons qu'ils présentent un module d'Young faible, comme une phase fluide, et surtout que ce module ne change pas avec une variation de température, ce qui correspond bien à l'absence d'une transition de phase caractéristique de cette phase.

- Pour comprendre l'effet de l'état de phase et de la composition lipidique, nous avons exploré les propriétés mécaniques d'assemblages de lipides polaires organisés en liposomes, structures tridimensionnelles mimant la courbure du globule gras du lait, en utilisant la nano indentation par AFM. De plus, ce système nous a permis de d'évaluer finement les valeurs d'élasticité des membranes sans qu'elles soient affectées par le support. Nous avons utilisé trois lipides modèles, à savoir deux composés homogènes, le DOPC (fluide à 20°C) et le DPPC (gel à 20°C), ou hétérogène comme la milk SM (gel à 20°C). Ce choix de lipides représente les deux principales caractéristiques de la MFGM qui sont l'hétérogénéité de phase et l'hétérogénéité de composition en acides gras de la milk SM, qui compose majoritairement les domaines de la MFGM. En comparant ces lipides dans les mêmes conditions (température, tampon, pH...), nous avons observé que le module de Young et la rigidité de courbure des membranes de DOPC étaient inférieurs à ceux du DPPC, en raison de leur différence d'état de phase à 20°C induite par leurs structures moléculaires respectives. Malgré sa teneur élevée en acides gras saturés à longue chaines, les membranes de milk SM ont montré un module de Young intermédiaire entre ceux observés sur les membranes de DOPC et de DPPC. Ce résultat nous a conduits à émettre l'hypothèse que la présence de plusieurs espèces moléculaires est responsable du comportement élastique de la milk SM. Nous avons pu ensuite vérifier cette hypothèse à l'aide de mesures de force réalisées sur des liposomes modèles composés de SM synthétiques (C16:0-SM, C24 :0-SM, C24:0-SM) appartenant à la gamme des molécules composant la milk SM. L'étude de ces systèmes dans leur état pur ou en mélange en phase gel, nous a permis de conclure que la composition lipidique contrôle les propriétés thermotropes et élastiques des membranes. Ainsi, l'introduction d'acides gras à chaîne plus courte ou insaturée dans une membrane initialement très rigide entraîne une diminution de sa température de transition caractéristique, de son module d'Young et de sa rigidité de courbure.

En résumé, l'approche par indentation AFM et calcul du module d'Young ou de la rigidité de courbure présente bien un intérêt comparatif. La différence d'élasticité entre les deux phases fluide

et gel est observée quel que soit le système ; en revanche, les mesures sont plus exactes et la différence est plus significative sur les liposomes où les membranes en phase gel présentent des modules d'Young de l'ordre de plusieurs dizaines à quelques centaines de MPa, et peuvent être 6 à 20 plus élevés que ceux de membranes en phase fluide.

Après avoir obtenu des valeurs de référence sur des objets simples, nous avons testé l'objet réel en recherchant sur la membrane du globule gras natif si une hétérogénéité mécanique était également présente en surface des globules. Pour cela, nous avons utilisé une technique de couplage permettant de combiner la microscopie optique de fluorescence et l'AFM. Notre objectif était d'établir le lien entre la présence de domaines détectés à l'aide d'un marquage par fluorescence et l'hétérogénéité mécanique enregistrée par cartographie de force par AFM. Ces caractérisations ont pu être réalisées mais séparément, car il a été impossible de réaliser le couplage pour des raisons techniques. Le résultat majeur préliminaire obtenu de cette expérience est qu'un contraste mécanique à trois phases existe à la surface du globule gras. Les zones interprétées comme étant les domaines ont montré des valeurs d'élasticité très faibles par rapport à la phase continue qui les entoure. Ces résultats peuvent être attribués à la présence d'autres composants, comme les protéines, qui rigidifieraient la phase fluide où elles semblent majoritairement présentes. De plus, les valeurs d'élasticité ont été généralement inférieures à celles récemment enregistrées sur les systèmes modèles, complexes ou simplifiés, mais sont en revanche dans l'ordre de grandeur des modules d'Young publiés pour d'autres objets réels, comme des cellules. Ceci peut être lié à la présence du cholestérol, dont la teneur exacte et la répartition dans les membranes sont mal connues, mais qui impacterait certainement les propriétés de la MFGM, comme nous l'avons vu sur la milk SM en liquide ordonné.

En conclusion, ce travail de thèse a posé les jalons d'une évaluation comparative des propriétés élastiques de différentes membranes, en établissant une approche fine et non-invasive de mesures d'indentation pour calculer des réponses telles que le module d'Young. Sa mise en œuvre sur des liposomes ouvre également la voie à une caractérisation de la courbure. Cependant, il n'a pas été possible de réaliser ces mesures comparatives in-situ, sur des objets biphasiques, faute de maîtriser la formation et la manipulation des GUV. Plus important, il n'a pas été possible de relier de façon certaine l'hétérogénéité mécanique observée en surface d'un globule gras, ni à l'observation des domaines par microscopie de fluorescence, ni aux valeurs de modules d'Young obtenues sur les références DOPC, DPPC et milk SM. Si le premier verrou est technique et pourrait probablement être levé à court terme, le second verrou questionne l'usage des vésicules comme modèles de membranes biologiques, très riches en protéines et en cholestérol. Pour autant, les

données obtenues lors de cette thèse sont également intéressantes pour leur application en formulation de liposomes, où les propriétés recherchées (stabilité, rigidité) peuvent être ainsi contrôlées.

Perspectives:

Ce travail s'ouvre donc sur plusieurs perspectives possibles, scientifiques ou technologiques:

(i) A court terme :

L'acquisition et la maîtrise de la technologie de fabrication de vésicules unilamellaires géantes nous permettrait d'améliorer significativement notre modèle en fabricant des liposomes biphasiques de même dimension que le globule gras. Ces GUV offrent la possibilité, d'après la littérature, de former les domaines en phase gel ou liquide ordonné. Parallèlement, l'objectif d'un couplage entre microscopie de fluorescence (ou confocale) et microscopie AFM plus performant et plus résolu est évidemment à poursuivre. La recherche d'un support d'immobilisation transparent est un premier pas vers cet objectif, que ce soit pour visualiser une GUV ou un globule gras natif.

Concrètement, la fabrication et la caractérisation des GUV par un couplage fluorescence/AFM nécessite la mise en place de plusieurs protocoles. Pour préparer les GUV par électro formation, le choix du rapport molaire des composants ainsi que de la/les sondes fluorescentes reposent sur la nature des lipides polaires laitiers et la complexité de leur composition (e.g. milk SM). Il faut aussi adapter les paramètres d'électroformation utilisés, en fonction de la composition lipidique et le milieu d'hydratation, comme la tension, la fréquence ou le temps. Pour la caractérisation par AFM, les GUV doivent être stables et immobilisées par un moyen chimique ou mécanique sans les endommager car ceci est une étape indispensable pour pouvoir effectuer des mesures de forces par indentation. La cellule d'électroformation elle-même pourrait servir de support, si ses dimensions sont compatibles avec les microscopes. Il est peut-être ainsi possible d'interrompre l'électroformation avant que la ou les GUV ne se détachent.

D'un point de vue mathématique, l'utilisation de GUV suppose enfin de rechercher ou d'adapter les modèles de calcul du module d'Young. Le travail du groupe de Janshoff, en Allemagne, est de ce point de vue prometteur (Schäfer et al., 2015).

(ii) A moyen terme :

Pour une meilleure compréhension des membranes biologiques, il faudra également prendre en considération la présence des protéines, car elles interviennent dans la

structuration de la membrane et semblent avoir la capacité d'entrainer de lourdes modifications sur les propriétés élastiques des membranes (Balasuriya et al., 2012; chapitre 8). La formation de vésicules contenant des protéines transmembranaires pourrait être mise au point, et l'effet des protéines sur l'élasticité de la membrane pourrait être testé en fonction de la composition lipidique de départ, de l'état de phase du lipide, etc…

(iii) A plus long terme :

L'amélioration des connaissances sur les propriétés physiques de la membrane du globule gras du lait doit nous aider à comprendre et à anticiper les modifications de ses propriétés fonctionnelles. Par exemple, comprendre ce qui détermine la stabilité du globule gras au cours des traitements physiques pourrait nous aider à mieux maîtriser les variations de température et/ou aux cisaillements propres aux opérations de transformation laitière. En se basant sur les données théoriques, obtenues sur des objets modèles, il pourrait être possible d'évaluer la résistance de la membrane protégeant le globule ou d'expliquer ses fragilités (par exemple la ligne d'interphase entre domaines et phase fluide) et les prévenir. Ceci peut contribuer à savoir contrôler les paramètres utilisés en technologie laitière, d'un point de vue économique ou technologique.

Dans un autre cadre et comme application, les lipides polaires laitiers peuvent être utilisés dans la conception de nouveaux modèles de liposomes dédiés à l'encapsulation. Leur origine naturelle attribue à ces lipides plusieurs qualités liées à leur toxicité faible voire nulle, leur biodégradabilité, leur biocompatibilité et leur valeur nutritionnelle. Les liposomes ont la capacité d'encapsuler les molécules bioactives, soit dans la phase aqueuse interne pour les molécules hydrophiles, soit dans la membrane pour les composés hydrophobes. La libération de ces molécules dépend essentiellement de la perméabilité de la paroi du liposome qui, à son tour, dépend des propriétés physiques de la membrane. Les résultats de ce travail ont montré qu'on peut contrôler les propriétés physiques d'un liposome en modifiant sa composition lipidique. Par exemple, les liposomes à base de milk SM peuvent représenter un système d'encapsulation potentiel en raison de sa température de transition de phase caractéristique, Tm, qui est proche de 37°C. Ainsi, un liposome de milk SM en phase gel serait rigide et stable aux températures de stockage (froid ou ambiant) mais fluctuerait entre deux phases à température physiologique, ce qui pourrait permettre de larguer son contenu. Grâce à ce travail, les connaissances acquises sur les propriétés thermotropes et élastiques des membranes composées de lipides polaires laitiers vont peut-être aider à guider le choix des concepteurs en fonction de l'objectif d'utilisation ou le domaine d'application.

Références

Alais, C., Linden, G., 1997. Abrégé de biochimie alimentaire. 4e éd.

Alessandrini, A., Facci, P., 2014. Phase transitions in supported lipid bilayers studied by AFM. Soft Matter 10, 7145. doi:10.1039/C4SM01104J

Anderson, M., Cheeseman, G.C., Knight, D.J., Shipe, W.F., 1972. The effect of ageing cooled milk on the composition of the fat globule membrane. J. Dairy Res. 39, 95. doi:10.1017/S0022029900013893

Avalli, A., Contarini, G., 2005. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. J. Chromatogr. A 1071, 185–190.

Balasuriya, T.S., Ong, L., Gras, S.L., Dagastine, R.R., 2012. Changes in morphological and nano-mechanical properties of the milk fat globule membrane during processing. RSC Adv. 2, 2384. doi:10.1039/c2ra00844k

Bangham, A.D., 1992. Liposomes: realizing their promise. Hosp. Pract. 27, 51–62.

Barenholz, Y., Thompson, T.E., 1999. Sphingomyelin: biophysical aspects. Chem. Phys. Lipids 102, 29–34.

Bargmann, W., Knoop, A., 1959. Morphology of lactation; light & electro-microscopic studies on the mammary glands of rats. Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948 49, 344.

Barthes-Biesel, D., 1998. Mechanics of encapsulated droplets. Struct. Dyn. Prop. Disperse Colloidal Syst. 58–64.

Barthes-Biesel, D., 1991. Role of interfacial properties on the motion and deformation of capsules in shear flow. Phys. Stat. Mech. Its Appl. 172, 103–124.

Baumgart, T., Das, S., Webb, W.W., Jenkins, J.T., 2005. Membrane Elasticity in Giant Vesicles with Fluid Phase Coexistence. Biophys. J. 89, 1067–1080. doi:10.1529/biophysj.104.049692

Baumgart, T., Hess, S.T., Webb, W.W., 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. Nature 425, 821.

Baumrucker, C., Keenan, T., 1973. Membranes of mammary gland. VII. Stability of milk fat globule membrane in secreted milk. J. Dairy Sci. 56, 1092–1094.

Berry, J.D., Mettu, S., Dagastine, R.R., 2017. Precise measurements of capsule mechanical properties using indentation. Soft Matter 13, 1943–1947. doi:10.1039/C6SM02841A

Bezelgues, J.-B., Morgan, F., Palomo, G., Crosset-Perrotin, L., Ducret, P., 2009. Short communication: Milk fat globule membrane as a potential delivery system for liposoluble nutrients. J. Dairy Sci. 92, 2524–2528. doi:10.3168/jds.2008-1725

Bezlyepkina, N., Gracià, R.S., Shchelokovskyy, P., Lipowsky, R., Dimova, R., 2013. Phase Diagram and Tie-Line Determination for the Ternary Mixture DOPC/eSM/Cholesterol. Biophys. J. 104, 1456–1464. doi:10.1016/j.bpj.2013.02.024

Bhatia, T., Husen, P., Ipsen, J.H., Bagatolli, L.A., Simonsen, A.C., 2014. Fluid domain patterns in free-standing membranes captured on a solid support. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1838, 2503–2510. doi:10.1016/j.bbamem.2014.05.016

Binder, W.H., Barragan, V., Menger, F.M., 2003. Domains and Rafts in Lipid Membranes. Angew. Chem. Int. Ed. 42, 5802–5827. doi:10.1002/anie.200300586

Bitman, J., Wood, D., 1990. Changes in milk fat phospholipids during lactation. J. Dairy Sci. 73, 1208–1216.

Bolling, J., Duncan, S., Eigel, W., Waterman, K., 2005. Processing effects on physicochemical properties of creams formulated with modified milk fat. J. Dairy Sci. 88, 1342–1351.

Britten, M., Lamothe, S., Robitaille, G., 2008. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. Int. J. Food Sci. Technol. 43, 651–657. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01501.x

Brown, D., London, E., 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. J. Membr. Biol. 164, 103–114.

Bunge, A., Müller, P., Stöckl, M., Herrmann, A., Huster, D., 2008. Characterization of the Ternary Mixture of Sphingomyelin, POPC, and Cholesterol: Support for an Inhomogeneous Lipid Distribution at High Temperatures. Biophys. J. 94, 2680–2690. doi:10.1529/biophysj.107.112904

Butt, H.-J., Franz, V., 2002a. Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. I. Theory. Phys. Rev. E 66, 031601.

Butt, H.-J., Franz, V., 2002b. Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. I. Theory. Phys. Rev. E 66. doi:10.1103/PhysRevE.66.031601

Byrdwell, W.C., Perry, R.H., 2007. Liquid chromatography with dual parallel mass spectrometry and 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy for analysis of sphingomyelin and dihydrosphingomyelin. J. Chromatogr. A 1146, 164–185. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.108

Cai, M., Zhao, W., Shang, X., Jiang, J., Ji, H., Tang, Z., Wang, H., 2012. Direct Evidence of Lipid Rafts by in situ Atomic Force Microscopy. Small 8, 1243–1250. doi:10.1002/smll.201102183

Calò, A., Reguera, D., Oncins, G., Persuy, M.-A., Sanz, G., Lobasso, S., Corcelli, A., Pajot-Augy, E., Gomila, G., 2014. Force measurements on natural membrane nanovesicles reveal a composition-independent, high Young's modulus. Nanoscale 6, 2275–2285.

Carravilla, P., Nieva, J.L., Goñi, F.M., Requejo-Isidro, J., Huarte, N., 2015. Two-Photon Laurdan Studies of the Ternary Lipid Mixture DOPC:SM:Cholesterol Reveal a Single Liquid Phase at Sphingomyelin:Cholesterol Ratios Lower Than 1. Langmuir 31, 2808–2817. doi:10.1021/la504251u

Castro-Gómez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F., Fontecha, J., 2015. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids PLEFA 101, 41–51. doi:10.1016/j.plefa.2015.07.004

Chatterton, D.E., Nguyen, D.N., Bering, S.B., Sangild, P.T., 2013. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 1730–1747.

Chemin, C., Bourgaux, C., Péan, J.-M., Pabst, G., Wüthrich, P., Couvreur, P., Ollivon, M., 2008. Consequences of ions and pH on the supramolecular organization of sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. Chem. Phys. Lipids 153, 119–129. doi:10.1016/j.chemphyslip.2008.03.002

Chen, D., Santore, M.M., 2014. 1,2-Dipalmitoyl- *sn* -glycero-3-phosphocholine (DPPC)-Rich Domain Formation in Binary Phospholipid Vesicle Membranes: Two-Dimensional Nucleation and Growth. Langmuir 30, 9484–9493. doi:10.1021/la502089t

Chen, Q., Vancso, G.J., 2011. pH Dependent Elasticity of Polystyrene-block-poly(acrylic acid) Vesicle Shell Membranes by Atomic Force Microscopy. Macromol. Rapid Commun. 32, 1704–1709. doi:10.1002/marc.201100332

Cheng, K., Ropers, M.-H., Lopez, C., 2017. The miscibility of milk sphingomyelin and cholesterol is affected by temperature and surface pressure in mixed Langmuir monolayers. Food Chem. 224, 114–123. doi:10.1016/j.foodchem.2016.12.035

Chiu, M.H., Prenner, E.J., 2011. Differential scanning calorimetry: an invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. J. Pharm. Bioallied Sci. 3, 39.

Christie, W.W., Anne Urwin, R., 1995. Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases. J. Sep. Sci. 18, 97–100.

Colas, J.-C., Shi, W., Rao, V.M., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H., 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. Micron 38, 841–847.

Connell, S.D., Heath, G., Olmsted, P.D., Kisil, A., 2013. Critical point fluctuations in supported lipid membranes. Faraday Discuss 161, 91–111. doi:10.1039/C2FD20119D

Contarini, G., Povolo, M., 2013. Phospholipids in Milk Fat: Composition, Biological and Technological Significance, and Analytical Strategies. Int. J. Mol. Sci. 14, 2808–2831. doi:10.3390/ijms14022808

Csiszár, A., Hoffmann, B., Merkel, R., 2009. Double-shell giant vesicles mimicking Gram-negative cell wall behavior during dehydration. Langmuir 25, 5753–5761.

Cuellar, J.L., Llarena, I., Moya, S.E., Donath, E., 2013. Indentation of highly charged pspm brushes measured by force spectroscopy: application of a compressible fluid model. Macromolecules 46, 2323–2330.

De Almeida, R.F., Fedorov, A., Prieto, M., 2003. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. Biophys. J. 85, 2406–2416.

Deeth, H.C., 1997. The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. Aust. J. Dairy Technol. 52, 44.

Delorme, N., Dubois, M., Garnier, S., Laschewsky, A., Weinkamer, R., Zemb, T., Fery, A., 2006. Surface immobilization and mechanical properties of catanionic hollow faceted polyhedrons. J. Phys. Chem. B 110, 1752–1758.

Delorme, N., Fery, A., 2006. Direct method to study membrane rigidity of small vesicles based on atomic force microscope force spectroscopy. Phys. Rev. E 74. doi:10.1103/PhysRevE.74.030901

Derjaguin, B.V., Muller, V.M., Toporov, Y.P., 1975. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. J. Colloid Interface Sci. 53, 314–326.

Devoiselle, J., 1997. Les liposomes, aspects pharmaceutiques, comportement in vivo et réalités cliniques. Lett. Pharmacol. 11, 203–209.

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Van Camp, J., 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. Int. Dairy J. 18, 436–457. doi:10.1016/j.idairyj.2007.10.014

Dieluweit, S., Csiszár, A., Rubner, W., Fleischhauer, J., Houben, S., Merkel, R., 2010. Mechanical Properties of Bare and Protein-Coated Giant Unilamellar Phospholipid Vesicles. A Comparative Study of Micropipet Aspiration and Atomic Force Microscopy. Langmuir 26, 11041–11049. doi:10.1021/la1005242

Dimitriadis, E.K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B., Chadwick, R.S., 2002. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. Biophys. J. 82, 2798–2810.

Dimitrievski, K., Kasemo, B., 2008. Simulations of lipid vesicle adsorption for different lipid mixtures. Langmuir 24, 4077–4091.

Drummond, C.J., Senden, T.J., 1994. Examination of the geometry of long-range tip—sample interaction in atomic force microscopy. Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 87, 217–234.

Dufrêne, Y.F., 2004. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. Nat. Rev. Microbiol. 2, 451.

Duwe, H. de, Sackmann, E., 1990. Bending elasticity and thermal excitations of lipid bilayer vesicles: modulation by solutes. Phys. Stat. Mech. Its Appl. 163, 410–428.

Eeman, M., Deleu, M., 2010. From biological membranes to biomimetic model membranes. Biotechnol. Agron. Société Environ. 14, 719.

Epand, R., Epand, R., 1980. Studies of thermotropic phospholipid phase transitions using scanning densitometry. Chem. Phys. Lipids 27, 139–150.

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Mériadec, C., Artzner, F., Lopez, C., Guyomarc'h, F., 2017a. Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy. Langmuir 33, 5117–5126. doi:10.1021/acs.langmuir.7b00363

Et-Thakafy, O., Guyomarc'h, F., Lopez, C., 2017b. Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time. Food Chem. 220, 352–361. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.017

Evans, E., 1990. Adhesion of surfactant—membrane covered droplets: Special features and curvature elasticity effects. Colloids Surf. 43, 327–347.

Evans, E., Needham, D., 1987. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. J. Phys. Chem. 91, 4219–4228.

Evans, E., Rawicz, W., 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. Phys. Rev. Lett. 64, 2094.

Evans, E.A., 1983. Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests. Biophys. J. 43, 27–30.

Evers, J.M., 2004. The milkfat globule membrane—methodologies for measuring milkfat globule (membrane) damage. Int. Dairy J. 14, 747–760. doi:10.1016/j.idairyj.2004.01.006

Evers, J.M., 2004. The milkfat globule membrane—compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. Int. Dairy J. 14, 661–674.

Evers, J.M., Haverkamp, R.G., Holroyd, S.E., Jameson, G.B., Mackenzie, D.D.S., McCarthy, O.J., 2008. Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. Int. Dairy J. 18, 1081–1089. doi:10.1016/j.idairyj.2008.06.001

Fa, N., Ronkart, S., Schanck, A., Deleu, M., Gaigneaux, A., Goormaghtigh, E., Mingeot-Leclercq, M.-P., 2006. Effect of the antibiotic azithromycin on thermotropic behavior of DOPC or DPPC bilayers. Chem. Phys. Lipids 144, 108–116. doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.08.002

Farhang, B., Kakuda, Y., Corredig, M., 2012. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. Dairy Sci. Technol. 92, 353–366. doi:10.1007/s13594-012-0072-7

Filippov, A., Orädd, G., Lindblom, G., 2006. Sphingomyelin Structure Influences the Lateral Diffusion and Raft Formation in Lipid Bilayers. Biophys. J. 90, 2086–2092. doi:10.1529/biophysj.105.075150

Flügge, W., 1973. Thin elastic shells. Springer Berl.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226, 497–509.

Fong, B.Y., Norris, C.S., MacGibbon, A.K., 2007. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. Int. Dairy J. 17, 275–288.

Fox, P., McSweeney, P., 2003. Advanced dairy chemistry. Vol. 1, Proteins. P. A. Kluwer Academic/Plenum.

Franke, W.W., Heid, H.W., Grund, C., Winter, S., Freudenstein, C., Schmid, E., Jarasch, E.-D., Keenan, T.W., 1981. Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein: specific location in apical regions of lactating epithelial cells. J. Cell Biol. 89, 485–494.

Franz, V., Loi, S., Müller, H., Bamberg, E., Butt, H.-J., 2002. Tip penetration through lipid bilayers in atomic force microscopy. Colloids Surf. B Biointerfaces 23, 191–200.

Gallier, S., Gragson, D., Jiménez-Flores, R., Everett, D., 2010. Using Confocal Laser Scanning Microscopy To Probe the Milk Fat Globule Membrane and Associated Proteins. J. Agric. Food Chem. 58, 4250–4257. doi:10.1021/jf9032409

Garcia-Manyes, S., Sanz, F., 2010. Nanomechanics of lipid bilayers by force spectroscopy with AFM: A perspective. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1798, 741–749. doi:10.1016/j.bbamem.2009.12.019

Girard, P., 2004. Membranes hors d'équilibre: échanges et transport actif. Thèse de doctorat. Université Paris-Diderot-Paris VII.

Glaser, M., 1993. Lipid domains in biological membranes: Current Opinion in Structural Biology 1993, 3: 475–481. Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 475–481.

Glaubitz, M., Medvedev, N., Pussak, D., Hartmann, L., Schmidt, S., Helm, C.A., Delcea, M., 2014. A novel contact model for AFM indentation experiments on soft spherical cell-like particles. Soft Matter 10, 6732. doi:10.1039/C4SM00788C

Gómez-Cortés, P., Viturro, E., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2015). Alternative to decrease cholesterol in sheep milk cheeses. Food Chemistry, 188, 325–327.

Goñi, F.M., Alonso, A., Bagatolli, L.A., Brown, R.E., Marsh, D., Prieto, M., Thewalt, J.L., 2008. Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1781, 665–684. doi:10.1016/j.bbalip.2008.09.002

Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C., Savage, K., 2002. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 357, 121–132.

Gülseren, İ., Corredig, M., 2013. Storage Stability and Physical Characteristics of Tea-Polyphenol-Bearing Nanoliposomes Prepared with Milk Fat Globule Membrane Phospholipids. J. Agric. Food Chem. 61, 3242–3251. doi:10.1021/jf3045439

Guyomarc'h, F., Chen, M., Et-Thakafy, O., Zou, S., Lopez, C., 2017. Gel-gel phase separation within milk sphingomyelin domains revealed at the nanoscale using atomic force microscopy. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1859, 949–958. doi:10.1016/j.bbamem.2017.02.010

Guyomarc'h, F., Zou, S., Chen, M., Milhiet, P.-E., Godefroy, C., Vié, V., Lopez, C., 2014. Milk Sphingomyelin Domains in Biomimetic Membranes and the Role of Cholesterol: Morphology and Nanomechanical Properties Investigated Using AFM and Force Spectroscopy. Langmuir 30, 6516–6524. doi:10.1021/la501640y

Hagemann, J., 1988. Thermal behavior and polymorphism of acylglycerides. Cryst. Polymorph. Fats Fat. Acids 31, 9–95.

Halling, K.K., Ramstedt, B., Nyström, J.H., Slotte, J.P., Nyholm, T.K.M., 2008. Cholesterol Interactions with Fluid-Phase Phospholipids: Effect on the Lateral Organization of the Bilayer. Biophys. J. 95, 3861–3871. doi:10.1529/biophysj.108.133744

Heid, H.W., Keenan, T.W., 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. Eur. J. Cell Biol. 84, 245–258. doi:10.1016/j.ejcb.2004.12.002

Helstad, K., Rayner, M., van Vliet, T., Paulsson, M., & Dejmek, P. (2007). Liquid droplet-like behaviour of whole casein aggregates adsorbed on graphite studied by nanoindentation with AFM. Food hydrocolloids, 21(5), 726-738.

Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., Gallet, F., 1999. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. Biophys. J. 76, 1145–1151.

Hertz, H., 1882. Über die Berührung fester elastischer Körper. J. Für Reine Angew. Math. 92, 156–171.

Hope, M.J., Bally, M.B., Mayer, L.D., Janoff, A.S., Cullis, P.R., 1986. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. Chem. Phys. Lipids 40, 89–107.

Huang, T., Kuksis, A., 1967. A comparative study of the lipids of globule membrane and fat core and of the milk serum of cows. Lipids 2, 453–460.

Huppertz, T., Kelly, A., 2006. Physical chemistry of milk fat globules, in: Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. Springer, pp. 173–212.

Israelachvili, J.N., Marčelja, S., Horn, R.G., 1980. Physical principles of membrane organization. Q. Rev. Biophys. 13, 121–200.

Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W., 1977. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 470, 185–201.

Jain, M.K., White, H. 3rd, 1977. Long-range order in biomembranes. Adv Lipid Res 15.

Jenness, R., Wong, N.P., Marth, E.H., Keeney, M., 1988. Fundamentals of dairy chemistry. Springer Science & Business Media.

Jensen, R., Newburg, D., 1995. Bovine milk lipids. Handb. Milk Compos. 546.

Jensen, R.G., 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. J. Dairy Sci. 85, 295–350.

Johnson, K., Kendall, K., Roberts, A., 1971. Surface energy and the contact of elastic solids. Presented at the Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, The Royal Society, pp. 301–313.

Jukkola, A., Rojas, O.J., 2017. Milk fat globules and associated membranes: Colloidal properties and processing effects. Adv. Colloid Interface Sci. 245, 92–101. doi:10.1016/j.cis.2017.04.010

Kasinos, M., Tran Le, T., Van der Meeren, P., 2014. Improved heat stability of recombined evaporated milk emulsions upon addition of phospholipid enriched dairy by-products. Food Hydrocoll. 34, 112–118. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.11.030

Keenan, T., Mather, I., 2006. Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane, in: Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. Springer, pp. 137–171.

Keenan, T.W., 2001. Historical perspective: milk lipid globules and their surrounding membrane: a brief history and perspectives for future research. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 6, 365–371.

Keenan, T.W., Mather, I.H., 2002. Milk fat globule membrane. Encycl. Dairy Sci. 3, 1568–1576.

Keenan, T.W., Mather, I.H., Dylewski, D.P., 1988a. Fundamentals of Dairy Chemistry.

Keenan, T.W., Mather, I.H., Dylewski, D.P., 1988b. Physical equilibria: lipid phase, in: Fundamentals of Dairy Chemistry. Springer, pp. 511–582.

Keenan, T.W., Morré, D.J., Olson, D.E., Yunghans, W.N., Patton, S., 1970. Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland. J. Cell Biol. 44, 80–93.

Keenan, T.W., Patton, S., 1995. The Milk Lipid Globule Membrane-A.

Kinoshita, M., Matsumori, N., Murata, M., 2014. Coexistence of two liquid crystalline phases in dihydrosphingomyelin and dioleoylphosphatidylcholine binary mixtures. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1838, 1372–1381. doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.017

Kol, N., Gladnikoff, M., Barlam, D., Shneck, R.Z., Rein, A., Rousso, I., 2006. Mechanical Properties of Murine Leukemia Virus Particles: Effect of Maturation. Biophys. J. 91, 767–774. doi:10.1529/biophysj.105.079657

Koleva, I., Rehage, H., 2012. Deformation and orientation dynamics of polysiloxane microcapsules in linear shear flow. Soft Matter 8, 3681–3693.

Kuntsche, J., Horst, J.C., Bunjes, H., 2011. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. Int. J. Pharm. 417, 120–137. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.001

Kwok, R., Evans, E., 1981. Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. Biophys. J. 35, 637–652.

Landau, L.D., Lifshitz, E., 1986. Theory of Elasticity, vol. 7. Course Theor. Phys. 3, 109.

Laney, D.E., Garcia, R.A., Parsons, S.M., Hansma, H.G., 1997. Changes in the elastic properties of cholinergic synaptic vesicles as measured by atomic force microscopy. Biophys. J. 72, 806.

Le, T.T., Van Camp, J., Rombaut, R., Van Leeckwyck, F., Dewettinck, K., 2009. Effect of washing conditions on the recovery of milk fat globule membrane proteins during the isolation of milk fat globule membrane from milk. J. Dairy Sci. 92, 3592–3603.

Lee, S.J., Sherbon, J.W., 2002. Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. J. Dairy Res. 69, 555–567.

Leung, S.S.W., Hancock, R.E.W., Thewalt, J.L., 2007. Fluorescent Probes Alter Miscibility Phase Boundaries in Ternary Vesicles. J. Phys. Chem. B 111, 502–504. doi:10.1021/jp067636i

Li, J.K., Sullan, R.M.A., Zou, S., 2010. Atomic Force Microscopy Force Mapping in the Study of Supported Lipid Bilayers †. Langmuir 27, 1308–1313. doi:10.1021/la103927a

Li, S., Eghiaian, F., Sieben, C., Herrmann, A., Schaap, I.A., 2011. Bending and puncturing the influenza lipid envelope. Biophys. J. 100, 637–645.

Liang, X., Mao, G., Ng, K.Y.S., 2004a. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. J. Colloid Interface Sci. 278, 53–62. doi:10.1016/j.jcis.2004.05.042

Liang, X., Mao, G., Simon Ng, K.., 2004b. Probing small unilamellar EggPC vesicles on mica surface by atomic force microscopy. Colloids Surf. B Biointerfaces 34, 41–51. doi:10.1016/j.colsurfb.2003.10.017

Lipowsky, R., 1991. The conformation of membranes. Nature 349, 475-481.

Lopez, C., 2011. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 16, 391–404. doi:10.1016/j.cocis.2011.05.007

Lopez, C., Briard-Bion, V., Beaucher, E., Ollivon, M., 2008. Multiscale characterization of the organization of Triglycerides and phospholipids in emmental cheese: From the microscopic to the molecular level. J. Agric. Food Chem. 56, 2406–2414.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., 2014. Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring. Food Res. Int. 58, 59–68. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.049

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., Robert, B., 2011. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. Food Chem. 125, 355–368. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.005

Lopez, C., Cauty, C., Guyomarc'h, F., 2015. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. Dairy Sci. Technol. 95, 863–893. doi:10.1007/s13594-015-0263-0

Lopez, C., Cauty, C., Rousseau, F., Blot, M., Margolis, A., Famelart, M.-H., 2017. Lipid droplets coated with milk fat globule membrane fragments: Microstructure and functional properties as a function of pH. Food Res. Int. 91, 26–37.

Lopez, C., Madec, M.-N., Jimenez-Flores, R., 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. Food Chem. 120, 22–33. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.065

Mabrey, S., Sturtevant, J.M., 1976. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 3862–3866.

Mabrouk, E., Cuvelier, D., Pontani, L.-L., Xu, B., Lévy, D., Keller, P., Brochard-Wyart, F., Nassoy, P., Li, M.-H., 2009. Formation and material properties of giant liquid crystal polymersomes. Soft Matter 5, 1870. doi:10.1039/b815817g

MacGibbon, A., Taylor, M., 2006. Composition and structure of bovine milk lipids, in: Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. Springer, pp. 1–42.

Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirolomoom, A., Cleymand, F., Linder, M., 2012a. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine. Food Chem. 134, 632–640. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.098

Maherani, B., Arab-tehrany, E., Kheirolomoom, A., Reshetov, V., Stebe, M.J., Linder, M., 2012b. Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design. The Analyst 137, 773–786. doi:10.1039/C1AN15794A

Malmsten, M., Bergenståhl, B., Nyberg, L., Odham, G., 1994. Sphingomyelin from milk-characterization of liquid crystalline, liposome and emulsion properties. J. Am. Oil Chem. Soc. 71, 1021–1026.

Marsh, D., 2012. Thermodynamics of Phospholipid Self-Assembly. Biophys. J. 102, 1079–1087. doi:10.1016/j.bpj.2012.01.049

Marsh, D., 2010. Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 1798, 688–699.

Marsh, D., 2006. Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers. Chem. Phys. Lipids 144, 146–159. doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.08.004

Mather, I., 2011. Milk Lipids| Milk Fat Globule Membrane. Encycl. Dairy Sci. 2.

Mather, I.H., 2000. A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane1, 2. J. Dairy Sci. 83, 203–247.

Mather, I.H., 1978. Separation of the proteins of bovine milk-fat globule membrane by electrofocusing. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 514, 25–36.

Mather, I.H., Keenan, T.W., 1998. Origin and secretion of milk lipids. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 3, 259–273.

McPherson, A.V., Kitchen, B.J., 1983. Reviews of the progress of Dairy Science: The bovine milk fat globule membrane–its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. J. Dairy Res. 50, 107–133.

Melcrová, A., Pokorna, S., Pullanchery, S., Kohagen, M., Jurkiewicz, P., Hof, M., Jungwirth, P., Cremer, P.S., Cwiklik, L., 2016. The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers. Sci. Rep. 6, 38035.

Méléard, P., Bagatolli, L.A., Pott, T., 2009. Giant Unilamellar Vesicle Electroformation, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 161–176. doi:10.1016/S0076-6879(09)65009-6

Meleard, P., Gerbeaud, C., Pott, T., Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M.D., Dufourcq, J., Bothorel, P., 1997. Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content. Biophys. J. 72, 2616.

Ménard, O., Ahmad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., Lopez, C., 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. Food Chem. 120, 544–551. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.053

Michalski, M., Cariou, R., Michel, F., Garnier, C., 2002. Native vs. damaged milk fat globules: membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels. J. Dairy Sci. 85, 2451–2461.

Michalski, M.-C., Michel, F., Sainmont, D., Briard, V., 2001. Apparent ζ-potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. Colloids Surf. B Biointerfaces 23, 23–30.

Miller, B., Puhan, Z., 1986. Fettsch. adigung w. ahrend der Rohmilchgewinnung und-behandlung. Schweiz. Milchwirtsch. Forsch. 15, 69–76.

Mirza, M., Guo, Y., Arnold, K., Oss, C.J. va., Ohki, S., 1998. HYDROPHOBIZING EFFECT OF CATIONS ON ACIDIC PHOSPHOLIPID MEMBRANES. J. Dispers. Sci. Technol. 19, 951–962. doi:10.1080/01932699808913225

Mohandas, N., Evans, E., 1994. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, 787–818.

Morales-Penningston, N.F., Wu, J., Farkas, E.R., Goh, S.L., Konyakhina, T.M., Zheng, J.Y., Webb, W.W., Feigenson, G.W., 2010. GUV preparation and imaging: Minimizing artifacts. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1798, 1324–1332. doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.011

Mosharraf, M., Taylor, K.M.G., Craig, D.Q.M., 1995. Effect of calcium ions on the surface charge and aggregation of phosphatidylcholine liposomes. J. Drug Target. 2, 541–545.

Mulder, H., Walstra, P., 1974. The milk fat globule. Emulsion science as applied to milk products and comparable foods. PUDOC, Wageningen, Netherlands.

Murthy, A.V.R., Guyomarc'h, F., Lopez, C., 2016a. The temperature-dependent physical state of polar lipids and their miscibility impact the topography and mechanical properties of

bilayer models of the milk fat globule membrane. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1858, 2181–2190. doi:10.1016/j.bbamem.2016.06.020

Murthy, A.V.R., Guyomarc'h, F., Lopez, C., 2016b. Cholesterol Decreases the Size and the Mechanical Resistance to Rupture of Sphingomyelin Rich Domains, in Lipid Bilayers Studied as a Model of the Milk Fat Globule Membrane. Langmuir 32, 6757–6765. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01040

Murthy, A.V.R., Guyomarc'h, F., Paboeuf, G., Vié, V., Lopez, C., 2015. Cholesterol strongly affects the organization of lipid monolayers studied as models of the milk fat globule membrane: Condensing effect and change in the lipid domain morphology. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1848, 2308–2316. doi:10.1016/j.bbamem.2015.06.014

Nagle, J.F., Zhang, R., Tristram-Nagle, S., Sun, W., Petrache, H.I., Suter, R.M., 1996. X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. Biophys. J. 70, 1419.

Neubauer, M.P., Poehlmann, M., Fery, A., 2014. Microcapsule mechanics: From stability to function. Adv. Colloid Interface Sci. 207, 65–80. doi:10.1016/j.cis.2013.11.016

New, R.R.C., 1990. Liposomes: A Practical Approach, The practical approach series / series editors D. Rickwood, B.D. James. IRL Press at Oxford University Press.

Nguyen, H.T.H., Madec, M.-N., Ong, L., Kentish, S.E., Gras, S.L., Lopez, C., 2016. The dynamics of the biological membrane surrounding the buffalo milk fat globule investigated as a function of temperature. Food Chem. 204, 343–351. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.141

Nguyen, H.T.H., Ong, L., Beaucher, E., Madec, M.-N., Kentish, S.E., Gras, S.L., Lopez, C., 2015. Buffalo milk fat globules and their biological membrane: in situ structural investigations. Food Res. Int. 67, 35–43. doi:10.1016/j.foodres.2014.10.022

Niggemann, G., Kummrow, M., Helfrich, W., 1995. The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers: dependences on experimental method, sample cell sealing and temperature. J. Phys. II 5, 413–425.

Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., Evans, E., 2000. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. Biophys. J. 79, 321–327.

Ollivon, M., Perron, R., Karleskind, A., 1992. Propriétés physiques des corps gras. Man. Corps Gras Paris Lavoisier 433–442.

Ong, L., Dagastine, R., Kentish, S., Gras, S., 2010. The effect of milk processing on the microstructure of the milk fat globule and rennet induced gel observed using confocal laser scanning microscopy. J. Food Sci. 75.

Orsini, F., Cremona, A., Arosio, P., Corsetto, P.A., Montorfano, G., Lascialfari, A., Rizzo, A.M., 2012. Atomic force microscopy imaging of lipid rafts of human breast cancer cells. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1818, 2943–2949. doi:10.1016/j.bbamem.2012.07.024

Patton, S., Huston, G.E., 1986. A method for isolation of milk fat globules. Lipids 21, 170–174.

Patton, S., Jensen, R.G., 1975. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. Prog. Chem. Fats Other Lipids 14.

Patton, S., Long, C., Sooka, T., 1980. Effect of Storing Milk on Cholesterol and Phospholipid of Skim Milk1. J. Dairy Sci. 63, 697–700.

Phipps, L.W., Temple, D.M., 1982. Surface properties of milk fat globules: interfacial tension studies. J. Dairy Res. 49, 61–72.

Picas, L., Rico, F., Scheuring, S., 2012. Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers. Biophys. J. 102, L01–L03. doi:10.1016/j.bpj.2011.11.4001

Popa, I., Sinha, P., Finessi, M., Maroni, P., Papastavrou, G., Borkovec, M., 2010. Importance of charge regulation in attractive double-layer forces between dissimilar surfaces. Phys. Rev. Lett. 104, 228301.

Quinn, P.J., 2004. Plasma membrane phospholipid asymmetry, in: Phospholipid Metabolism in Apoptosis. Springer US, pp. 39–60.

Ramstedt, B., Slotte, J.P., 2002. Membrane properties of sphingomyelins. FEBS Lett. 531, 33–37.

Rawicz, W., Olbrich, K., McIntosh, T., Needham, D., Evans, E., 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. Biophys. J. 79, 328–339.

Redondo-Morata, L., Giannotti, M.I., Sanz, F., 2014. Structural impact of cations on lipid bilayer models: Nanomechanical properties by AFM-force spectroscopy. Mol. Membr. Biol. 31, 17–28. doi:10.3109/09687688.2013.868940

Reimhult, E., Höök, F., Kasemo, B., 2003. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. Langmuir 19, 1681–1691.

Reissner, E., 1947. Note on the Membrane Theory of Shell of Revolution. Stud. Appl. Math. 26, 290–293.

Richter, R.P., Bérat, R., Brisson, A.R., 2006. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. Langmuir 22, 3497–3505. doi:10.1021/la052687c

Richter, R.P., Brisson, A.R., 2005. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. Biophys. J. 88, 3422–3433.

Robertson, J.D., 1959. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. Presented at the Biochemical Society Symposium, p. 3.

Rombaut, R., Camp, J., Dewettinck, K., 2005. Analysis of phospho-and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. J. Dairy Sci. 88, 482–488.

Rombaut, R., Dewettinck, K., 2006. Properties, analysis and purification of milk polar lipids. Int. Dairy J. 16, 1362–1373.

Ross, M., Steinem, C., Galla, H.-J., Janshoff, A., 2001. Visualization of chemical and physical properties of calcium-induced domains in DPPC/DPPS Langmuir− Blodgett layers. Langmuir 17, 2437–2445.

Saffon, M., Britten, M., Pouliot, Y., 2011. Thermal aggregation of whey proteins in the presence of buttermilk concentrate. J. Food Eng. 103, 244–250.

Samsonov, A.V., Mihalyov, I., Cohen, F.S., 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. Biophys. J. 81, 1486–1500.

Sanchez-Juanes, F., Alonso, J., Zancada, L., Hueso, P., 2009. Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. Int. Dairy J. 19, 273–278.

Sandre, O., Moreaux, L., Brochard-Wyart, F., 1999. Dynamics of transient pores in stretched vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 10591–10596.

Sato, M., Nagayama, K., Kataoka, N., Sasaki, M., Hane, K., 2000. Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress. J. Biomech. 33, 127–135.

Schaap, I.A.T., Eghiaian, F., des Georges, A., Veigel, C., 2012. Effect of Envelope Proteins on the Mechanical Properties of Influenza Virus. J. Biol. Chem. 287, 41078–41088. doi:10.1074/jbc.M112.412726

Schäfer, E., Kliesch, T.-T., Janshoff, A., 2013. Mechanical Properties of Giant Liposomes Compressed between Two Parallel Plates: Impact of Artificial Actin Shells. Langmuir 29, 10463–10474. doi:10.1021/la401969t

Schäfer, E., Vache, M., Kliesch, T.-T., Janshoff, A., 2015. Mechanical response of adherent giant liposomes to indentation with a conical AFM-tip. Soft Matter 11, 4487–4495.

Schoeler, B., Delorme, N., Doench, I., Sukhorukov, G.B., Fery, A., Glinel, K., 2006. Polyelectrolyte films based on polysaccharides of different conformations: Effects on multilayer structure and mechanical properties. Biomacromolecules 7, 2065–2071.

Serro, A., Carapeto, A., Paiva, G., Farinha, J., Colaço, R., Saramago, B., 2012. Formation of an intact liposome layer adsorbed on oxidized gold confirmed by three complementary techniques: QCM D, AFM and confocal fluorescence microscopy. Surf. Interface Anal. 44, 426–433.

Shimanouchi, T., Ishii, H., Yoshimoto, N., Umakoshi, H., Kuboi, R., 2009. Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. Colloids Surf. B Biointerfaces 73, 156–160.

Simons, K., 2000. How Cells Handle Cholesterol. Science 290, 1721–1726. doi:10.1126/science.290.5497.1721

Simons, K., Gerl, M.J., 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 688–699. doi:10.1038/nrm2977

Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature 387, 569.

Simons, K., Ikonen, E., others, 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature 387, 569–572.

Simons, K., Vaz, W.L.C., 2004. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes [1]. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33, 269–295. doi:10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803

Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720–731.

Singh, H., Thompson, A., Liu, W., Corredig, M., 2012. Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. Encapsulation Technol. Deliv. Syst. Food Ingred. Nutraceuticals Woodhead Publ. Ltd. Camb. UK 287–318.

Sinn, C.G., Antonietti, M., Dimova, R., 2006. Binding of calcium to phosphatidylcholine–phosphatidylserine membranes. Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 282–283, 410–419. doi:10.1016/j.colsurfa.2005.10.014

Slotte, J.P., 2016. The importance of hydrogen bonding in sphingomyelin's membrane interactions with co-lipids. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 1858, 304–310.

Smaby, J.M., Momsen, M., Kulkarni, V.S., Brown, R.E., 1996. Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. Biochemistry (Mosc.) 35, 5696–5704.

Sneddon, I.N., 1965. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. Int. J. Eng. Sci. 3, 47–57.

Spitsberg, V., 2005. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. J. Dairy Sci. 88, 2289–2294.

Staneva, G., Momchilova, A., Wolf, C., Quinn, P.J., Koumanov, K., 2009. Membrane microdomains: Role of ceramides in the maintenance of their structure and functions. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1788, 666–675. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.026

Stannard, D.J., 1975. The use of marker enzymes to assay the churning of milk. J. Dairy Res. 42, 241. doi:10.1017/S0022029900015272

Stone, M.J., Rowlands, A., 1952. 461.'Broken'or 'bitty 'cream in raw and pasteurized milk. J. Dairy Res. 19, 51–62.

Sullan, R.M.A., Li, J.K., Zou, S., 2009. Direct Correlation of Structures and Nanomechanical Properties of Multicomponent Lipid Bilayers. Langmuir 25, 7471–7477. doi:10.1021/la900395w

Tabor, R.F., Lockie, H., Mair, D., Manica, R., Chan, D.Y.C., Grieser, F., Dagastine, R.R., 2011. Combined AFM−Confocal Microscopy of Oil Droplets: Absolute Separations and Forces in Nanofilms. J. Phys. Chem. Lett. 2, 961–965. doi:10.1021/jz2003606

Takechi-Haraya, Y., Sakai-Kato, K., Abe, Y., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y., 2016. Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. Langmuir 32, 6074–6082. doi:10.1021/acs.langmuir.6b00741

Thompson, A.K., Couchoud, A., Singh, H., 2009. Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived phospholipids and soya phospholipids. Dairy Sci. Technol. 89, 99–113. doi:10.1051/dst/2008036

Thompson, A.K., Haisman, D., Singh, H., 2006. Physical Stability of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soya Phospholipids. J. Agric. Food Chem. 54, 6390–6397. doi:10.1021/jf0605695

Thompson, A.K., Singh, H., 2006. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. J. Dairy Sci. 89, 410–419.

Tian, Y., Cai, M., Xu, H., Wang, H., 2014. Studying the membrane structure of chicken erythrocytes by in situ atomic force microscopy. Anal. Methods 6, 8115–8119.

Tian, Y., Li, J., Cai, M., Zhao, W., Xu, H., Liu, Y., Wang, H., 2013. High resolution imaging of mitochondrial membranes by in situ atomic force microscopy. RSC Adv. 3, 708–712.

Van Houtte, P., Li, S., Seefeldt, M., Delannay, L., 2005. Deformation texture prediction: from the Taylor model to the advanced Lamel model. Int. J. Plast. 21, 589–624.

van Meer, G., 2005. Cellular lipidomics. EMBO J. 24, 3159–3165.

van Swaay, D., deMello, A., 2013. Microfluidic methods for forming liposomes (vol 13, pg 752, 2013). Lab. Chip 13, 4890–4890.

Vaz, W.L., Almeida, P.F., 1993. Phase topology and percolation in multi-phase lipid bilayers: is the biological membrane a domain mosaic?: Current Opinion in Structural Biology 1993, 3: 482–488. Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 482–488.

Veatch, S.L., 2007. From small fluctuations to large-scale phase separation: Lateral organization in model membranes containing cholesterol. Semin. Cell Dev. Biol. 18, 573–582. doi:10.1016/j.semcdb.2007.08.016

Veatch, S.L., Keller, S.L., 2003. Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol. Biophys. J. 85, 3074–3083. doi:10.1016/S0006-3495(03)74726-2

Veatch, S.L., Soubias, O., Keller, S.L., Gawrisch, K., 2007. Critical fluctuations in domain-forming lipid mixtures. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 17650–17655.

Veereman-Wauters, G., Staelens, S., Rombaut, R., Dewettinck, K., Deboutte, D., Brummer, R.-J., Boone, M., Le Ruyet, P., 2012. Milk fat globule membrane (INPULSE) enriched formula milk decreases febrile episodes and may improve behavioral regulation in young children. Nutrition 28, 749–752.

Vesper, H., Schmelz, E.-M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, A.H., 1999. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. J. Nutr. 129, 1239–1250.

Walstra, P., 1999. Dairy technology: principles of milk properties and processes. CRC Press.

Walstra, P., Jenness, R., 1984. Dairy chemistry & physics. John Wiley & Sons.

Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., 2006. Dairy science and technology, 2nd ed. ed, Food science and technology. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton.

Wesdorp, L.H., 1990. Liquid-multiple solid phase equilibria in fats: theory and experiments.

Xu, H., Su, W., Cai, M., Jiang, J., Zeng, X., Wang, H., 2013. The asymmetrical structure of Golgi apparatus membranes revealed by in situ atomic force microscope. PloS One 8, e61596.

Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., Anema, S., 2002. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. Int. Dairy J. 12, 393–402.

Yoshimoto, M., Todaka, Y., 2014. Phase transition induced rapid permeabilization of liposome membranes composed of milk sphingomyelin. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116, 226–231.

Zhao, W., Tian, Y., Cai, M., Wang, F., Wu, J., Gao, J., Liu, S., Jiang, J., Jiang, S., Wang, H., 2014. Studying the Nucleated Mammalian Cell Membrane by Single Molecule Approaches. PLoS ONE 9, e91595. doi:10.1371/journal.pone.0091595

Zou, X., Guo, Z., Jin, Q., Huang, J., Cheong, L., Xu, X., Wang, X., 2015. Composition and microstructure of colostrum and mature bovine milk fat globule membrane. Food Chem. 185, 362–370. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.145

Zou, X.-Q., Guo, Z., Huang, J.-H., Jin, Q.-Z., Cheong, L.-Z., Wang, X.-G., Xu, X.-B., 2012. Human Milk Fat Globules from Different Stages of Lactation: A Lipid Composition Analysis and Microstructure Characterization. J. Agric. Food Chem. 60, 7158–7167. doi:10.1021/jf3013597

Liste des tableaux

Tableau 1: La composition des protéines de la MFGM en masse moléculaire (Da). CD (Cluster of differentiation); PAS (periodic acid Schiff), BRCA I (Breast cancer type 1 susceptibility protein) 29

Tableau 2: Ordre de grandeur des modules mécaniques E (module de Young) ou k_c (rigidité de courbure) mesurés pour différents objets (lipide ou non-lipidique) en utilisant plusieurs techniques. Les valeurs représentent des moyennes avec ou sans les écarts types selon les références. DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), milk SM (milk sphingomyéline) DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), SOPC (1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine)..... 50

Tableau 3 : Caractérisation de l'adsorption et de la stabilité des vésicules sur cinq différents substrats..... 124

Tableaux des articles

Article 1 :

Table 1: Lipid compositions of sheep, goat and bovine milks

Table 2: Number and size of non-fluorescent lipid domains observed at the surface of fat globules in sheep, goat and bovine milks. Determinations were performed on half of milk fat globules, as observed in the 2D CLSM images (n > 20 milk fat globules).

Article 3:

Table1: Geometrical parameters of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) or dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes and their corresponding membrane thicknesses. The height (H) and width (W) mean values were measured using the cross section of AFM images of the liposomes and used to calculate the volume of the adsorbed liposomes, from which the mean diameter of a sphere of equivalent volume was deduced (Eq.2). The mean values of DOPC and DPPC membrane thicknesses were measured using the jump distance d from breakthrough force curves (n=30) recorded in PIPES/NaCl/$CaCl_2$ buffer, pH 6.7 at 20°C. Lipid Mean height H

Table 2: Comparison of the bending modulus (k_C) and Young modulus values (E) of liposomes or of supported lipid bilayers in the fluid or gel phase reported in the literature using different techniques as indicated. Abbreviations stand for: EggPC = mixture of unsaturated (54.8 wt. %) and saturated (45.2 wt.%) phosphatidylcholine; DMPC = 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; ESM = egg sphingomyelin; Chol = cholesterol. Values in italics were calculated by the authors using calculations described in the Appendix (eq.A.2; A.3)

Liste des figures

Figure 1: Composition globale du lait de différentes espèces..... 9

Figure 2: Utilisation du lait pour la fabrication de produits laitiers en France (CNIEL-2015). Les données sont en % de la matière sèche unifiée totale. 9

Figure 3 : Procédés technologiques utilisés en industrie laitière. Exemple de la fabrication de lait pasteurisé standardisé..... 11

Figure 4: Les mécanismes d'instabilité des émulsions laitières (phase aqueuse en blanc, phase grasse en bleu)..... 11

Figure 5 : Représentation schématique de la membrane biologique. La membrane est principalement constituée d'un double feuillet de lipides et de protéines. Les lipides polaires sont composés d'une tête polaire hydrophile liée à des chaines hydrophobes constituées d'acides gras 17

Figure 6: Les structures chimiques des molécules des lipides polaires. Les glycérophospholipides sont composés de deux acides gras saturé ou insaturé (SFA: saturated fatty acid, UFA: unsaturated fatty acid, FA: fatty acids) relié à une tête polaire (PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine) par un glycérol. Les sphingolipides sont caractérisés par la présence d'un seul acide gras (céramide) connecté à une base de sphingosine par une liaison amide NH et à une tête polaire phosphocholine par un groupement phosphate 19

Figure 7: Structure chimique de la molécule cholestérol et son emplacement au sein d'une bicouche lipidique..... 20

Figure 8: Thermogramme typique de DPPC obtenu par la calorimétrie différentielle à balayage qui exprime l'excès de la capacité calorifique en fonction de la température. L'analyse thermique montre les différentes transitions de phase que DPPC peut subir au cours de chauffage : Une subtransition Lc (liquide cristallin) /$L_{\beta'}$ (gel tilté), et une prétransition $L_{\beta'}$ (gel tilté)/$P_{\beta'}$(ripple), et une transition principale de fusion $P_{\beta'}$(ripple)/L_{α} (liquide désordonné/fluide) caractérisée par la Tm 21

Figure 9: Effet du cholestérol sur l'organisation des lipides en phase gel et fluide. A la température de fusion (Tm), les membranes peuvent changer de phase en passant d'un état solide-ordonnée (S_o), encore appelée phase gel (L_{β}) à un état liquide-désordonnée (L_{α} ou L_d) également appelé fluide. En présence de Chol, la membrane indépendamment de son état d'origine, adopte une nouvelle phase appelée liquide-ordonnée (L_o) qui présente à la fois des caractéristiques de la phase fluide (mobilité des lipides) et de la phase gel (ordre)..... 22

Figure 10: Séparation de phase latérale induite par l'effet de charge (ions) ou l'effet d'état de phase dû à une variation thermique..... 23

Figure 11: Images de GUV, obtenues par microscopie bi-photonique, composées d'un mélange ternaire de lipide Egg SM/DOPC /Chol une coexistence des phases Lo (bleu) et Ld (rouge) à 25°C. Barre d'échelle est 5 µm 24

Figure 12: (A) image de microscopie d'un lait montrant les globules gras, (B) schématisation d'un globule gras : cœur de TAG recouvert par une membrane biologique, formule générale d'un triacylglycérol. R1, R2 et R3 représentent des chaînes aliphatiques d'acides gras. * : centre de chiralité. (C) images de microscopie en lumière polarisée montrant les cristaux de TAG dans les globules gras formés à 4°C après un refroidissement rapide (gauche), à vitesse intermédiaire (centre) et lent (droite) 26

Figure 13: Sécretion des globules gras par les cellules épithéliales mammaires 28

Figure 14: La composition des acides gras des lipides polaires de la MFGM déterminée par chromatographie en phase gazeuse (GC). PI : phosphatidylinositol, PS : Phosphatidylsérine, PE :phosphatidylethanolamine, PC : Phosphatidylcholine, SM :Sphingomyéline 30

Figure 15 : Schéma représentatif de la structure de la MFGM 30

Figure 16 : A) Image du globule gras obtenue par microscopie confocale montrant la répartition hétérogène des protéines (couleur jaune) et des lipides polaires, avec la phase fluide des phospholipides insaturés (couleur rouge) les domaines riches en sphingomyéline (couleur noir) dans le plan de la membrane (MFGM). Les protéines ont été marquées en utilisant la lectine fluorescente WGA-488 tandis que les phospholipides ont été marqués par un phospholipide exogène fluorescent Rh-DOPE. B) représentation bidimensionnelle de la structure de la MFGM en trois couches. L'organisation des protéines et des lipides polaires dans le plan de la MFGM montrant une ségrégation latérale des lipides saturés (Tm élevée) formant des domaines en phase gel ou en liquide ordonné en présence du cholestérol 33

Figure 17: Encapsulations de molécules d'intérêt dans une bicouche de liposome en fonction de leur solubilité..... 36

Figure 18: Les classes des phospholipides de la MFGM et du soja avec leur pourcentage en masse 37

Figure 19 : Exemple de comportement d'un solide sous contrainte. 38

Figure 20: Les principales contraintes subies par les membranes lipidiques..... 39

Figure 21 : Courbures principales pour deux surfaces courbées ;a) de même signe, b) signe opposés..... 41

Figure 22 : Les techniques utilisées pour la caractérisation mécanique des vésicules à différentes échelles de forces. Les flèches représentent les directions d'application de la force 43

Figure 23 : Particule soumise à un cisaillement dans un rhéoscope dont les cylindres de rayons différents R1 et R2 tournant avec deux vitesses opposées 1 et 2 44

Figure 24 : Aspiration d'une vésicule par micropipette. L est la longueur aspirée, P la pression, Rv et Rp sont les rayons de la vésicule et de pipette respectivement 45

Figure 25: Courbes de force (approche-retrait) exprimant la force (nN) en fonction de la distance de séparation (nm) entre la pointe et l'échantillon. Les paramètres physiques extraits sont : le module de Young, la force de rupture et l'épaisseur de la bicouche lipidique, et la force d'adhésion. A, Point de contact ; B, début de rupture ; C, contact avec le substrat; D, adhésion maximale; E, retour à la position initiale à distance de l'échantillon..... 46

Figure 26: Diagramme permettant la détermination du coefficient de correction C en fonction des rapports Rp/R et d/R où Rp est le rayon de la pointe, R rayon du liposome, et d l'épaisseur de la membrane lipidique..... 48

Figure 27: Stratégie générale du projet de thèse. La question de recherche principale (au centre) est articulée en questions intermédiaires (en périphérie) organisant un cycle entre objet réel et données de référence obtenues sur des objets modèles..... 55

Figure 28: Structures chimiques des molécules de DOPC et de DPPC..... 59

Figure 29: A) Distribution des bases sphingoides et des acides gras de la sphingomyéline du lait (milk SM) ; B) Structure chimique des molécules de SMs individuelles..... 60

Figure 30: Structure chimique de la molécule de cholestérol 60

Figure 31: Composition en acides gras de l'extrait de lipides polaires de la membrane des globules gras du lait (en orange) et de la sphingomyéline du lait (en gris)..... 61

Figure 32: Classification des vésicules en fonction de la lamellarité et de la taille. Les petites vésicules unilamellaires (SUV) ont moins de 100 nm de diamètre; Les grandes vésicules unilamellaires (LUV) se situent entre 100 et 1000 nm; Et les vésicules unilamellaires géantes (GUV) sont supérieures à 1 µm. Les vésicules multilamellaires ont de nombreuses couches membranaires et les vésicules multi vésiculaires encapsulent de petites vésicules..... 64

Figure 33: Mécanisme de formation des bicouches planes supportées à partir des vésicules (SUV) 65

Figure 34 : Principe du microscope confocale..... 67

Figure 35: Sondes fluorescentes utilisées pour marquer les globules gras du lait ou les vésicules 68

Figure 36 : Schéma représentatif des différentes cinétiques thermiques réalisées sur les globules gras natifs issus de laits crus de vache, brebis ou chèvre..... 69

Figure 37 : Illustration du principe de la diffusion dynamique de la lumière..... 72

Figure 38: Principe de la calorimétrie différentielle à balayage 75

Figure 39: A) Schéma du comportement d'un faisceau de rayons X dans un cristal selon la loi de Bragg. B) exemple des différentes informations qu'on peut obtenir sur les membranes lipidiques par la diffraction des rayons X : aux grands angles WAXS (wide angle X scattering) et aux petits angles SAXS (small angle X scattering). 77

Figure 40: A) les principaux éléments d'un microscope à force atomique, B) Images à l'échelle microscopique des pointes MSNL *(bruker)* dont la raideur est proportionnelle de la longueur .. 79

Figure 41: Forces d'interactions entre la pointe et la surface de l'échantillon, lors de la phase d'approche de la pointe AFM vers la surface 80

Figure 42 : Des images bidimensionnelles obtenues par AFM (10×10 µm^2) de la surface d'une membrane lipidique bi-phasique. (A) l'image par mode contact, (B) l'image par mode force-volume. Chaque pixel représente une courbe de force-distance d'où on peut extraire la rigidité de la membranes (position 2) ou la force de rupture F_B (position 3) 81

Figure 43 : A) Acquisition des données mécaniques dans deux régions de déformation différentes: plastique pour extraire les forces de rupture (F_B, breakthrough force) réalisée unqiuemen sur les SLBs, ou élastique pour déduire les modules de Young des membranes en SLB ou en liposome. B) et C) Traitement des coubres de forces obetenues sur des liposomes par le modèle de Reissner ou sur les SLBs par modèle de hertz 82

Figure 44: A) Extraction des paramètres géométriques d'un liposome par analyse de section transversale ; B) rayon de courbure local déterminé par l'ajustement (fit) du sommet (~260 nm) du liposome d'une membrane d'épaisseur d, en utilisant le logiciel d'analyse d'images Gwyddion 2.47 85

Figure 45: Différents moyens utilisés pour extraire la valeur de l'épaisseur des membranes lipidiques 86

Figure 46 : Distribution du diamètre hydrodynamique des vésicules de milk SM hydratées par un tampon PIPES à 10 mM de $CaCl_2$, pH =6.7, mesurée à 20°C par diffusion dynamique de la lumière. 108

Figure 47: Effet de la concentration en calcium sur la charge surfacique de vésicules de différentes compositions. Le tableau indique les valeurs du potentiel zêta mesuré dans un tampon PIPES à 10 mM de calcium pour les compositions suivantes : milk SM, DOPC, milk SM/DOPC, milk SM/DOPC/cholestérol 109

Figure 48: Images de microscopie confocale montrant les vésicules lipidiques marquées avec du rouge de Nile. Ces vésicules ont été obtenues par vortex et dispersées dans différents milieux. A) vésicules de sphingomyéline du lait (milk SM) dans un tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à différentes concentrations en calcium (0, 2, 5, 10 mM). B) vésicules composées de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), de milk SM/DOPC (80:20 % mol.; 50:50 % mol.) ou de milk SM/DOPC/cholestérol (81:9 :10 % mol.) dans un tampon PIPES-NaCl-$CaCl_2$ à 10 mM de calcium. C) vésicules composées de milk SM dans un tampon PBS. Les barres d'échelle représentent 10 µm. 111

Figure 49: Thermogrammes obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sur des vésicules composées de différent rapports molaires de sphingomyéline de lait (milk SM) et dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) pour caractériser l'effet de la dispersion d'une quantité fixe de milk SM dans le DOPC sur la température de transition de phase gel fluide. Les analyses sont réalisées dans du tampon PIPES-NaCl à 10 mM $CaCl_2$ à pH 6.7. 113

Figure 50: Schématisation de la répartition des sondes fluorescentes, et donc des lipides, dans les vésicules. Les lipides peuvent être répartis de manière hétérogène qui finit par créer deux populations de vésicules de compositions différentes, ou d'une manière homogène sur toutes les vésicules i.e. elles contiennent les deux types de lipides, en séparation de phases ou bien colocalisés. 114

Figure 51: Images de vésicules obtenues par réhydratation à chaud et agitation par vortex de films lipidiques contenant un rapport molaire milk SM/ DOPC de 80:20 % mol., et marquées par de la Rh-DOPE (en rouge) et/ou du Top fluor SM (en vert). Les observations sont réalisées par microscopie confocale à balayage laser, dans du tampon PIPES-NaCl contenant 10 mM de $CaCl_2$, à pH 6.7 et à 20°C…..115

Figure 52: Images de vésicules obtenues par réhydratation à chaud et agitation par vortex de films lipidiques contenant un rapport molaire milk SM/ DOPC de 50:50 % mol., et marquées par de la Rh-DOPE (en rouge) et/ou du Top fluor SM (en vert). Les observations sont réalisées par microscopie confocale à balayage laser, dans du tampon PIPES-NaCl contenant 10 mM de $CaCl_2$, à pH 6.7 et à 20°C.barre d'échelle est de 5 µm..... 116

Figure 53: Thermogrammes obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) des vésicules composées de différents rapports molaires en sphingomyéline de lait (milk SM), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et cholestérol (chol) pour étudier l'effet du cholestérol sur la transition de phase. Les analyses étaient réalisées dans le tampon PIPES-NaCl à 10 mM $CaCl_2$ et à pH 6.7. 118

Figure 54: Images de microscopie confocale de vésicules composées de différents rapports molaires en sphingomyéline de lait (milkSM), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et cholestérol (chol) contenant différents taux de cholestérol (0, 10,20, 30, 50% mol) et marquées par une sonde fluorescente rouge de Nile. 119

Figure 55: Exemples de différents types de vésicules multilamellaires visualisées par microscopie confocale après marquage au rouge de Nile. Les vésicules sont composées de milk SM /DOPC (80:20) (A, B et C) ou DOPC (D et E) 120

Figure 56: Schéma représentatif du montage de la cellule utilisée en microscopie confocale, avec les différentes surfaces verre, silice et or. 123

Figure 57: A) Schéma montrant l'immobilisation des globules gras sur la surface du filtre poreux ; B) Filtre déposé sur le porte échantillon du microscope AFM et de fluorescence. 210

Figure 58: Images des globules gras du lait obtenu par microscopie à transmission (A) et de fluorescence (B, C, D, E). La barre d'échelle est de 5 µm. 211

Figure 59: Cartographies AFM en mode PeakForce QNM (topographie, amplitude, déformation de surface, adhésion pointe-échantilllon, modules élastiques selon le modèle de Sneddon et DMT) acquises sur une surface de 20×20 µm2 montrant des globules gras préservés dans un tampon PIPES-NaCl à pH 6.7 et à 20°C.les flèches blanches indiquent les domaines, et les bleus indiquent les zones supposées être riche en protéines. 214

Figure 60: Cartographies AFM en mode PeakForce QNM (topographie, amplitude, déformation de surface, adhésion pointe-échantilllon, modules élastiques selon le modèle de Sneddon et DMT) acquises sur une surface de 5×5 µm2 montrant la surface de deux globules gras différents dans un milieu liquide PIPES-NaCl à pH 6.7 et à 20°C. les flèches blanches indiquent les domaines, et les bleus indiquent les zones supposé être riche en protéines. 216

Figure 61: Schéma représentatif en 2D de la bicouche externe de la MFGM montrant les différentes compositions et structure des trois phases de propriétés mécaniques différentes observées à la surface du globule gras. 217

Figures des articles

<u>Article 1:</u>

Figure 1: Changes in the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane of sheep, goat and bovine milk fat globules upon heating from 4°C to 60°C at 10°C.min^{-1}. Images are the overlay of DIC and confocal microscopy images after labelling of the phospholipids with Rh-DOPE (red). Scale bars correspond to 5 lm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Figure 2: Effects of storage time at 4 °C on the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane (MFGM) of sheep, goat and bovine milks heated to 60 °C (T > Tm; top) then cooled at dT/dt > 100 °C. min^{-1} to 4 °C (T < Tm; bottom). Images are the overlay of DIC and CLSM images showing the heterogeneous distribution of polar lipids after labelling of the milk fat globule membrane with Rh-DOPE (red). Top: surface of milk fat globules in milks heated to 60 °C; arrows show fat globules without observable lipid domains in the MFGM. Bottom left column: surface of milk fat globules in milks heated to 60 °C, cooled to 4 C and rapidly studied at 4 °C. Bottom right column: surface of milk fat globules heated to 60 °C, cooled to 4 °C and studied after overnight storage at 4 °C. Scale bars correspond to 5 lm.

Figure 3: Effects of storage time at 4 °C on the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane of sheep, goat and bovine milks stored at 20 °C (T < Tm; left column), then cooled to 100 C.min^{-1} to 4 °C (T < Tm; middle and right columns). Images are the overlay of DIC and CLSM images after labelling of the milk fat globule membrane with RhDOPE (red). Left column: surface of milk fat globules in milks stored at 20 °C; middle column: surface of milk fat globules in milks cooled to 4°C and studied rapidly; Right column: surface of milk fat globules after overnight storage at 4°C. The scale bars are indicated in the figures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Figure 4: Schematic summary of the morphological changes in the lipid domains in the biological membrane surrounding fat globules in bovine, sheep and goat milk according to the time-temperature route. Left panel: effects of heating of refrigerated milks to T = 60 °C (i.e. above the melting temperature Tm). Three responses were observed: (1) reduction of domain size, (2) coalescence due to increased diffusion, and (3) complete melting. Right panel: effects of quenching milk warmed to 60 °C down to temperatures T = 4 or 20 °C, i.e. below Tm (dT/dt > 100 °C.min^{-1}) then storing the sample at T for 16 h. Two responses were hypothesized depending on whether the milk fat globules exhibited domains at 60 °C or not: in the absence of initial domains, nucleation and growth of small domains in the gel phase that first connected into networks, then coalesced (dashed line); or in the presence of initial domains, growth of the domains by addition of small angular gel phase material, then rearrangement into circular domains (continuous line). The Tm values of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), milk fat globule membrane polar lipid extract (MFGM) and milk sphingomyelin (milkSM) are indicated on the temperature scale (left axis).

Figure S1: Microstructure of fat globules in bovine, sheep and goat milks. (A) Size distributions of milk fat globules determined by laser light scattering. Microscopy images showing milk fat globules in (B) bovine, (C) goat and (D) sheep milks, by combining DIC and CLSM images after labelling of triacylglycerols with Nile red (red color). The scales bars are indicated in the figures.

Figure S2: Phase separation of polar lipids in the milk fat globule membrane (MFGM) observed at different temperatures ranging from 4 to 60°C in sheep (A), goat (B) and bovine (C) raw milks. Images are the overlay of differential interferential contrast and of confocal microscopy images after labelling of the phospholipids with Rh-DOPE (red color). The lipid domains appear as non-fluorescent black areas.

Figure S3: Images showing milk fat globules of sheep, goat or bovine milks with a homogeneous distribution of the fluorescent dye Rh-DOPE used for the labelling of the phospholipids (red color) in the MFGM at 60°C (A) or 4°C (B). Images are the overlay of differential interferential contrast and confocal microscopy images. The scale bars are indicated in the figures.

Figure S4: Effect of storage time at 20°C on the packing of polar lipids in the milk fat globule membrane of sheep, goat and bovine milks heated at 60°C (T>Tm) then cooled to 20°C (T<Tm) at dT /dt > 100°C.min^{-1}. Images are the overlay of DIC and CLSM images showing the heterogeneous distribution of polar lipids after labelling of the milk fat globule membrane with Rh-DOPE (red color). Left column: surface of milk fat globules in milks heated at 60 °C cooled to 20°C and rapidly observed. Right column: surface of milk fat globules heated at 60°C and observed after overnight storage at 20°C. The scale bars correspond to 5 µm.

<u>Article 2:</u>

Figure 1: (A) Composition, in % weight of the total polar lipids, of the milk fat globule membrane (MFGM) extract in polar lipids PE (phosphatidylethanolamine), PI (phosphatidylinositol), PS (phosphatidylserine), PC (phosphatidylcholine) and MSM (milk sphingomyelin); (B) Composition, in % weight, of the fatty acids present in the polar lipids of the MFGM extract (in orange) and in the milk sphingomyelin as a reference (in grey).

Figure 2: (A) AFM topography images and the corresponding Young modulus (E) map of supported milk fat globule membrane (MFGM) polar lipid extract bilayers. In the orange and green inserts, we show the E histograms obtained after batch analysis of the individual force curves separately recorded upon separated mapping onto the fluid phase or gel phase, respectively. (B) Typical AFM topography images, with different scan sizes, of supported lipid bilayers of mixtures of MFGM polar lipids (left column), the corresponding Young modulus (E) mapping experiments (center column), and the resulting E histograms obtained after batch analysis of the individual force curves (right column). The white arrows indicate subdomains and the colors of the square symbols refer to the maps' color scale, showing the existence of bimodal distributions. All images and force mapping experiments were performed in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7, at 20°C.

Figure 3: (A) Effect of heating on the lateral organization and the mechanical properties of MFGM polar lipids supported bilayers investigated by atomic force microscopy. AFM images and the corresponding Young modulus mapping and histograms were recorded at 20°C and 50°C in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7. (B) Typical force-distance curve recorded in the gel or fluid phases at 20°C or in the fluid phase at 50°C.

Figure 4: Effect of the phase state of milk SM, as modified by temperature and cholesterol, on the topography and Young modulus values of supported milk SM bilayers. AFM topography images, Young modulus mapping and the corresponding histograms were recorded at 20°C or 50°C in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7.

Figure 5: Comparison of the average Young modulus values obtained at 20°C or at 50°C in PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer, pH 6.7, on indenting milk SM or milk SM/chol (50:50% mol) supported bilayers.

<u>Article 3:</u>

Figure 1: (A) Molecular structures of the unsaturated DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) and saturated DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine). (B) Differential scanning calorimetry thermograms of DOPC (blue trace) and DPPC (red trace) multilamellar vesicles recorded on heating at 2°C.min^{-1}. (C) X-ray diffraction patterns of DOPC and DPPC fully hydrated multilamellar vesicles recorded at 20°C at small (left) and wide (right) angles. (D) Small angle X-ray Scattering of DPPC SUV recorded on heating. Unilamellar SAXS model at low and high temperature are superimposed. All experiments were performed in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7.

Figure 2: Characterization of the shape and size of DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) or DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) liposomes. (A) and (D) Cryo-TEM images of the DOPC and DPPC liposomes, respectively; scale bars are 100 nm. (B) and (E) Dynamic light scattering size distribution in intensity of the DOPC and DPPC liposome suspensions, respectively; and (C) and (F) typical AFM 3D images of DOPC and DPPC liposomes, respectively. All experiments were performed in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20°C.

Figure 3: AFM indentation measurement on DOPC (dioleoylphosphatidylcholine, in blue) or DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine, in red) liposomes adsorbed on silicon substrate. (A) and (C) show the breakthrough force curves obtained as a result of tip penetration into DOPC or DPPC

supported lipid bilayers, respectively. The average bilayer thickness value d was measured from the jump-through distance (n=50). (B) and (D) show typical force curves acquired during indentation of, respectively, DOPC or DPPC liposomes in the elastic regime; in order to infer the bilayer stiffness k from the slope after tip-membrane contact. For the sake of clarity, the force curves are shifted along the Y axis. All measurements were recorded in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20°C.

Figure 4: Distributions of the Young moduli E and of the bending rigidity k_C, independent of liposome size, of DOPC (n=108) and DPPC (n=71). (A) and (C) show the superposition of both DOPC and DPPC frequency distributions for E and k_C, respectively. (B) and (D) show respective enlargements of the E and k_C frequency distributions for the DOPC liposomes. All measurements were recorded in aqueous PIPES/NaCl/$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20°C.

<u>Article 4:</u>

Figure 1: (A) Structure of the milk sphingomyelin (milk SM); the left panel shows the composition of the long chain base (in green), after Byrdwell and Perry (2007); and the right panel shows the N-acyl chain composition (in orange) after the Avanti Polar Lipids web site (https://avantilipids.com). (B) Molecular structures of the synthetic palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM); lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM) and nervonoyl sphingomyelin (C24:1-SM). (C) Molecular arrangements of symmetric (C16:0-SM) or asymmetric (C24:0-SM) sphingomyelin molecules in gel-phase bilayers, showing the two possible interdigitated gel phases of the asymmetric C24:0-SM due to the mismatch between the sphingosine and the acyl chains.

Figure 2: Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of multilamellar vesicles prepared with milk sphingomyelin (milk SM), palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM), lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM), their equimolar mixture C16:0-SM/C24:0-SM and the mixture of 95% mol C24:0-SM with 5% mol nervonoyl-sphingomyelin (C24:1-SM) when in the form of multilamellar vesicles in 10 mM PIPES, 50 mM NaCl and 10 mM $CaCl_2$, pH 6.7. The temperatures of the transitions of milk SM and synthetic SM liposomes are given above the respective DSC signals.

Figure 3: Typical AFM images and the corresponding cross sections profiles of bilayer patches of: (A) milk sphingomyelin (Milk SM), (B) palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM), (C) lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM), (D) C24:0-SM/C16:0-SM 50:50 mol:mol and (E) C24:0-SM/ nervonoyl-sphingomyelin (C24:1-SM) 95:5 mol:mol. The value d of the bilayers thickness is measured as showed on the right panel on various regions of the images for three different samples (n=29), in aqueous PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at pH = 6.7 and at 20°C. The calculated average value of d is indicated on the figure.

Figure 4: Typical 3-dimensional reconstituted AFM image of a milk sphingomyelin (SM) liposome and the corresponding Young modulus distributions (n=167; blue bars) of the milk SM membranes. The results are compared with the Young modulus distributions obtained with DOPC (pink bars) and DPPC liposome membranes (green bars) in the same experimental conditions (Et-Thakafy et al., 2017a). All measurements were recorded in aqueous PIPES-NaCl-$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20°C.

Figure 5: Typical 3-dimensional reconstitution of AFM images of liposomes adsorbed onto silicon substrate (left panel) and the corresponding Young modulus distributions (right panel) of : (A) palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM; n = 180); (B) lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM; n = 90); (C) C24:0-SM/C16:0-SM (50:50%mol; n = 230) and (D) C24:0-SM/ nervonoyl-sphingomyelin (C24:0-SM/C24:1-SM 95:5%mol; n=85). (B) and (C) histograms show the Young modulus distributions calculated for high and low thickness of the C24:0-SM and the C24:0-SM/C16:0-SM bilayers (grey for the high thickness d, blue for low thickness d). All measurements were recorded in aqueous PIPES-NaCl-$CaCl_2$ medium at pH = 6.7 and at 20°C. SM= sphingomyelin. Solid lines represent Gaussian fittings.

Figure 6: Comparison of the Young modulus E (A) and bending rigidity k_C (B) values of liposomes membranes of various compositions: dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), milk sphingomyelin (milk SM), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), palmitoyl sphingomyelin (C16:0-SM), lignoceroyl sphingomyelin (C24:0-SM), C24:0-SM/C16:0-SM (50:50 % mol) and C24:0-SM/ nervonoyl-sphingomyelin (C24:0-SM/C24:1-SM=95:5%mol), determined by AFM indentation (PIPES buffer, pH= 6.7, T=20°C. Analysis of variance; Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

Annexe

Annexe A: Publication scientifique

Publication acceptées :

Et-Thakafy, O., Guyomarc'h, F., & Lopez, C. (2017). Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time. Food Chemistry, 220, 352-361.

Guyomarc'h, F., Chen, M., **Et-Thakafy, O**., Zou, S., & Lopez, C. (2017). Gel-gel phase separation within milk sphingomyelin domains revealed at the nanoscale using atomic force microscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1859, 949-958.

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Mériadec, C., Artzner, F., Lopez, C., & Guyomarc'h, F. (2017). Mechanical properties of membranes composed of gel-phase or fluid-phase phospholipids probed on liposomes by atomic force spectroscopy, Langmuir, 33, 5117-5126.

Publication en soumission:

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Lopez, C., & Fanny, G. H. Mechanical properties of milk SM bilayer membrane in the gel phase: effects of natural complex heterogeneity, saturation and acyl chain length investigated on liposomes using AFM.

Publication en préparation :

Et-Thakafy, O., Guyomarc'h, F., & Lopez, C. (2017). Mechanical investigation on complex membrane model of milk fat globule membrane: Effect of cholesterol and temperature.

Annexe B : Communications scientifiques

Communication orale

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Lopez, C., & Guyomarc'h, F.., Les propriétés mécaniques des membranes lipidiques en phase gel ou fluide: indentation des liposomes par spectroscopie AFM. 7ème RBPGO Rencontres Biologie-Physique du Grand, Nantes, France, 23-24 Juin 2016.

Lopez, C.,**Et-Thakafy, O**., Murthy.A.V.R & Guyomarc'h, F. , Lipid domains in the biological membrane surrounding milk fat globules: role of temperature and cholesterol on their morphology and nanomechanical properties. Euro Fed lipid, Uppsala, Sweden 27-30 August 2017.

Communication Par affiche (poster)

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Vié, V., Lopez, C., & Guyomarc'h, F. ,Mechanical properties of membranes composed of gel-phase or fluid-phase phospholipids probed by AFM on liposomes. AFM BioMed Conference Porto, Portugal, 11-15April 2016.

Et-Thakafy, O., Guyomarc'h, F., & Lopez, C., Lipid domains in the milk fat globule membrane: Dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time. IDF world dairy summit conference, Rotterdam, Netherland, 16-21 October 2016.

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Lopez, C., & Guyomarc'h, F., Mechanical properties of membranes composed of milk polar lipids in gel or fluid phase probed by AFM on liposomes. IDF world dairy summit conference, Rotterdam, Netherland, 16-21 October 2016.

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Lopez, C., & Guyomarc'h, F., Mechanical properties of membranes composed of gel-phase or fluid-phase phospholipids probed by AFM on liposomes. RBPGO Rencontres Biologie-Physique du Grand, Nantes, France, 23-24 Juin 2016.

Et-Thakafy, O., Guyomarc'h, F., & Lopez, C., The effect of temperature and time on the microstructure of milk fat globule. Lait, vecteur de development, Rabat, 10-12 May 201.

Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Lopez, C., & Guyomarc'h,F., Key role of lipid composition and phase on the mechanical properties of membranes probed by AFM on liposomes, Euro Fed lipid, Uppsala, Sweden 27-30 August 2017.

Lipid domains in the milk fat globule membrane: the dynamics investigated *in situ* in milk in relation to temperature and time

O. Et Thakafy, F. Guyomarc'h, C. Lopez
Science and Technology of Milk and Eggs (STLO), UMR 1253, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France
Christelle.Lopez@inra.fr

The milk fat globule membrane (MFGM)

Milk is an emulsion of fat droplets stabilized by a biological membrane called the milk fat globule membrane (MFGM; Figure 1). The MFGM is mainly composed of polar lipids that have different melting temperatures (T_m), cholesterol, glycoproteins, and enzymes. The microstructure of the MFGM depends on the packing of polar lipids in the outer bilayer of the membrane that can lead to phase separation with formation of ordered domains (Figure 2). Milk is usually submitted to changes in temperature e.g. storage (4-7°C), churning (10-12°C) and heat treatments (e.g. pasteurization). Do these temperature variations and thermal history of milk affect the packing of polar lipids in the plane of the MFGM ?

Experiments were performed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) under temperature controlled conditions, using the head-labelled phospholipid fluorescent probe Rh-DOPE. Only the fluid phase of MFGM was labelled.

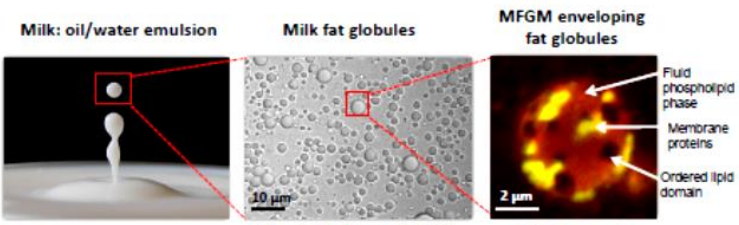


Fig.1 — *Differential interference contrast (DIC) microscopy* — *confocal laser scanning microscopy*

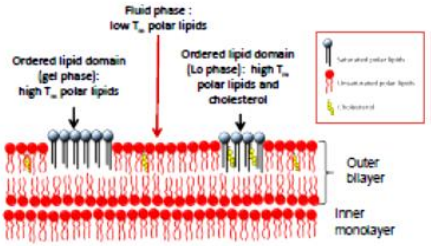
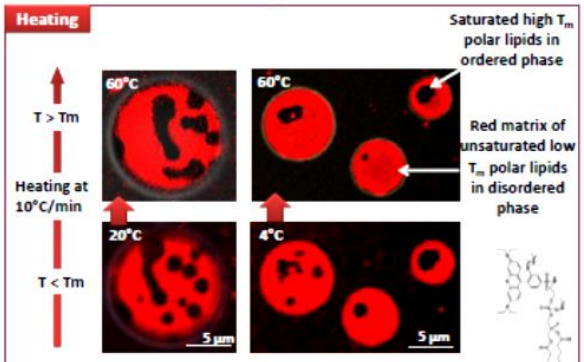


Fig.2 2D representation of the MFGM

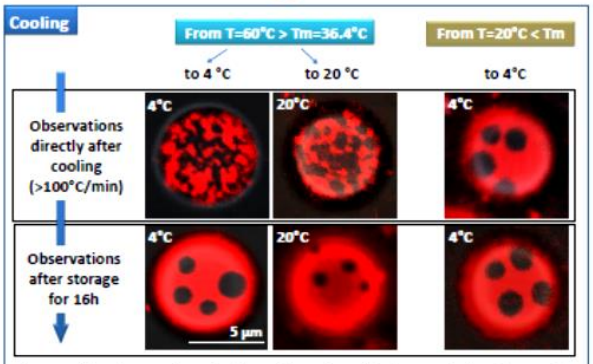
Dynamics and reorganization of MFGM polar lipids investigated upon milk heating or cooling

Heating of milk favors the diffusion of the lipid domains, coalescence, reduction in size or complete melting of the polar lipids (disappearance of domains)

Rapid cooling of milk from 60°C favors the appearance of small elongated domains while extended storage induces lipid reorganizations within the MFGM with growth leading to large circular lipid domains



The disappearance of domains at 60°C was interpreted as gel to fluid phase transition of the saturated high T_m polar lipids. Meanwhile, the domains present at 60°C must be in liquid ordered (Lo) phase due to the involvement of cholesterol.



After cooling from 60°C, the formation of small elongated domains at the surface of milk fat globules was interpreted as fluid to gel phase transition of the saturated high T_m polar lipids.

Cooling from 20°C had no effect on lipid domains (circular shape & number), which was probably due to the fact that the temperature quench of 20°C did not encompass the T_m of the MFGM polar lipids.

Conclusion & Outlooks:

This study demonstrates that the packing of polar lipids within the MFGM strongly depends on the temperature and the thermal history of milk. Changes in the morphology and physical properties of the lipid domains induced by temperature and time could affect many interfacial mechanisms involved in e.g. lipid digestion, adsorption of enzymes, bacteria or viruses, localization of proteins, and could also alter the physical stability of fat globules during milk processing.

Et Thakafy, O., F. Guyomarc'h & Lopez, C. Lipid domains in the milk fat globule membrane: the dynamics investigated in situ in milk in relation to temperature and time. Food Chemistry. DOI.10.1016/j.foodchem.2016.10.017

IDF World Dairy Summit, 16-21 October 2016 Rotterdam, The Netherlands

Acknowledgements for co-funding the PhD thesis

INRA - Agrocampus Ouest
Science and Technology of Milk and Eggs
Rennes, FRANCE
www.rennes.inra.fr/stlo

Mechanical properties of membranes composed of gel-phase or fluid-phase phospholipids probed by AFM on liposomes.

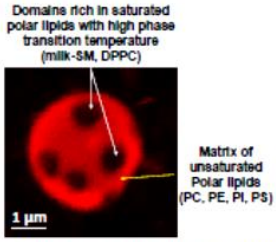
O. Et Thakafy[1,2], N. Delorme[3], C. Gaillard[4], V. Vié[5], J. Léonil[1,2], C. Lopez[1,2], F. Guyomarc'h[1,2]
[1] INRA, UMR 1253 Science and Technology of Milk and Egg, Rennes, France
[2] AGROCAMPUS OUEST, UMR 1253 Science and Technology of Milk and Egg, Rennes, France
[3] Université du Maine, UMR CNRS 6283 Institut des Molécules et Matériaux du Mans, Le Mans, France
[4] INRA, UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes, France
[5] Université de Rennes1, UMR CNRS 6251 Institut de Physique de Rennes, Rennes, France
fanny.guyomarch@rennes.inra.fr

Introduction

The mechanical properties of lipid membranes can affect the physical stability and functions of e.g. liposomes in drug delivery, or biological systems such as the milk fat globule membrane (MFGM). The MFGM is a biological membrane in which saturated polar lipids, mainly the sphingomyelin (milk-SM; ~30 %wt/wt of milk polar lipids), segregate to form ordered (gel or Lo) phase domains dispersed in a fluid phase composed by unsaturated polar lipids (Lopez et al., 2010).

Do these ordered phase domains composed by saturated polar lipids create a mechanical heterogeneity in the plane of the MFGM ?

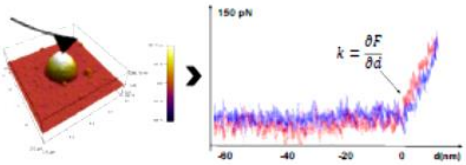
To answer this question, we have compared the elasticity of milk-SM bilayers organized as vesicles with those of saturated DPPC and unsaturated DOPC.



Confocal microscopy image showing, in situ in milk, the heterogeneous distribution of polar lipids in the outer bilayer of the milk fat globule membrane (MFGM) with the formation of sphingomyelin-rich domains

Materials & methods

- Unilamellar vesicles of milk-SM, DOPC or DPPC hydrated in PIPES buffer in presence of NaCl and $CaCl_2$ at pH 6.7 (milk pH). Vesicle size about 100 nm.
- Immobilization of the vesicles onto flat substrates of chemically modified gold. AFM imaging in PIPES buffer in contact mode then using local indentation. Rigidity was measured to calculate elasticity (Delorme & Fery, 2006):

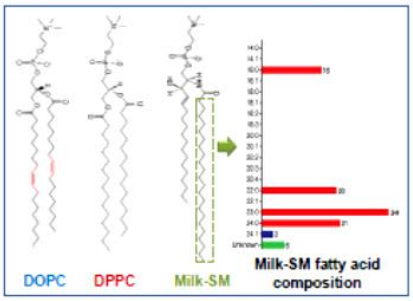


K Membrane rigidity (N/m)
E Young modulus (MPa)
h Membrane thickness (m)
ν Poisson ratio
R Vesicle curvature radius

$$E = \frac{R \times \sqrt{3(1-\nu^2)} \times k}{4h^2}$$

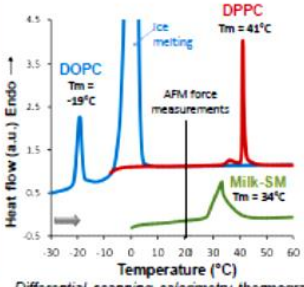
Fatty acid composition of polar lipids affects the elasticity of membranes

Chemical composition → **Physical state** → **Mechanical properties**

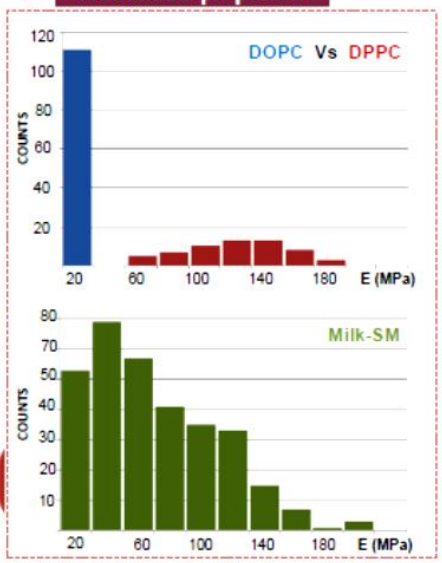


Unsaturated (DOPC) and saturated (DPPC) polar lipids versus molecular species of milk sphingomyelin (milk-SM).

DOPC: dioleoylphosphatidylcholine (18:1), DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine (16:0). Milk-SM contains long chain saturated fatty acids and 3% of unsaturated 24:1.



Differential scanning calorimetry thermograms recorded on heating at 2°C/min of DOPC, DPPC and milk-SM multilamellar vesicles, showing the gel to fluid phase transition temperature (Tm).



Elasticity distribution of DOPC, DPPC and milk-SM vesicles; force mesurements were recorded at 20°C.

Elasticity of lipid membranes depends mainly on the physical state of lipids (gel vs. fluid) and consequently on their chemical composition (unsaturated vs. saturated). At 20°C, DOPC bilayers in the fluid state had a lower elasticity (4 MPa) compared to DPPC bilayers in the gel state (130 MPa). Interestingly, milk-SM bilayers in the gel phase had dispersed values ranging from 20 to 200 MPa. This could be interpreted by the coexistence of several molecular species, i.e. the presence of saturated fatty acids with various chain lengths and the presence of unsaturated fatty acid 24:1 which can affect the organization of the bilayer.

Conclusion & Perspectives:

The elasticity values obtained for milk-SM in gel phase was not excepted; our hypotheses that we want to confirm (1) SM 24:1 have a strong effect on vesicle elasticity and (2) the effect of milk SM polar lipid heterogeneity on lateral organization. These results will serve as reference values for further investigations on membranes containing both gel phase and fluid phase phospholipids such as biphasic vesicle of MSM and DOPC

AFM Biomed 2016 -11-15 april-Porto-Portugal

INRA -AGROCAMPUS OUEST
Sciences and technology of Milk and Egg
Rennes , FRANCE
www.rennes.inra.fr

Key roles of lipid composition and phase on the mechanical properties of membranes probed by AFM on liposomes

O. Et Thakafy[1], N. Delorme[2], C. Gaillard[3], F. Guyomarc'h[1], C. Lopez[1]
[1]STLO, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France ; [2]IMMM, Le Mans, France ; [3]BIBS, INRA, Nantes, France
Christelle.lopez@inra.fr

Milk polar lipids for liposome applications :

Milk polar lipids have great potential for new product applications with unique physical properties, such as liposomes. The nanomechanical properties of the membrane envelope are essential to ensure, e.g., physical stability, protection, or penetration into tissues. For instance, the elasticity, measured as the Young modulus, is indicative of the rigidity of the membrane. Milk polar lipids possess different structures of molecules: saturated with high melting temperatures (Tm), in particular the milk sphingomyelin (milk SM, Tm =35°C); or unsaturated with low Tm (DOPC, Tm=-19°C). Thus, gel and fluid phases can coexist at a given temperature.

Does variation in the composition and/or phase state affect the mechanical properties of the liposome membrane?

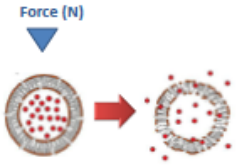


Fig.1: Delivery of encapsulated molecules depends on mechanical properties of membranes

Materials & methods:

Vesicles of milk SM, synthetic SM (C16:0, C24:0, C24:1), DOPC or DPPC suspended in PIPES buffer (NaCl, $CaCl_2$, pH 6.7; milk pH). Thermotropic properties of lipid membranes were characterized using differential scanning calorimetry (DSC). Elasticity of the liposome membranes was measured by atomic force microscopy (AFM) spectroscopy in using local indentation at 20°C.

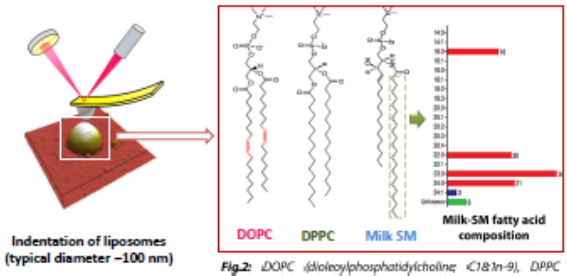


Fig.2: DOPC (dioleoylphosphatidylcholine; C18:1n-9), DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine; C16:0). Milk SM contains long chain saturated fatty acids and 3% of unsaturated C24:1.

Phase and composition of polar lipids affect the elasticity of membranes

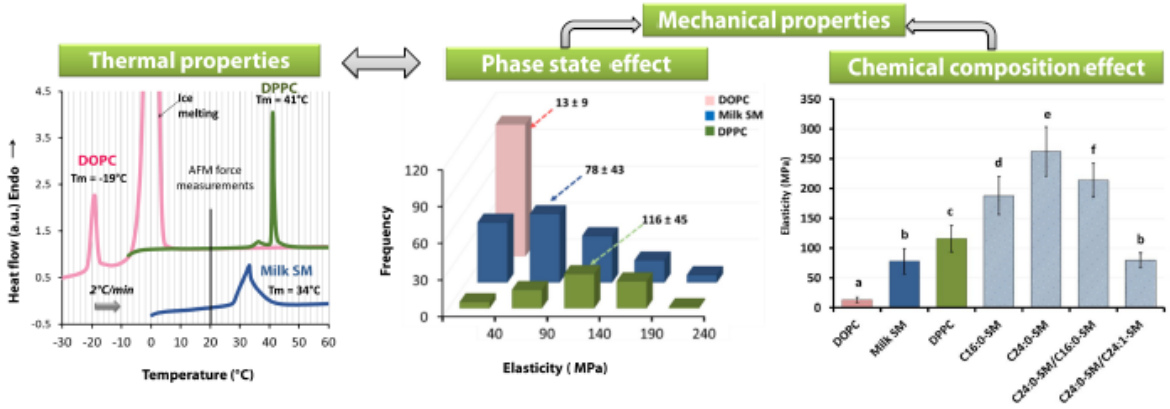


Fig.3: DSC of DOPC, DPPC or milk SM, showing the gel to fluid phase transition temperature (Tm).

Fig.4: The elasticity distributions obtained at 20°C on liposome membranes composed of DOPC in fluid phase; milk SM or DPPC in gel phase.

Fig.5: Comparison of the elasticities of liposome membranes of various compositions: DOPC, milk-SM, DPPC, C16:0-SM, C24:0-SM, C24:0-SM/C16:0-SM (50:50 % mol) or C24:0-SM/C24:1-SM (95:5%mol) at 20°C. Different letters indicate significant difference ($p<0.05$).

The elasticity of lipid membranes depends mainly on the physical state of lipids (gel vs. fluid) and the chemical composition. At 20°C, DOPC bilayers in the fluid state exhibited a lower elasticity (13 MPa) compared to DPPC bilayers in the gel state (116 MPa) [1]. Interestingly, milk-SM bilayers in the gel phase had dispersed values ranging from 20 to 250 MPa with 78 MPa as a mean value. A model system composed of synthetic SM was studied in the gel phase to demonstrate that intermediate values of the elasticity of the milk SM membranes were a result of its heterogeneity of composition. The introduction of C16:0-SM into C24:0-SM membrane decreased the elasticity of C24:0-SM. Similarly, the presence of unsaturated molecules as C24:1-SM disturbed the order of C24:0-SM membrane and consequently dramatically decreased the mechanical properties of the membranes. These results explained why the milk SM exhibited unexpectedly weak elasticity when in the gel phase, despite it high content of long and saturated polar lipids.

Outlooks:

These results open perspectives for liposome applications where the mechanical properties of the membrane are essential to ensure stability such as encapsulation in drug delivery or cosmetics. Biocompatible, affordable liposomes can for instance be designed using milk polar lipid ingredients. This study will also serve as reference for future investigations on membrane containing both gel phase and fluid phase phospholipids, such as biphasic liposomes of MSM and DOPC .

[1] Et-Thakafy et al., (2017). Mechanical properties of membranes composed of gel-phase or fluid-phase phospholipids probed on liposomes by atomic force spectroscopy. 33(21):5117-5126.

Acknowledgements for co-funding the PhD thesis

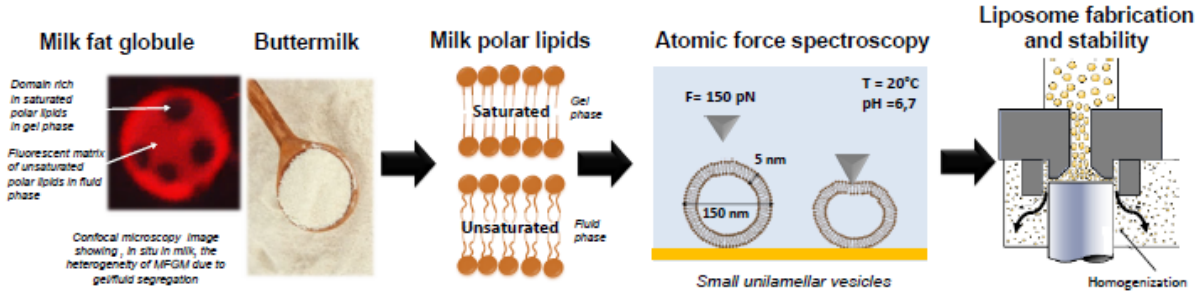
INRA-AGROCAMPUS OUEST
Science and Technology of Milk and Eggs
Rennes, FRANCE
www.rennes.inra.fr

Mechanical properties of membranes composed of milk polar lipids in the gel or fluid phase probed by AFM on liposomes

O. Et Thakafy[1], N. Delorme[2], C. Gaillard[3], C. Lopez[1], F. Guyomarc'h[1]
[1]STLO, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France ; [2]IMMM, Le Mans, France ; [3]BIBS, INRA, Nantes, France
Oumaima.etthakafy@inra.fr

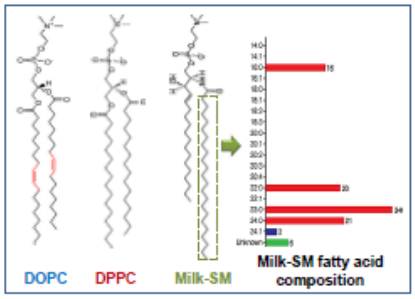
Milk polar lipids for liposome applications :

The milk fat globule membrane (MFGM) has recently gained a lot of attention, due to the growing interest in its nutritional and technological properties. Its composition, rich in polar lipids, has great potential for new product applications with unique physical properties such as liposomes. Milk polar lipids might be advantageous for both the stability and the biological acceptance of the formulation. Milk polar lipids possess different structures of molecules: saturated with high melting temperatures (Tm),in particular the milk sphingomyelin (SM,Tm 35°C); or unsaturated with low Tm. Does this difference in the molecular structure affect the mechanical properties of the membranes?



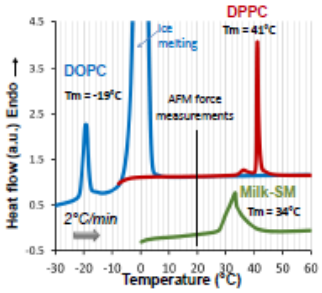
Fatty acid composition of polar lipids affects the elasticity of membranes

Chemical composition → **Physical state** → **Mechanical properties**

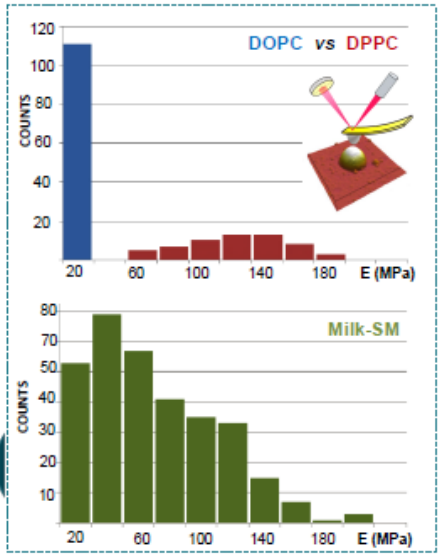


Unsaturated (DOPC) and saturated (DPPC) polar lipids versus molecular species of milk sphingomyelin (milk-SM).

DOPC: dioleoylphosphatidylcholine (18:1), DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine (16:0). Milk-SM contains long chain saturated fatty acids and 3% of unsaturated 24:1.



Differential scanning calorimetry thermograms of DOPC, DPPC and milk-SM multilamellar vesicles, showing the gel to fluid phase transition temperature (Tm).



Distribution of elasticity values for DOPC, DPPC and milk-SM vesicles, recorded at 20°C.

The elasticity of lipid membranes depends mainly on the physical state of lipids (gel vs. fluid) and consequently on their chemical composition (unsaturated vs. saturated). At 20°C, DOPC bilayers in the fluid state exhibited a lower elasticity (4 MPa) compared to DPPC bilayers in the gel state (130 MPa). Interestingly, milk-SM bilayers in the gel phase had dispersed values ranging from 20 to 200 MPa. This could be interpreted by the coexistence of several molecular species, i.e. the presence of saturated fatty acids with various chain lengths or the presence of unsaturated fatty acid 24:1 which may disturb the organization of the bilayer.

Outlooks:

These results open perspectives for liposome applications where the mechanical properties of the membrane are essential to ensure stability such as encapsulation in drug delivery or cosmetics. This study will also serve as reference for future investigations on membrane models of the MFGM to increase our knowledge of the role of heterogeneity in the stability of milk fat globule during processing or digestion.

IDF World Dairy Summit, 16-21 October 2016 Rotterdam, The Netherlands

Acknowledgements for co-funding the PhD thesis

INRA -AGROCAMPUS OUEST
Sciences and technology of Milk and Egg
Rennes , FRANCE
www.rennes.inra.fr

Biochimica et Biophysica Acta 1859 (2017) 949–958

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Gel-gel phase separation within milk sphingomyelin domains revealed at the nanoscale using atomic force microscopy

Fanny Guyomarc'h [a], Maohui Chen [b], Oumaima Et-Thakafy [a], Shan Zou [b], Christelle Lopez [a,*]

[a] STLO, UMR1253, INRA, Agrocampus Ouest, 35000 Rennes, France
[b] Measurement Science and Standards, National Research Council of Canada, Ottawa, ON K1A 0R6, Canada

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 November 2016
Received in revised form 10 February 2017
Accepted 14 February 2017
Available online 16 February 2017

Keywords:
Milk sphingomyelin
Phase separation
Membrane topography
Chain interdigitation
Lipid domain

ABSTRACT

The milk sphingomyelin (MSM) is involved in the formation of ordered lipid domains in the biological milk fat globule membrane (MFGM), where it accounts for about 30%wt of the polar lipids. Moreover, MSM exhibits a large variety in saturated acyl chain lengths (from C16:0 to C24:0-SM) compared to other natural sphingomyelins, which may impact the packing of MSM molecular species in the gel phase domains and the topography of the MFGM. To investigate this, supported lipid bilayers of synthetic sphingomyelins or of MSM-containing mixtures, including a MFGM polar lipid extract, were imaged at temperatures below the Tm of MSM (i.e. <34 °C for which MSM is in the gel phase) in hydrated conditions using atomic force microscopy. In all compositions containing MSM, the MSM-rich gel phase domains exhibited lower and upper height levels H, interpreted as two distinct gel phases with $\Delta H \sim 0.5–1.1$ nm. Two (lower and upper) gel phases were also found for pure C24:0-SM bilayers or for bilayers of a C16:0-SM/C24:0-SM equimolar mixture, while C16:0-SM bilayers were uniformly flat and less thick than C24:0-SM bilayers. The upper gel phase of MSM-containing bilayers was interpreted as mixed interdigitated C24:0-SM molecules, while the lower gel phase was attributed both to fully interdigitated C24:0-SM molecules and non-interdigitated C16:0-SM molecules. These results show that the composition of natural sphingomyelins, inducing a mismatch between the d18:1 sphingosine and the acyl chains, is important in both the internal organization and the topography of biological membranes, especially that of the MFGM. This organization could be involved in specific biological functions, e.g. the insertion of proteins.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The existence of domains in biological membranes has prompted considerable interest in recent years since they serve to cluster specific proteins and lipids and have been implicated in a variety of cellular functions [1]. Domains in all the biological membranes involve the presence of polar lipids with high phase transition temperature (Tm), among which sphingolipids, in particular the sphingomyelin [1,2]. Sphingolipids also act as intracellular secondary messengers. Sphingomyelin (SM) is the most abundant sphingolipid and one of the major polar lipids in the mammalian cell plasma membrane. Authors reported that the SM chain length influences the localization of transmembrane proteins in the domains [3]. The chemical composition of SM natural species, e.g. with respect to chain length, could therefore affect the functions of the SM-rich domains and membrane proteins. Among natural SMs, that found in milk is of high interest with respect to its complex composition and its implication in the formation of lipid domains in the biological membrane surrounding milk fat globules, the milk fat globule membrane (MFGM). This biological membrane has been reported to be involved in the mechanisms of milk fat globule digestion, in the protection of the neonate from bacterial infections, and in the neuronal development in infants. The structural organization, biophysical properties and biological functions of the MFGM require further investigations to be fully understood.

Using the fluorescent labeling of the disordered phase polar lipids and confocal laser scanning microscopy, lipid domains were clearly evidenced at the surface of the MFGM [4–7]. These results were interpreted as the consequence of lipid disordered/ordered phase separation, yielding to the lateral segregation of high-Tm polar lipids, especially the milk sphingomyelin (MSM), into ordered-phase domains. The MSM accounts for 20 to 35% wt of the milk polar lipids in the MFGM [7,8]. The MSM contains several molecular species, having various fatty acyl chain lengths ranging from 16 to 24 atoms of carbon, with C16:0, C22:0 and C24:0 being about 20% wt each and C23:0 over 30% wt. [9]. The acyl chains are mainly saturated, but there are a few % wt of mono-unsaturated C20 and C24. As a consequence, the MSM exhibits a broad phase transition with a melting temperature Tm = 32.9–34.3 °C [10,11]. Furthermore, of all available natural SMs, MSM exhibits the widest variation in the

* Corresponding author.
E-mail address: christelle.lopez@inra.fr (C. Lopez).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.02.010
0005-2736/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

long chain sphingosine base, from 16 to 19 carbon atoms, with d18:1 being the most represented [12]. Differences in chain length between the sphingosine base and the acyl chain create a lipid tail mismatch that is responsible for specific biophysical properties [13–15] and could markedly narrow the range of temperatures and compositions where fluid/gel phase separation can occur [10]. The use of spectroscopies, nuclear magnetic resonance and X-ray diffraction has shown that the different chain lengths could lead to interdigitation of the acyl chains of MSM in bilayers [16], in agreement with previous findings on the pure C24:0-SM [17]. Finally, interdigitation of SM's long chains in membranes is thought to bear biological functions e.g. in modifying translational diffusion or the insertion of proteins [18]. The MFGM being the interface with enzymes, milk proteins, bacteria, viruses, or with the newborn's gastro-intestinal tract, it is important to address the role of the peculiar MSM composition in designing the structure of the MFGM in relationship with possible biological functions.

Supported lipid bilayers prepared by the unilamellar vesicle fusion method are pertinent bilayer models to investigate the organization of lipid membranes [19]. Among surface imaging techniques, atomic force microscopy (AFM) has emerged in recent years as a powerful tool able to provide information on specific features on the surface of the supported lipid bilayers [20,21]. AFM permits the visualization of the topography of lipid membranes with nanometer to sub-nanometer resolution and in an aqueous environment. The vertical resolution of the AFM and its high sensitivity allow discrimination between areas with very small height differences, such as phase-separated lipid bilayers. Depending on the imaging mode and/or the applied force, phase-dependent topographical heterogeneity in supported lipid bilayers can be revealed or amplified on the resulting AFM images [22]. In a previous report, we showed that tapping mode imaging of MSM/DOPC 50/50 mol. ratio bilayers revealed the presence of 3 possible phases: that of the fluid DOPC-rich continuous phase and that of the gel MSM-rich domains which happened to exhibit two distinct height levels revealed by AFM [23].

The objectives of this study were to investigate the possibility that various gel phases of MSM coexist into the domains found in the MFGM, possibly in relation with their range of fatty acid chain lengths. AFM was used to investigate the topographical features of bilayers composed of synthetic sphingomyelins, and of various bilayer samples containing the MSM, including MFGM and pure MSM.

2. Experimental methods

2.1. Materials

Sphingomyelin from bovine milk (MSM; >99%), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC; >99%), synthetic N-palmitoyl-D-*erythro*-sphingosylphosphorylcholine (C16:0-SM; >99%) and synthetic N-lignoceroyl-D-*erythro*-sphingosylphosphorylcholine (C24:0-SM; >99%) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) and used as received. The composition of MSM was as detailed in Guyomarc'h et al. [23]. The MFGM polar lipid extract used in this study was the same as in Murthy et al. [11,24,25]. It contained milk polar lipids with the following relative weight percentages: 38.7% MSM, 31.6% PC, 23.5% PE, 3.4% PI and 2.8% PS, as determined by HPLC coupled with evaporative light scattering detection as detailed in Lopez et al. [26]. The fatty acid methyl esters of the polar lipids composing the MFGM extract were analyzed by GC as also described [26]. The results showed that acyl chain lengths of the polar lipids ranged from 10 to 24 carbon atoms, and 65% wt. were saturated. The main saturated fatty acids of the extract were due to the MSM, which contains C16:0, C22:0, C23:0 and C24:0 [9]. The cholesterol and ceramide contents of the MFGM lipid extract were respectively 1.34% wt and 1.12% wt of the total polar lipids and were neglected. PIPES 10 mM (1,4-piperazinediethane sulfonic acid ; purity ≥ 99%; Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA) buffer was prepared with NaCl 50 mM and 0–10 mM $CaCl_2$ (Sigma) in Milli-Q water then adjusted to pH 6.7 using NaOH (0.5 M). Lipid samples were prepared by dissolving MFGM polar lipid extract, MSM, DOPC, C16:0-SM or C24:0-SM in chloroform/methanol (4/1 v/v) or by dissolving appropriate amounts of stock solutions of MSM and DOPC, or of C16:0-SM and C24:0-SM, and by mixing them in the desired molar proportions. The organic solvent was then evaporated under a stream of dry nitrogen at 50 °C and the samples were stored at −20 °C until used.

2.2. Atomic force microscopy

The dried samples were hydrated with PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer using a bath sonicator (Cole Parmer, Montreal, QC) at ~65–70 °C for 60 min to produce small unilamellar vesicles (SUV) with a total concentration of 1.0 $mg \cdot mL^{-1}$ for the lipids. Homemade brass liquid cell was pre-heated in the incubator with 500 μL of PIPES-NaCl-$CaCl_2$ buffer at 70 °C for at least 30 min before 20 μg of melted lipids (20 μL of 1 $mg \cdot mL^{-1}$) was deposited onto freshly cleaved mica in the AFM liquid cell, then incubated at 70 °C for 30 min. The samples were slowly cooled down to room temperature at a cooling rate of ~0.6 °C per min. Once equilibrated, the bilayers were extensively rinsed with PIPES buffer then imaged by AFM at room temperature (indicated in text). Importantly, MSM and MSM/DOPC SUV were produced in PIPES-NaCl buffer with 5 mM $CaCl_2$ and the corresponding bilayers were imaged in the same buffer. Meanwhile, SUV of MFGM polar lipid extract were produced in PIPES-NaCl buffer in absence of $CaCl_2$ but deposited on mica and imaged in PIPES-NaCl buffer with 2 mM $CaCl_2$. Finally, SUV of synthetic C16:0-SM or C24:0-SM or a mixture of both were produced in PIPES-NaCl buffer with 10 mM $CaCl_2$ and imaged in the same buffer. These respective conditions ensured the physical stability of the SUV and supported lipid bilayers.

AFM imaging of supported lipid bilayers of the MFGM polar lipid extract, of MSM or of MSM/DOPC 50/50 mol. was performed in tapping mode using a Nanowizard II BioAFM (JPK Instruments, Berlin, Germany), Pyrex nitride PNP-DB probes (nominal spring constant $k \sim 0.48\ N \cdot m^{-1}$ — Nanoworld, Neuchatel, Switzerland). The amplitude setpoint ratios were kept between 0.6 and 0.7 V/1 V and the loading forces typically below ~2 nN. Individual probes were calibrated in-situ (thermal noise method) and the imaging temperature was 18 ± 2 °C. The typical scan rate was 0.8–1 Hz for 512 × 512 pixels images. AFM imaging of bilayers of the two synthetic sphingomyelin molecules, C16:0-SM and C24:0-SM, and their equimolar mixture was performed in contact mode using an Asylum Research MFP-3D Bio AFM (Oxford Instruments, Santa Barbara, CA, USA) and MSNL probes (nominal spring constant $k \sim 0.03\ N \cdot m^{-1}$ — Bruker Nano Surfaces, Santa Barbara, CA, USA). The typical scan rate was 0.8 Hz for 256 × 256 pixels images. Individual probes were calibrated in-situ (thermal noise method), the loading forces were typically below ~2 nN and the imaging temperature was 20 ± 2 °C. Sections were drawn across images to show height differences *H* between features of the images, and *H* values were obtained statistically through image analysis.

3. Results and discussion

3.1. Topography of supported bilayers prepared with a MFGM polar lipid extract

Hydrated supported bilayers of MFGM polar lipid extract are the most complex and biologically relevant model of the organization of lipids in the MFGM [24,25]. Previous differential scanning calorimetry experiments showed that hydrated bilayers of the MFGM polar lipid extract exhibit a broad gel to fluid phase transition with a maximum at Tm = 36.4 °C [11]. Fig. 1 shows example images of such model bilayers obtained by tapping mode AFM at 18 °C, i.e. below Tm of MFGM polar lipids.

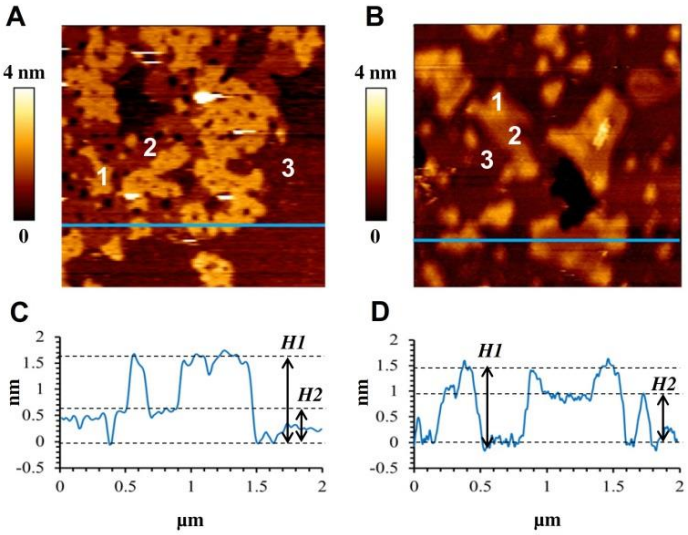


Fig. 1. Observation of multiple phase separation in hydrated bilayers of a polar lipid extract of the milk fat globule membrane (MFGM). Top row (A, B): examples of $2 \times 2\ \mu m^2$ height images obtained on different samples at 18 °C and in PIPES-NaCl-2 mM $CaCl_2$ buffer; bottom row (C, D): cross-section height profiles of the blue lines in height images A and B, respectively. Numbers 1, 2 and 3 in (A, B) designate the 3 phases identified in the bilayers (see text).

These AFM images show the presence of brighter regions attributed to µm-large domains, dispersed in a darker matrix corresponding to the continuous phase (labelled 3 on Fig. 1). In the domains, the lipid bilayers were higher, hence thicker, than the surrounding continuous phase. As previously demonstrated, domains in bilayers of MFGM polar lipid extract can be interpreted as the lateral segregation of the saturated high-Tm polar lipids into gel phase domains, dispersed in a continuous l_d phase of mainly unsaturated polar lipids [25]. Furthermore, images revealed the presence of two height levels within the domains, indicating the presence of two gel phases within the domains and noted as 1 and 2 on Fig. 1. Measurements of the height differences between the continuous l_d phase and the gel phase domains were performed on various sections drawn across AFM height images. Analysis of AFM images showed that the upper phases 1 and 2 protruded above the continuous l_d phase by the respective height steps, $H1 = 1.5$–1.7 nm and $H2 = 0.7$–1.1 nm (standard deviation $\pm$ 0.5 nm within a single image). The height difference, $\Delta H = H1 - H2$, ranged between 0.6 and 1.2 nm across samples (Table 1).

The occurrence of two height levels within the domains of high Tm saturated polar lipids has never been mentioned in earlier reports of AFM imaging of hydrated bilayers of the same MFGM polar lipid extract [24,25]. No such detail could be reported in previous observations using similar samples, similar bilayer preparation procedures, similar probe radii (<10 nm), similar force loads (<2 nN) and contact mode AFM [24,25]. This suggests that tapping mode AFM was easier to trim to detect subtle differences in bilayers with multiple phases, while contact mode would request finer tuning [22]. Among other reasons for the presence of two height levels within the gel phase domains, as listed below, the presence of traces of ceramide in the MFGM polar lipid extract may contribute to the formation of thicker sub-domains within the MSM domain, as already reported for bilayers of DOPC/Egg-SM/Cholesterol model mixtures [22].

Table 1
Height of relevant features measured with atomic force microscopy (AFM) onto the surface of supported lipid bilayers (SLB) of various samples containing either the biological milk sphingomyelin (MSM) or synthetic sphingomyelins (SM). In MSM-containing samples, the thickness of the continuous phase is measured as the height difference between the supporting mica, when visible, and the lower phase of the SLB, regarded as the fluid phase. In MSM-containing samples, *H2* and *H1* are the respective height step increments between the fluid phase and the two gel phases contained into the domains. In samples containing synthetic SM in the gel phase and no fluid phase, *H2* is the thickness of the bilayer, measured as the height difference between the supporting mica and the surface of the bilayer (lowest phase in C16:0-SM/C24:0-SM 50/50 mol.). (*) ΔH was calculated as $H1_{C24:0\text{-}SM} - H2_{C16:0\text{-}SM}$. Other abreviations: MFGM = polar lipid extract of the milk fat globule membrane; DOPC = dioleoylphosphatidylcholine.

Sample	Thickness of continuous phase (nm)	*H2* (nm)	*H1* (nm)	$\Delta H = H1 - H2$ (nm)
Bilayers with biological milk sphingomyelin (MSM)				
MFGM	–	0.7 ± 0.5	1.7 ± 0.5	0.6–1.1
	–	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.5	
MSM/DOPC 50/50 mol.	–	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	~0.5
MSM/DOPC 80/20 mol.	~5.5	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.2	~0.5
MSM	5.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2	~0.8
Bilayers with synthetic sphingomyelins (SM)				
C16:0-SM/C24:0-SM	–	5.7 ± 0.5	6.3 ± 0.2	0.7 ± 0.2
C24:0-SM	–	5.6 ± 0.7	7.5 ± 0.3	~1.9
C16:0-SM	–	6.4 ± 0.4	_	~1.1*

3.2. Topography of MSM/DOPC supported bilayers

To simplify the multicomponent complexity of the lipids found in the MFGM, and to further investigate the topography of MSM-rich gel phase domains dispersed in a fluid phase, bilayers of MSM/DOPC mixtures were imaged at 18 °C using tapping mode AFM (Fig. 2). The AFM images clearly showed the phase separation of the MSM into μm-wide domains, protruding above the continuous DOPC-rich l_d phase, as previously reported [23]. In hydrated supported bilayers, the segregation of MSM in the gel phase to form ordered and rigid domains dispersed in a continuous matrix of unsaturated DOPC in the l_d phase has been already reported [23]. Similar observations were made with egg SM/DOPC [27] or brain SM/POPC bilayers (POPC: palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine — [28]) and the interpretation is also consistent with phase diagrams reported with C16:0-SM and POPC [29].

Furthermore, AFM images showed that two height levels were visible in the gel phase domains. Measurements showed that in 50/50% mol MSM/DOPC bilayers, $H1 = 1.2 \pm 0.1$ nm and $H2 = 0.7 \pm 0.1$ nm above the fluid phase (Table 1), in agreement with the previous report [23]. In 80/20% mol MSM/DOPC bilayers, MSM-rich gel phase domains were also observed with two height levels: $H1 = 1.3 \pm 0.2$ nm and $H2 = 0.8 \pm 0.2$ nm (Table 1). In the binary system containing 80% mol MSM, defects corresponding to tension-driven holes were observed in the bilayers. The fluid to gel phase transition of MSM occurring on cooling induced a tight packing of the acyl chains and the accumulation of tension resulted in the formation of defects within the finite area of the bilayer [30]. These

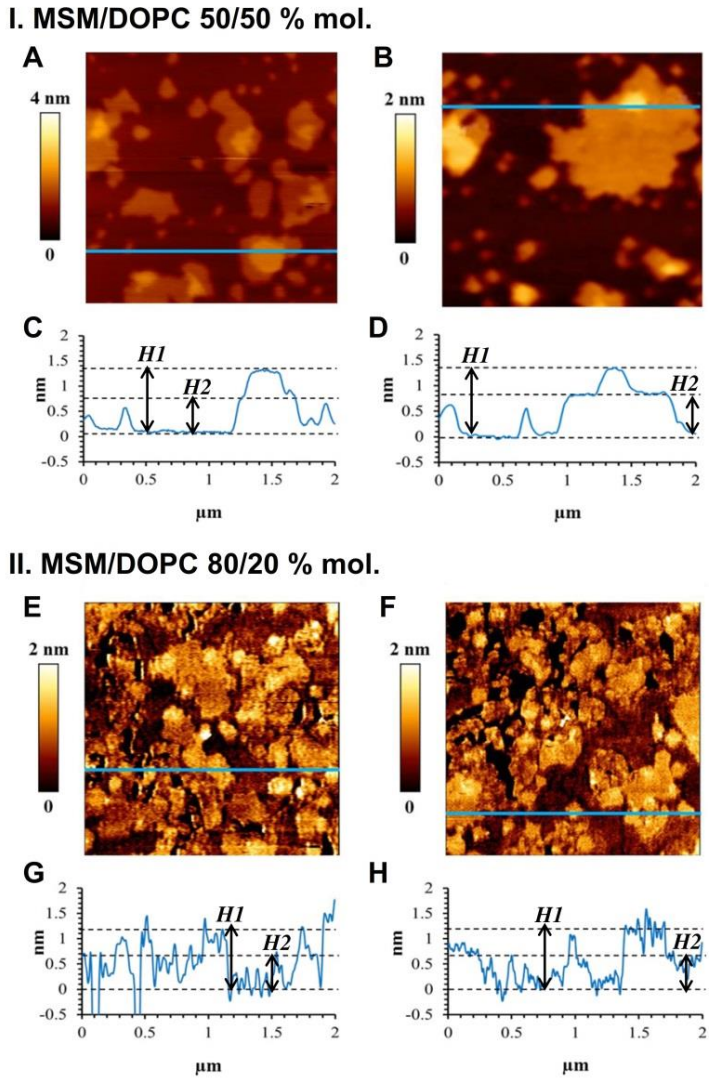


Fig. 2. Evidence of heterogeneous topography on the surface of supported bilayers of binary mixtures of milk sphingomyelin (MSM) and dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), revealing the presence of phase separation within the gel phase. Samples were imaged at 18 °C in PIPES-NaCl-5 mM $CaCl_2$ buffer; (I) MSM/DOPC 50/50% mol., (II) MSM/DOPC 80/20% mol. For each (I) and (II) panel, top row shows examples of 2×2 μm^2 height images obtained on different samples of MSM/DOPC 50/50% mol. (A, B) or of MSM/DOPC 80/20% mol (E, F); bottom row (C, D and G, H) shows cross-sections of the height images A, B and E, F, respectively, where indicated by the blue line.

holes allowed the determination of the thickness of the lower DOPC enriched phase, ~5.5 nm. The height step difference between the two height levels of the MSM-rich domains was $\Delta H = H1 - H2$ ~ 0.5 nm for both compositions of the MSM/DOPC bilayers. Therefore, three phases coexisted in the MSM/DOPC bilayers: the lower and continuous DOPC-rich l_d phase (thickness ~ 5.5 nm) and two upper gel phases segregated into the MSM-rich domains, with thicknesses of 6.2–6.3 nm and 6.7–6.8 nm. In agreement with observations on pure MSM bilayers (see below), the lower DOPC-rich phase probably also contains MSM molecules, which may contribute to the increased thickness as compared with those of pure DOPC bilayers. One candidate may for instance be the unsaturated C24:1-SM, which is miscible in l_d phase DOPC bilayers [31] or C20:1-SM. Meanwhile, the presence of two height levels within the MSM-rich domains may be accounted for by either (i) the coexistence of asymmetric l_d/gel phase DOPC/MSM and symmetric gel/gel phase MSM/MSM bilayers, (ii) the coexistence of distinct gel phases composed of either SM molecules with C16:0 or C22:0-C24:0 acyl chain lengths and/or (iii) the coexistence of distinct gel phases composed of interdigitated C22:0 to C24:0-SM molecules with either the two d18:1 sphingosine chains facing, or the d18:1 sphingosine facing the C22:0 to C24:0 acyl chain [17,32]. Other than with simulation [33], experimental reports show that asymmetry is unlikely in supported lipid bilayers in equilibrium, although examples existed [34]. Asymmetry has mostly been reported for bilayers where the two leaflets were intentionally un-coupled using the Langmuir-Schaeffer technique [35,36] or unique temperature cycles [37]. Whereas, vesicle fusion performed at 70 °C, i.e. above the Tm of the lipids, should promote inter-leaflet registry and symmetry [30]. To assess this, one strategy is to compare bilayers of the MFGM extract or of MSM/DOPC with other model bilayers excluding the unsaturated phospholipid components. At any rate, the fact that two gel phases were seen in domains found in MSM/DOPC model bilayers ruled out the presence of ceramide as the main cause for the presence of two gel phases in domains found in bilayers of MFGM polar lipid extract.

3.3. Topography of pure milk SM bilayers

In order to avoid structural perturbations by other components than the MSM molecular species which could lead to e.g. leaflet asymmetry, pure hydrated MSM supported bilayers were formed and analyzed with tapping mode AFM imaging at 18 °C. This experimental temperature is below the phase transition temperature of MSM, i.e. Tm = 32.9–34.3 °C [10,11]. Then, MSM bilayers are in the gel phase at 18 °C as previously determined by X-ray diffraction experiments [11].

Membrane defects (i.e. holes in the supported lipid bilayers) could be visible in the AFM height images, probably resulting from the relief of tension built inside the membrane as the MSM bilayer tightly packed into gel phase upon cooling [30] or from uncomplete covering of the mica surface upon fusion of the vesicles [38]. These defects in the MSM supported bilayers permitted the determination of the overall hydrated bilayer thickness, of 5.9 ± 0.2 nm (Fig. 3A). The MSM bilayers exhibited corrugated surfaces, although variability existed possibly as a result of slower arrangement of molecules all in the gel phase. On the surface of the most corrugated MSM bilayers, closer investigations showed that protrusions or heterogeneities were visible, in the form of small clusters (~30 to 100 nm in diameter – Fig. 3B). From height sections drawn across such AFM images, it was possible to measure the height step H between the lower phase of the bilayers and the top of the protruding features. Over a sample of N = 30 height measurements, it was found that two height steps $H1_{MSM}$ and $H2_{MSM}$ coexisted, with values of $H1_{MSM}$ = 1.6 and $H2_{MSM}$ = 0.8 nm (Table 1; standard deviation ± 0.2 nm). Noteworthy, the values did not exceed 2 nm, which excluded the occurrence of adsorbed vesicles (expected H ~ 15 nm [38]).

These results obtained with high resolution tapping mode AFM showed that bilayers of MSM are not flat, which indicates that MSM alone is not homogeneously packed when organized in hydrated bilayers. An important and interesting result here is that heterogeneous thicknesses can be obtained in pure MSM bilayers. Possibly, the lowest phase found in pure MSM bilayer could be a disorganized phase due to the presence of unsaturated species such as C24:1-SM [31], which represent 3–5% wt of the acyl chains [9]. Meanwhile, the presence of two height steps $H1_{MSM}$ and $H2_{MSM}$ suggested that MSM in the gel phase could form two types of lateral organizations. These could be the result of the local segregation of long (C24:0-SM) *vs* shorter (C16:0-SM) MSM molecular species, and/or the result of interdigitation due to the mismatch between the sphingosine base and the long C22–C24 acyl chains. In the literature, the X-ray diffraction pattern recorded for MSM at small angles corresponded to the formation a single lamellar gel phase, with thickness values of 6.3–7.3 nm depending on studies [11,16,39]. In the absence of periodic organization, it is unlikely that small-angle X-ray diffraction can discriminate several thicknesses in

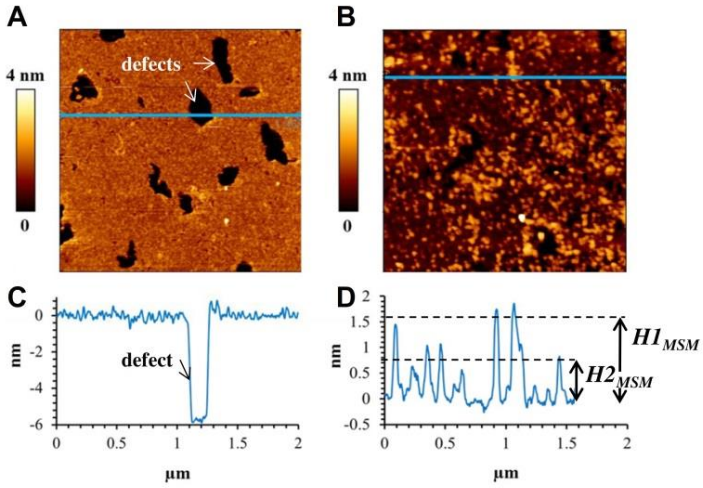


Fig. 3. Evidence of heterogeneous topography on the surface of supported bilayers of pure milk sphingomyelin (MSM) imaged by atomic force microscopy (AFM) in PIPES-NaCl-5 mM $CaCl_2$ buffer at 18 °C. Top row (A, B): examples of 2 × 2 μm^2 height images obtained on different samples; bottom row (C, D): cross-section height profiles C and D of the blue lines in height images A and B, respectively. Mind the different scales on the Y axis in cross-sections.

the gel phase lamellar structure, other than through noise or widening of the signal.

3.4. Bilayers of synthetic C16:0-SM, C24:0-SM and their equimolar mixtures

In order to eliminate the possible influence of the unsaturated C24:1-SM molecules present in low amount in MSM, synthetic C16:0-SM, C24:0-SM or their equimolar mixtures were used to prepare model bilayers. The gel/l_d phase transition temperature of C16:0-SM is Tm = 40 °C while C24:0-SM exhibits a gel/l_d phase transition temperature of Tm = 44 °C and a lower gel/gel phase transition at 35.5 °C between two interdigitated organizations [40]. Therefore, the bilayers are expected to be fully in the gel phase when observed by AFM imaging at 20 °C. Patches of bilayers of pure C16:0-SM and C24:0-SM were deposited onto mica and imaged using AFM. For pure synthetic SM molecule, patches of bilayers were preferred to continuous bilayers in order to also appreciate the respective heights (or thicknesses) of C16:0-SM and C24:0-SM bilayers in the gel phase. Sections drawn across the images allowed measuring these values for both types of bilayers (Fig. 4A, B).

The results showed that bilayers of C16:0-SM had an average thickness value of 6.4 ± 0.4 nm, while the maximum thickness of C24:0-SM reached 7.5 ± 0.3 nm (N = 29; Fig. 4C, D). Accordingly, Maulik & Shipley [41] reported a bilayer periodicity of 70.1 Å for C24:0-SM in the gel phase at 22 °C. Since both C16:0-SM and C24:0-SM molecules had the same polar head and were immersed in the same buffer, possible differences in the thickness of the solvent layer between the bilayer and the mica surface could be ruled out. Hence, this comparison revealed that *H1* and *H2* in the MSM-rich domains of bilayers of the MFGM polar lipid extract or of MSM/DOPC may be explained, at least partially, by the lateral segregation of long (C24:0) *vs* short (C16:0) acyl-chain SM species. Here, $\Delta H = H_{C24:0\text{-}SM} - H_{C16:0\text{-}SM} \sim 1.1$ nm, which is somewhat higher as compared with some of the $\Delta H = H2 - H1$ values found in the above mixtures (Table 1). Furthermore, a lower ΔH value of 0.7 nm was recorded in continuous bilayers of equimolar mixtures of C24:0-SM and C16:0-SM molecules (see below Fig. 5).

Noteworthy, in the presented conditions, two height levels were visible within the bilayer patches of C24:0-SM, with the lower level reaching an average thickness of 5.6 ± 0.7 nm (N = 10; Fig. 4D). This indicated the coexistence of the two gel phases of the C24:0-SM.

To the authors' knowledge, only one work has been previously reported on pure C18:0–SM bilayers by using AFM [42]. This study also evidenced heterogeneous topology of the bilayers' surfaces, showing two distinct levels at 39 °C that were interpreted as non-interdigitated and interdigitated molecules, with the height difference between the two gel phases being ~2 nm.

Fig. 5 shows examples of height images and corresponding cross-sections obtained on imaging continuous bilayers of equimolar mixtures of C16:0-SM and C24:0-SM. The objective of this set of experiments was to investigate how saturated SM with different acyl chain lengths can accommodate in hydrated bilayers in order to better understand the organization of MSM in the gel phase.

Again, the results showed that two height levels could be observed, which differed by $\Delta H = 0.7 \pm 0.2$ nm (N = 54). These two levels and ΔH value were in agreement with the two height levels characterized in the domains in MSM-containing samples (Table 1). They are then attributed to the formation of distinct gel phases with different thicknesses. The presence of defects in the bilayers allowed the measurement of the thicknesses of these two phases in the C16:0-SM/C24:0-SM 50/50 mol. bilayers, which were found to be 5.7 ± 0.5 nm and 6.3 ± 0.2 nm (N = 16 — noted *H2* and *H1* in Table 1).

3.5. Different heights corresponding to the gel-gel phase separation with interdigitation of MSM molecular species

Noteworthy, the preparation of hydrated bilayers with MSM proved somewhat technically challenging, yielding a sensible variety in the resulting morphologies of the bilayers, as exemplified in the presented images. The high proportion of saturated polar lipids in the gel phase at 18 °C favored defects in the bilayers, as discussed (Fig. 3). Also, the C24:0-SM, the MSM and MFGM polar lipid extract all exhibited a complex thermal behavior upon phase transition [11,43]. Therefore they may assume complex rearrangements in the packing of the polar lipids, yielding to a range of different final morphologies (Bhojoo et al. personal communication). Nevertheless, the occurrence of two height levels within the gel-phase domains was observed in all types of MSM-containing bilayers.

Notably for the first time, heterogeneous thickness with two height levels is reported in gel-phase domains of bilayers of MFGM polar lipid extract. They were interpreted as two laterally separated gel phases characterized by different thicknesses and composed essentially of MSM molecules. Since the hydrocarbon chains of polar lipids are extended and tightly packed in the gel phase with van der Waals interactions between the chains, differences in the thickness in the bilayer

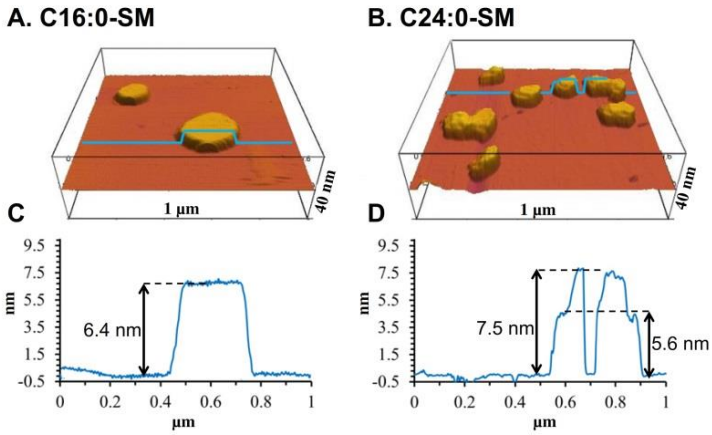


Fig. 4. Measurement of the bilayer thickness using atomic force microscopy imaging on bilayer patches of pure C16:0 sphingomyelin (C16:0-SM — A, C) or C24:0 sphingomyelin (C24:0-SM — B, D). Samples were imaged at 20 °C in PIPES-NaCl-10 mM $CaCl_2$ buffer. Top row (A, B) shows 3D reconstruction of 1 × 1 μm^2 height images; bottom row (C, D) shows cross-sections of the height images A, B, respectively, where indicated by the blue line.

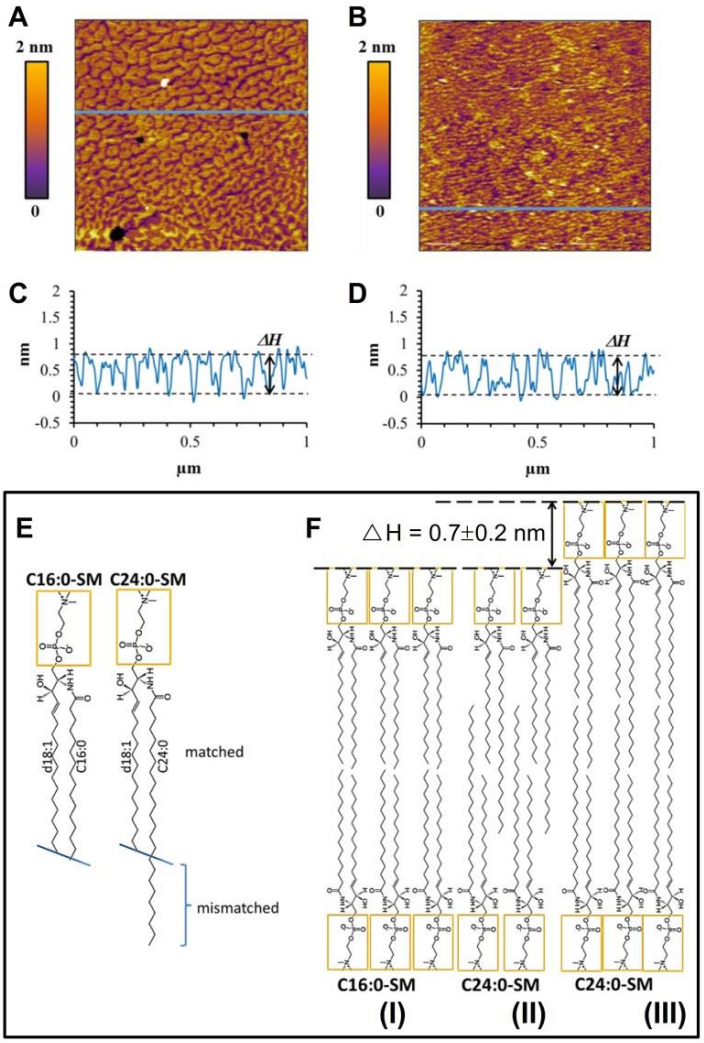


Fig. 5. Top panel: evidence of heterogeneous topography on the surface of supported bilayers of a 50/50 mol. equimolar mixture of synthetic C16:0 and C24:0 sphingomyelins (C16:0-SM and C24:0-SM, respectively) imaged by atomic force microscopy (AFM) in PIPES-NaCl-10 mM $CaCl_2$ buffer at 20 °C. Top row (A, B): examples of 1 × 1 μm^2 height images obtained on different samples; bottom row (C, D): cross-section height profiles C and D of the blue lines in height images A and B, respectively. Bottom panel: proposed organization of bilayers of equimolar mixtures of C16:0-SM and C24:0-SM. (E) respective structures of C16:0-SM and C24:0-SM evidencing the length mismatch between the d18:1 sphingosine chain and the C24:0 acyl chain in C24:0-SM. (F) Possible co-existence of three gel phases in the bilayers: (I) C16:0-SM non interdigitated gel phase; (II) C24:0-SM fully interdigitated gel phase and (III) C24:0-SM mixed interdigitated gel phase.

could be related to different N-acyl chain length and/or to interdigitation of MSM molecules in the opposite leaflets. In the absence of direct spectroscopic observation coupled with AFM imaging, such interpretation is to be inferred from quantitative reports on pure sphingomyelin bilayers, available in the literature.

With respect to acyl chain length, the two distinct gel phases could be induced by the various molecular species of saturated high-Tm polar lipids found in the MFGM polar lipid extract, or in the MSM fraction of the MSM/DOPC binary system. It is possible that high-Tm polar lipids with 16 carbon atoms such as DPPC and C16:0-SM segregate (yielding the upper phase 2 in Fig. 1) from the molecular species of MSM with higher acyl chain lengths, i.e. C22:0 to C24:0-SM (upper height level 1 in Fig. 1).

Using X-ray diffraction, Maulik et al. [44] reported an increase in bilayer thickness with increasing chain length from 3.65 nm for C16:0-SM to 4.75 nm for C24:0-SM, i.e. + 1.1 nm, with the possibility of partial interdigitation for C24:0-SM (at T = 50 °C i.e. above the melting temperature of all SM species). The calculated difference between the respective thicknesses of C16:0-SM and the interdigitated C24:0-SM bilayers is in agreement with the values of ΔH found using AFM imaging on bilayer patches (Fig. 4, Table 1). Lateral segregation of C16:0-SM from C24:0-SM is therefore a possible explanation to the coexistence

of two gel phases in MSM-containing bilayers. However, the relative area of the *H2* phase was small (Fig. 2) compared to the high proportion of C22–C24 acyl chains in the MSM (over 70% w/w [9]). Therefore, it is likely that gel-gel phase separation in the MSM-rich domains finds at least one extra cause.

Since X-ray diffraction experiments showed that the thickness of MSM bilayers was close to the value recorded for egg-SM (mainly composed of C16:0-SM) and therefore low as regards to the long acyl chains of MSM (e.g. C24:0-SM), Shaw et al. [16] hypothesized a significant chain interdigitation in MSM. As regards sphingomyelin molecules in MSM, the mismatch between the length of the d18:1 sphingosine base and that of the C22:0, C23:0 or C24:0 acyl chain makes it unlikely that MSM could arrange in coupled leaflets without interdigitation [17,45,46]. Interdigitation has been reported to be more pronounced for C22:0-SM to C24:0-SM, and to be absent for C16:0-SM that has similar lengths on the sphingosine and the acyl chains [44]. It has been more studied for C24:0-SM [17,47]. Spectroscopic studies of synthetic C24:0-SM provided evidence for the presence of two gel state bilayer structures below the chain melting temperature [17]. In partially interdigitated bilayers, the shorter d18:1 sphingosine chain from one leaflet of the bilayer will pack end to end with the longer acyl chain (e.g. C24:0) of another SM molecule located in the opposite leaflet, inducing acyl chain overlap from opposite leaflets [44]. The last 2 to 6 carbon atoms in the C24:0 acyl chain of MSM are the ones that span into the opposite membrane leaflet [44,46]. In that configuration, the calculated bilayer's thickness is about 45 Å. In the mixed interdigitated bilayers, the shorter sphingosine chains of the facing leaflets of the bilayer arrange end to end, while the long C24:0 acyl chains essentially span across the bilayer. In that configuration, the calculated bilayer's thickness is ~32 Å, i.e. the height mismatch between the two interdigitated organizations is ~1.3 nm. Noteworthy, the mixed interdigitated C24:0 has a similar theoretical thickness to that of C16:0 bilayers (~38 vs 32 Å), which indicates that they could co-exist within the lower gel phase of MSM domains. Recent studies performed by molecular dynamics simulations in complex mixtures of polar lipids showed interdigitation and leaflet coupling to be exceptionally strong in presence of C24:0-SM molecules [15,40,46]. Interdigitation has been also regarded as indicative of relative disorder in the bilayer [48,49]. In that sense,

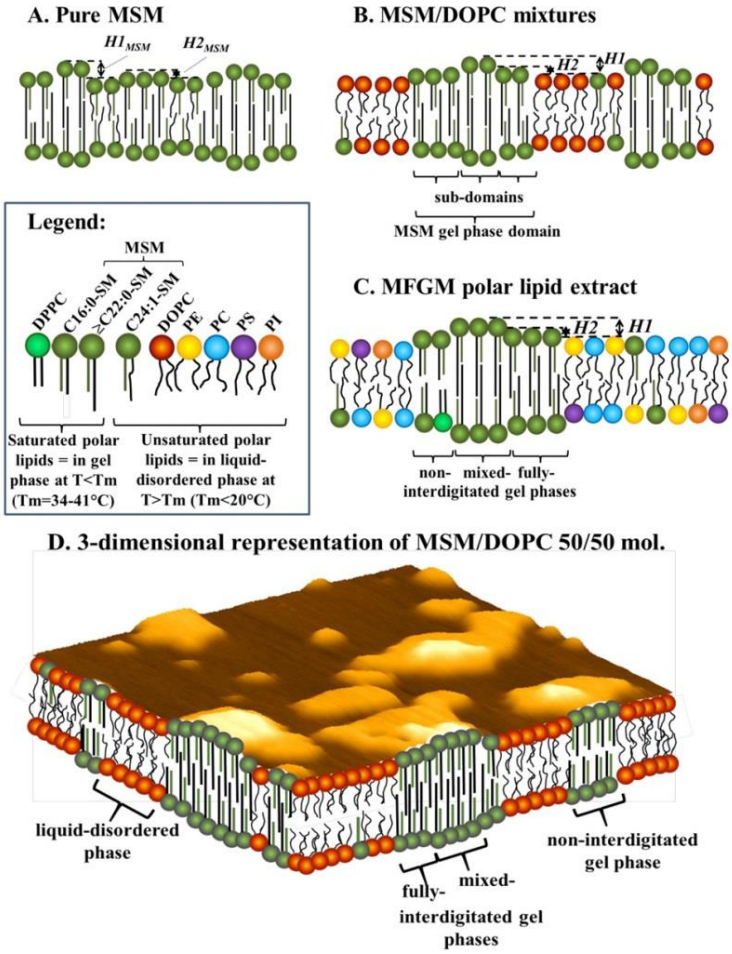


Fig. 6. Representation of the packing of polar lipids in hydrated bilayers of (A) pure MSM, (B) MSM/DOPC mixtures and (C) MFGM polar lipid extract. MSM = milk sphingomyelin, DOPC = dioleoylphosphatidylcholine, MFGM = milk fat globule membrane, DPPC = dipalmitoylphosphatidylcholine, PE = phosphatidylethanolamine, PC = phosphatidylcholine, PS = phosphatidylserine, PI = phosphatidylinositol. Figure D is a 3-dimensional representation of a bilayer of MSM/DOPC equimolar mixture (image A in Fig. 2), where the different phases are exemplified.

interdigitation in MSM-rich domain may account for the lower melting temperature of MSM (34.3 °C — [11]) as compared with those of the single-chain C16:0, C22:0 or C24:0-SM (from 40 to 46 °C — [40,42,50,51]). Finally, as mentioned for the pure MSM bilayers, the possible role of the C24:1-SM in complex MSM/DOPC bilayers is not to be ruled out. While it may explain the presence of a third phase (the continuous phase in Fig. 3, i.e. low/fluid?) in pure MSM system, it may also increase the propensity of long SM molecules to interdigitation [15].

In light of the presented results, Fig. 6 shows a tentative model of the proposed organization of MSM in pure bilayers (Fig. 6A), in MSM/DOPC bilayers (Fig. 6B) or in bilayers of the MFGM polar lipid extract (Fig. 6C). Taking the example of MSM/DOPC 50/50 mol. bilayer, Fig. 6D shows how short and long acyl-chain SM molecules can arrange into distinct gel phases and yield different height levels in AFM imaging.

This height mismatch at the domain — continuous phase interface and within the gel phase domains has an unfavourable energetic effect owing to the exposure of the hydrophobic tails of MSM to an aqueous environment. This heterogeneous packing of the MSM molecules may have important implications in regulating various mechanisms in the MFGM, such as the adsorption of bacteria, toxins, proteins or enzymes on the gel phase domains or at their periphery, e.g. in the case of sphingomyelinase or digestive lipases, or the confinement of transmembrane proteins [52]. Furthermore, it may also alter the physical stability of the membrane. Finally, implications may extend to the biological functions of domains as present in plasma membranes involving SM species with complex acyl chain composition, such as brain SM [15,18]. Further research is needed to investigate the possible occurrence and implications of multiple packings of SM and other saturated polar lipids in domains of biological membranes, where cholesterol fluidifies the gel phase(s) into liquid-ordered phase [1].

4. Conclusion

In conclusion, AFM measurements confirmed the phase separation of high-Tm polar lipids, mainly MSM, to form gel phase domains surrounded by a continuous matrix of fluid phase, in systems with increasing complexity (MSM/DOPC and MFGM polar lipid extract). Through comparison with bilayers of synthetic sphingomyelin molecules, the presented results further demonstrated that two gel phases with different thickness can coexist in the MSM-rich domains of membranes made of dairy polar lipids (Fig. 6C). As a consequence, the MSM-rich domains in the gel phase do not have a planar surface, as a result of either the separation of shorter C16:0-SM molecules from longer C22:0-C24:0-SM into separate gel phases, or the formation of distinct interdigitated C22:0-C24:0-SM gel phases, or both.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

The authors gratefully thank INRA CEPIA for funding this research through the grant "ANS Sphingolait". The doctoral fellowship of author Et-Thakafy was funded by INRA CEPIA and Région Bretagne under the grant ARED 8806. The Asylum Research MFP3D-BIO atomic force microscope was funded by the European Union (FEDER), the French Ministry of Education and Research, INRA, Conseil Général 35 and Rennes Métropole.

References

[1] K. Simons, W.L.C. Vaz, Model systems, lipid rafts, and cell membranes, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33 (2004) 269–295.
[2] S.R. Shaikh, A.C. Dumaual, L.J. Jenski, W. Stillwell, Lipid phase separation in phospholipid bilayers and monolayers modeling the plasma membrane, Biochim. Biophys. Acta 1512 (2001) 317–328.
[3] A.E. Garner, D.A. Smith, N.M. Hooper, Sphingomyelin chain length influences the distribution of GPI-anchored proteins in rafts in supported lipid bilayers, Mol. Membr. Biol. 24 (2007) 233–242.
[4] J.M. Evers, R.G. Haverkamp, S.E. Holroyd, G.B. Jameson, D.D.S. Mackenzie, O.J. McCarthy, Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques, Int. Dairy J. 18 (2008) 1081–1089.
[5] S. Gallier, D. Gragson, R. Jiménez-Flores, D.W. Everett, Surface characterization of bovine milk phospholipid monolayers by Langmuir isotherms and microscopic techniques, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 12275–12285.
[6] C. Lopez, M.-N. Madec, R. Jiménez-Flores, Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins, Food Chem. 120 (2010) 22–33.
[7] C. Lopez, Milk fat globules enveloped by their biological membrane: unique colloidal assemblies with a specific composition and structure, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 16 (2011) 391–404.
[8] K. Dewettinck, R. Rombaut, N. Thienpont, T. Trung Le, K. Messens, J. van Camp, Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material, Int. Dairy J. 18 (2008) 436–457.
[9] F. Sanchez-Juanes, J.M. Alonso, L. Zancada, P. Hueso, Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes, Int. Dairy J. 19 (2009) 273–278.
[10] A. Filippov, G. Ôradd, G. Lindblom, Sphingomyelin structure influences the lateral diffusion and raft formation in lipid bilayers, Biophys. J. 90 (2006) 2086–2092.
[11] A.V.R. Murthy, F. Guyomarc'h, G. Paboeuf, V. Vié, C. Lopez, Cholesterol strongly affects the organization of lipid layers studied as models of the milk fat globule membrane: condensing effect and change in the lipid domain morphology, Biochim. Biophys. Acta 1848 (2015) 2308–2316.
[12] B. Ramstedt, P. Leppimaki, M. Axberg, J.P. Slotte, Analysis of natural and synthetic sphingolipids using high-performance thin-layer chromatography, Eur. J. Biochem. 266 (1999) 997–1002.
[13] N. Dan, Lipid tail chain asymmetry and the strength of membrane-induced interactions between membrane proteins, Biochim. Biophys. Acta 1768 (2007) 2393–2399.
[14] X.-M. Li, J.M. Smaby, M.M. Momsen, H.L. Brockman, R.E. Brown, Sphingomyelin interfacial behavior: the impact of changing acyl chain composition, Biophys. J. 78 (2000) 1921–1931.
[15] P.S. Niemelä, M.T. Hyvönen, I. Vattulainen, Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers, Biophys. J. 90 (2006) 851–863.
[16] K.P. Shaw, N.J. Brooks, J.A. Clarke, O. Ces, J.M. Seddon, R.V. Law, Pressure–temperature phase behaviour of natural sphingomyelin extracts, Soft Matter 8 (2012) 1070–1078.
[17] I.W. Levin, T.E. Thompson, Y. Barenholz, C. Huang, Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers, Biochemistry 24 (1985) 6282–6286.
[18] J.P. Slotte, Biological functions of sphingomyelins, Prog. Lipid Res. 52 (2013) 424–437.
[19] I. Czolkos, A. Jesorka, O. Orwar, Molecular phospholipid films on solid supports, Soft Matter 7 (2011) 4562–4576.
[20] M.-C. Giocondi, D. Yamamoto, E. Lesniewska, P.-E. Milhiet, T. Ando, C. Le Grimellec, Surface topography of membrane domains, Biochim. Biophys. Acta 1798 (2010) 703–718.
[21] M.-P. Mingeot-Leclercq, M. Deleu, R. Brasseur, Y.F. Dufrêne, Atomic force microscopy of supported lipid bilayers, Nat. Protoc. 10 (2008) 1654–1659.
[22] R.M.A. Sullan, J.K. Li, S. Zou, Direct correlation of structures and nanomechanical properties of multicomponent lipid bilayers, Langmuir 25 (2009) 7471–7477.
[23] F. Guyomarc'h, S. Zou, M. Chen, P.-E. Milhiet, C. Godefroy, V. Vié, C. Lopez, Milk sphingomyelin domains in biomimetic membranes and the role of cholesterol: morphology and nanomechanical properties investigated using AFM and force spectroscopy, Langmuir 30 (2014) 6516–6524.
[24] A.V.R. Murthy, F. Guyomarc'h, C. Lopez, Cholesterol decreases the size and the mechanical resistance to rupture of sphingomyelin rich domains, in lipid bilayers studied as model of the milk fat globule membrane, Langmuir 32 (2016) 6757–6765.
[25] A.V.R. Murthy, F. Guyomarc'h, C. Lopez, The temperature-dependent physical state of polar lipids and their miscibility impact the topography and mechanical properties of bilayer models of the milk fat globule membrane, Biochim. Biophys. Acta 1858 (2016) 2181–2190.
[26] C. Lopez, V. Briard-Bion, O. Ménard, Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milk produced by cows fed fresh pasture based diet during spring, Food Res. Int. 58 (2014) 59–68.
[27] H.A. Rinia, M.M.E. Snelb, J.P.J.M. van der Eerdenb, B. de Kruijff, Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy, FEBS Lett. 501 (2001) 92–96.
[28] P.-E. Milhiet, M.-C. Giocondi, C. Le Grimellec, Cholesterol is not crucial for the existence of microdomains in kidney brush-border membrane models, J. Biol. Chem. 277 (2002) 875–878.
[29] R.F.M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, Biophys. J. 85 (2003) 2406–2416.
[30] A. Alessandrini, P. Facci, Phase transition in supported lipid bilayers studied by AFM, Soft Matter 10 (2014) 7145–7164.
[31] S. Maté, J.V. Busto, A.B. García-Arribas, J. Sot, R. Vazquez, V. Herlax, C. Wolf, L. Bakás, F.M. Goñi, N-Nervonoylsphingomyelin (C24:1) prevents lateral heterogeneity in cholesterol-containing membranes, Biophys. J. 106 (2014) 2606–2616.

[32] S.W. Hui, J.T. Mason, C.-H. Huang, Acyl chain interdigitation in saturated mixed-chain phosphatidylcholine bilayer dispersions, Biochemistry 23 (1984) 5570–5577.
[33] J.D. Perlmutter, J.N. Sachs, Interleaflet interaction and asymmetry in phase separated lipid bilayers: molecular dynamics simulation, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 6563–6577.
[34] P.F. Devaux, R. Morris, Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes, Traffic 5 (2004) 241–246.
[35] C.W. Hollars, R.C. Dunn, Submicron structure in L-α-dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy, Biophys. J. 75 (1998) 342–353.
[36] J. Yuan, C. Hao, M. Chen, P. Berini, S. Zou, Lipid reassembly in asymmetric Langmuir-Blodgett/Langmuir-Schaeffer bilayers, Langmuir 29 (2013) 221–227.
[37] W.-C. Lin, C.D. Blanchette, T.V. Ratto, M.L. Longo, Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study, Biophys. J. 90 (2006) 228–237.
[38] S.J. Attwood, Y. Choi, Z.V. Leonenko, Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microsopy and atomic force spectroscopy, Int. J. Mol. Sci. 14 (2013) 3514–3539.
[39] M. Malmsten, B. Bergenståhl, L. Nyberg, G. Odham, Sphingomyelin from milk - characterization of liquid crystalline, liposome and emulsion properties, J. Am. Oil Chem. Soc. 71 (1994) 1021–1026.
[40] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the sphingolipids, Biochim. Biophys. Acta 1255 (1995) 213–236.
[41] P.R. Maulik, G.G. Shipley, X-ray diffraction and calorimetric study of N-lignoceryl sphingomyelin membranes, Biophys. J. 69 (1995) 1909–1916.
[42] N. Jiménez-Rojo, A.B. García-Arribas, J. Sot, A. Alonso, F.M. Goñi, Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl chain lengths: a glimpse into sphingomyelin complexity, Biochim. Biophys. Acta 1838 (2014) 456–464.
[43] L.K. Bar, Y. Barenholz, T.E. Thompson, Effect of sphingomyelin composition on the phase structure of phosphatidylcholine-sphingomyelin bilayers, Biochemistry 36 (1997) 2507–2516.
[44] P.R. Maulik, D. Atkinson, G.G. Shipley, X-ray scattering of vesicles of N-acyl sphingomyelins — determination of bilayer thickness, Biophys. J. 50 (1986) 1071–1077.
[45] M. Kodama, Y. Kawasaki, H. Ohtaka, The main transition enthalpy of the gel-to-liquid crystal phases for a series of asymmetric chain length D-erythro (2S, 3R) sphingomyelins, Thermochim. Acta 532 (2012) 22–27.
[46] T. Róg, A. Orlowski, A. Llorente, T. Skotland, T. Sylvänne, D. Kauhanen, K. Ekroos, K. Sandvig, I. Vattulainen, Interdigitation of long-chain sphingomyelin induces coupling of membrane leaflets in a cholesterol dependent manner, Biochim. Biophys. Acta 1858 (2016) 281–288.
[47] H. Takahashi, T. Hayakawa, Y. Kawasaki, K. Ito, T. Fujisawa, M. Kodamac, T. Kobayashi, Structural characterization of N-lignoceroyl (C24:0) sphingomyelin bilayer membranes: a re-evaluation, J. Appl. Crystallogr. 40 (2007) s312–s317.
[48] E.I. Goksu, J.M. Vanegas, C.D. Blanchette, W.-C. Lin, M.L. Longo, AFM for structure and dynamics of biomembranes, Biochim. Biophys. Acta 1788 (2009) 254–266.
[49] Z.V. Leonenko, E. Finot, D.T. Cramb, AFM study of interaction forces in supported planar DPPC bilayers in the presence of general aesthetic halothane, Biochim. Biophys. Acta 1758 (2006) 487–492.
[50] T.J. McIntosh, S.A. Simon, D. Needham, C.-H. Huang, Structure and cohesive properties of sphingomyelin/cholesterol bilayers, Biochemistry 31 (1992) 2012–2020.
[51] H. Ohtaka, Y. Kawasaki, M. Kodama, Phase transition of highly asymmetric chain-length N-lignocerylsphingomyelin (C24:0-SM) bilayer, J. Therm. Anal. Calorim. 113 (2013) 1593–1602.
[52] A. Alessandrini, P. Facci, Unraveling lipid/protein interaction in model lipid bilayers by atomic force microscopy, J. Mol. Recognit. 24 (2010) 387–396.

Titre : Hétérogénéité des membranes lipidiques et propriétés mécaniques : des bicouches modèles aux membranes des globules gras du lait

Résumé: Les globules gras du lait sont entourés d'une membrane biologique extrêmement complexe en composition et en structure, appelée MFGM (milk fat globule membrane). L'investigation de cette membrane, in situ dans le lait, par microscopie confocale nous suggère que les lipides polaires à haute température de transition de phase (Tm) forment des domaines en phase gel ou liquide ordonné, dispersés dans une phase continue fluide. Sur la base de cette observation, ce projet vise à comprendre en quoi la composition en lipides polaires laitiers et leur état de phase peuvent moduler les propriétés élastiques de la MFGM, en vue d'une meilleure maîtrise de la stabilité des globules gras en industrie laitière. L'hétérogénéité mécanique générée par la coexistence de différents types de phase a ainsi été caractérisée par spectroscopie de force AFM en utilisant des bicouches de lipides modèles de la membrane réelle, à basse (T<Tm) et haute températures (T>Tm). Pour analyser finement les déterminants de l'élasticité de la membrane, et tenir compte de la courbure, une étude approfondie des effets de l'état de phase et de la composition hétérogène en lipides polaires a été entreprise par spectroscopie de force atomique, en complément d'une analyse structurale par microscopie électronique ou diffraction des rayons X. Nous y avons montré, en particulier, que la présence de molécules de longueur de chaîne acyles et d'insaturation variables rend les membranes de sphingomyéline de lait en phase gel moins rigides qu'attendu, bien que significativement plus rigide qu'une membrane fluide. Cette approche a finalement été appliquée à l'échelle du globule gras natif, où une hétérogénéité mécanique a bien été observée. Cependant, les valeurs d'élasticités s'accordaient difficilement avec celles obtenues sur les systèmes modèles, probablement en raison de la présence des protéines membranaires.

Mots clés : Membrane lipidique, hétérogénéité de structure, propriétés mécaniques, microscopie à force atomique

Title: Heterogeneity of biological membranes and mechanical properties: lipid bilayers model of the milk fat globules membranes

Abstract: The milk fat globules are enveloped by a biological membrane, called MFGM, of highly complex composition and structure. Investigation of this membrane, in situ in milk, using confocal microscopy suggested that polar lipids with high transition temperature (Tm) form domains in gel or liquid-ordered phase, dispersed in a continuous fluid phase. From this observation, the aim of this project was to understand how the composition and organization of dairy polar lipids can modulate the elastic properties of the MFGM, in order to better control stability of the fat globules in the dairy industry. The mechanical heterogeneity created by the coexistence of phases was then characterized by AFM force spectroscopy using lipid bilayers models at low (T<Tm) and high temperatures (T>Tm). In order to closely analyze the factors that direct membrane elasticity, force spectroscopy measurements were undertaken on curved liposome membranes, in combination with structural characterization by TEM and SAXS. We showed, in particular, that heterogeneity

in acyl chain length and unsaturation made gel-phase milk sphingomyelin membranes less rigid than expected, although more rigid than a fluid phase membrane. This approach was finally applied to native milk fat globules, where mechanical heterogeneity was visible. However, elasticity values were somewhat different from those calculated on model systems, probably because of the presence of membrane proteins.

Key word: Lipid membrane, heterogeneity of structure, mechanical proporties, Atomic force microscopy

RÉSUMÉ

Hétérogénéité des membranes lipidiques et propriétés mécaniques : des bicouches modèles aux membranes des globules gras du lait

Les globules gras du lait sont entourés d'une membrane biologique extrêmement complexe en composition et en structure, appelée MFGM (milk fat globule membrane). L'investigation de cette membrane, in situ dans le lait, par microscopie confocale nous suggère que les lipides polaires à haute température de transition de phase (Tm) forment des domaines en phase gel ou liquide ordonné, dispersés dans une phase continue fluide. Sur la base de cette observation, ce projet vise à comprendre en quoi la composition en lipides polaires laitiers et leur état de phase peuvent moduler les propriétés élastiques de la MFGM, en vue d'une meilleure maîtrise de la stabilité des globules gras en industrie laitière. L'hétérogénéité mécanique générée par la coexistence de différents types de phase a ainsi été caractérisée par spectroscopie de force AFM en utilisant des bicouches de lipides modèles de la membrane réelle, à basse (T<Tm) et haute températures (T>Tm). Pour analyser finement les déterminants de l'élasticité de la membrane, et tenir compte de la courbure, une étude approfondie des effets de l'état de phase et de la composition hétérogène en lipides polaires a été entreprise par spectroscopie de force atomique, en complément d'une analyse structurale par microscopie électronique ou diffraction des rayons X. Nous y avons montré, en particulier, que la présence de molécules de longueur de chaîne acyles et d'insaturation variables rend les membranes de sphingomyéline de lait en phase gel moins rigides qu'attendu, bien que significativement plus rigide qu'une membrane fluide. Cette approche a finalement été appliquée à l'échelle du globule gras natif, où une hétérogénéité mécanique a bien été observée. Cependant, les valeurs d'élasticités s'accordaient difficilement avec celles obtenues sur les systèmes modèles, probablement en raison de la présence des protéines membranaires.

Mots-clefs : membrane lipidique, hétérogénéité de structure, propriétés mécaniques, microscopie à force atomique

ABSTRACT

Heterogeneity of biological membranes and mechanical properties: lipid bilayers model of the milk fat globules membranes

The milk fat globules are enveloped by a biological membrane, called MFGM, of highly complex composition and structure. Investigation of this membrane, in situ in milk, using confocal microscopy suggested that polar lipids with high transition temperature (Tm) form domains in gel or liquid-ordered phase, dispersed in a continuous fluid phase. From this observation, the aim of this project was to understand how the composition and organization of dairy polar lipids can modulate the elastic properties of the MFGM, in order to better control stability of the fat globules in the dairy industry. The mechanical heterogeneity created by the coexistence of phases was then characterized by AFM force spectroscopy using lipid bilayers models at low (T<Tm) and high temperatures (T>Tm). In order to closely analyze the factors that direct membrane elasticity, force spectroscopy measurements were undertaken on curved liposome membranes, in combination with structural characterization by TEM and SAXS. We showed, in particular, that heterogeneity in acyl chain length and unsaturation made gel-phase milk sphingomyelin membranes less rigid than expected, although more rigid than a fluid phase membrane. This approach was finally applied to native milk fat globules, where mechanical heterogeneity was visible. However, elasticity values were somewhat different from those calculated on model systems, probably because of the presence of membrane proteins.

Keywords: *Lipid membrane, Heterogeneity of structure, Mechanical proporties, Atomic force microscopy*

AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr