



**HAL**  
open science

# Étude expérimentale et théorique de la stabilité et la rigidité des membranes lipidiques dans différents conditions

Jad Eid

► **To cite this version:**

Jad Eid. Étude expérimentale et théorique de la stabilité et la rigidité des membranes lipidiques dans différents conditions. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Lyon; Université Libanaise, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1338 . tel-03618463

**HAL Id: tel-03618463**

**<https://theses.hal.science/tel-03618463v1>**

Submitted on 24 Mar 2022

**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.



**Doctorat Université Libanaise**  
**THESE EN COTUTELLE**

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-**

**Santé et**

**L'Université Libanaise**

**Ecole Doctorale des Sciences et Technologie**

**Spécialité : Biophysique**

Présentée et soutenue publiquement par

**EID Jad**

**Le 18 Décembre 2020**

**Étude expérimentale et théorique de la stabilité et  
la rigidité des membranes lipidiques dans  
différents conditions**

**Membres du Jury**

<b>M. FUCHS Patrick</b> , Maitre de conférences, Université de Paris	Rapporteur
<b>Mme. MINGEOT-LECLERCQ Marie Paul</b> , Pr, Université de Louvain	Rapporteuse
<b>M. DI MEO Florent</b> , Chercheur Inserm, Université de Limoge	Examinateur
<b>M. GOUET Patrice</b> , Pr, Université Claude Bernard– Lyon1	Examinateur
<b>M. HABCHI Roland</b> , Pr, Université Libanaise	Examinateur
<b>Mme. JRAIJ Alia</b> , Pr, Université Libanaise	Directrice de thèse
<b>M. MONTICELLI Luca</b> , DR INSERM, Université Lyon1	Directeur de thèse
<b>Mme. CHARCOSSET Catherine</b> , DR CNRS, Université Lyon1	Invitée
<b>Mme. LOISON Claire</b> , Chercheuse CNRS, Université Lyon1	Invitée

# **Remerciements**

J'adresse ma vive gratitude à tout le corps administratif de l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie à l'Université Libanaise et de l'Ecole Doctorale interdisciplinaire Sciences et santé de Lyon pour faciliter les procédures d'inscription en thèse de doctorat en cotutelle.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements envers ma directrice de thèse, Professeur Alia Jraij, et mon directeur de thèse, Dr. Luca Monticelli, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant de diriger ce travail doctoral, pour leurs multiples conseils et pour toutes les heures qu'ils ont consacrées à diriger cette recherche. J'ai pu constamment bénéficier de leurs qualités scientifiques et humaines. Vous avez su me donner une grande liberté d'initiative tout en restant toujours présent pour discuter des difficultés que j'ai pu rencontrer.

J'adresse de chaleureux remerciements à Professeur Hélène Greige-Gerges pour son attention, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Son optimisme et sa confiance en moi ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec elle.

Je tiens à remercier Professeur Roland Habchi pour votre aide dans la réalisation des mesures par microscopie à force atomique, votre amitié et la disponibilité que vous m'avez toujours témoignées.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury de s'être intéressés à mes travaux de thèse.

Je désire en outre remercier tous les membres de l'équipe de Molécules Bioactives au Liban, et de l'équipe MOBI à Lyon pour leurs conseils et leur amitié. Je remercie particulièrement Tracy et Hafez, mes deux collaborateurs, pour leurs aides à la réalisation des travaux.

Je remercie l'Université Libanaise, l'Association de Coopération, Développement et Santé et l'Agence Universitaire de la Francophonie (Programme Bourse Safar) pour le soutien financier qu'elles m'ont accordée durant mon séjour en France.

Rien de très inattendu si je remercie mes amis et mes compagnons de café qui sont Carla, Joyce, Elissa, Ghenwa, Sanaa, Tracy, Vincent, Hafez, Juliette, Guillaume, Cécile, Zobia, et Nuria. Grâce à eux, la vie quotidienne dans le laboratoire fut bercée de discussions et d'actes aussi scientifiques qu'imbéciles...

Je tiens aussi à remercier tous mes amis : Albert, Mahmoud, Eddy, Carla, Louna, Carine, Noëlle, Michel, Léa, Joy, Noura, Nicole, Rasha, Christelle, Elissa, Saad, Ralph, Emilia et Roy. Je tiens à vous faire part de la gratitude pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant ces années de thèse, chacun(e) à sa façon. Ensemble on a créé des souvenirs inoubliables. Merci pour votre présence amicale, votre gentillesse et votre soutien. Je vous aime trop.

Enfin, aucune formule ne serait assez forte pour remercier ma famille, mon père Joseph, ma mère Sarah, mon frère Kamal, pour leur immense soutien moral tout au long de ces années. Malgré mon éloignement depuis de nombreuses années, leur confiance, leur tendresse et leur amour me portent et me guident tous les Jours. Sans vous je ne serais pas arrivé jusque-là.



# Table des matières

_Toc62047046Résumé .....	8
<b>Abstract</b> .....	11
Introduction .....	13
Chapitre 1 : Liposomes, élasticité et solvants eutectiques profonds .....	22
1. Liposomes .....	22
1.1. Définition.....	22
1.2. Les phospholipides.....	24
1.3. Formation des vésicules.....	26
1.4. Préparation des liposomes .....	27
1.5. Applications des liposomes.....	28
2. Théorie élastique de la membrane .....	31
2.1. Extension / compression.....	33
2.2. La courbure .....	33
3. Modèles mathématiques pour la détermination de la rigidité basée sur la mécanique de contact 35	
3.1. Modèle de Hertz .....	35
3.2. Modèle de Coque ou « Shell Model ».....	39
4. Importance de la rigidité.....	41
4.1. Pourquoi on mesure la rigidité d'une membrane ? .....	41
4.2. L'impact de l'élasticité des nanoparticules dans l'administration des médicaments .....	42
5. Méthodes expérimentales pour mesurer l'élasticité des liposomes.....	47
5.1. Spectroscopie scintillante à l'échelle optique.....	47
5.2. Diffusion des rayons X.....	48
5.3. Aspiration par micropipette.....	49
5.4. Microscopie à force atomique .....	50
6. Méthodes de simulations pour calculer le module de rigidité des membranes lipidiques.....	51
6.1. Spectre d'ondulation thermique.....	51
6.2. Fluctuations des orientations lipidiques .....	52
6.3. Étirement d'un tube cylindrique .....	54
6.4. Déformation de la membrane : .....	55
7. Élasticité de la membrane dans les systèmes à composition lipidique complexe.....	57
8. Solvant Eutectiques profonds .....	60

8.1.	Définition.....	60
8.2.	Organisation des phospholipides dans un DES.....	64
9.	Références .....	65
Chapitre 2 : Méthodes .....		79
1.	Microscopie de force atomique (AFM en anglais).....	79
1.1.	Définition et avantage.....	79
1.2.	Éléments principaux du microscope AFM.....	80
1.3.	Modes d'utilisation de l'AFM.....	84
1.4.	Mode « contact » .....	85
1.5.	Les forces d'interaction en AFM .....	89
1.6.	Spectroscopie de force, courbes de force.....	91
2.	Dynamique Moléculaire.....	94
2.1.	Contexte.....	95
2.2.	Notions de base dans un calcul MD.....	95
2.3.	Energie potentielle du système et Champ de Force : .....	101
2.4.	Champ de force de MARTINI.....	106
2.5.	Module de compressibilité, fluctuations de la surface.....	109
2.6.	Méthode de la déformation de la membrane .....	109
3.	Matériels utilisés.....	112
4.	Références .....	113
<b>Deuxième Partie</b> .....		117
Chapitre 3 : Interprétation des écarts registrés dans le module d'élasticité des membranes lipidiques, mesuré par plusieurs méthodes et dans différentes conditions .....		118
Elastic moduli of lipid membranes: reproducibility of AFM measures.....		120
Abstract.....		120
1.	Introduction .....	121
2.	Materials and methods.....	123
2.1.	Preparation of liposomes.....	123
2.2.	AFM measurements.....	124
2.3.	AFM data analysis: extraction of the Young modulus and bending modulus .....	125
2.4.	Calculation of bending modulus $kc$ by molecular dynamics simulations .....	127
3.	Results and Discussion .....	129
3.1.	Imaging and size distribution of liposomes .....	129

3.2.	Bending rigidity of Egg PC liposomes: AFM measurements .....	130
3.3.	Comparing AFM measures with other techniques .....	136
3.4.	Bending modulus from buckling simulations.....	138
4.	Conclusions .....	139
5.	References .....	140
Chapitre 4 : Calcul du module de flexion des membranes lipidiques à partir des méthodes de simulation basées sur la Dynamique Moléculaire MD .....		145
On calculating the bending modulus of lipid bilayer membranes from buckling simulations .....		147
ABSTRACT.....		147
1.	Introduction .....	148
2.	Methods.....	151
2.1.	System setup.....	151
2.2.	Simulation parameters.....	155
2.3.	Analysis of the simulation and error calculation .....	156
3.	Results and discussion .....	158
3.1.	Bending modulus from buckling simulations: optimizing box size and strain.....	158
3.2.	Bending modulus of single-component lipid bilayers.....	161
3.3.	Bending modulus of lipid mixtures: the effect of cholesterol .....	165
3.4.	Bending Modulus in other lipid mixtures.....	169
3.5.	Relationship between bending modulus and area compressibility modulus.....	174
4.	Conclusions .....	176
5.	References .....	178
Chapitre 5: Effet de la quercétine sur l'élasticité du lipide E80, mesurée par AFM et calculée par la dynamique moléculaire MD.....		183
Quercetin effect on lipid membrane rigidity: assessment by atomic force microscopy and molecular dynamics simulations.....		185
Abstract.....		185
1.	Introduction .....	186
2.	Materials and methods.....	187
2.1.	Experimental materials .....	187
2.2.	Experimental setup: preparation of liposomes .....	187
2.3.	AFM measurements.....	188
2.4.	Molecular simulations.....	189
3.	Results and discussion .....	193

3.1.	AFM imaging and measurements .....	193
3.2.	MD simulations .....	195
4.	Conclusions .....	204
5.	References .....	205
Chapitre 6 : Comportement des liposomes et organisation des phospholipides E80 dans des solvants eutectiques profonds à base de chlorure de choline, par AFM..... 211		
First investigation of liposomes behavior and phospholipids organization in choline chloride-based deep eutectic solvents by atomic force microscopy..... 213		
	Abstract.....	213
1.	Introduction .....	214
2.	Materials and Methods.....	218
2.1.	Materials .....	218
2.2.	Preparation of DES and aqueous solutions of DES constituents .....	219
2.3.	Preparation of liposomes.....	219
2.4.	Atomic force microscopy imaging.....	219
2.5.	Exposure of adsorbed liposomes to DES and to aqueous solutions of DES components ....	220
2.6.	Incubation of preformed liposomes in DES and in aqueous solutions of DES components.	220
2.7.	Phospholipid organization in DES .....	220
3.	Results.....	221
3.1.	Effect of DES on adsorbed liposomes .....	221
3.2.	Time-dependent behavior of liposomes in DES media and in aqueous solutions of DES constituents .....	224
3.3.	Phospholipids organization in the eutectic systems.....	228
4.	Discussion.....	230
5.	Conclusions .....	233
	<b>Supporting materials</b> .....	237
Discussion générale et perspectives .....		
	Perspectives .....	249

# Résumé

Dans ce travail, nous avons mesuré la rigidité de liposomes blancs EggPC et de liposomes du même type encapsulant la quercétine. Ceci a été réalisé en mesurant le module d'Young à partir des courbes de forces en mode Force Spectroscopie de la Microscopie à Force Atomique AFM. En parallèle, nous avons calculé le module de courbure  $k_c$  des couches phospholipidiques qui imitent la formulation EggPC, tout en utilisant la Dynamique Moléculaire MD.

Notre étude a été lancée suite à un large intervalle de valeurs rapportées dans la littérature au module de courbure  $k_c$ , calculées par différentes méthodes ou conditions, pour la même composition lipidique. Des valeurs, allant de 2 jusqu'à 20 MPa, qui rendent l'auteur confus en se demandant quelle est la valeur précise d'une grandeur intrinsèque propre à la membrane, telle que son module d'Young i.e son module de courbure.

A cet effet, nous avons mesuré la rigidité (module d'Young) des liposomes Egg PC en utilisant quatre types de sondes AFM : deux pointes de forme pyramidale et deux pointes de forme conique, chaque pointe est montée sur un levier ayant une constante de force 0,08 ou 0,32 N/m. Le traitement des courbes de forces obtenues, a été réalisé en utilisant aussi deux modèles mathématiques ; celui de Hertz ou de Shell. Les résultats ont montré que la forme de la pointe AFM, la constante de force du levier ainsi que le modèle mathématique choisi affectent la valeur mesurée de la rigidité en AFM et que le choix du modèle théorique Shell ou Hertz produit le plus grand impact.

En Dynamique Moléculaire, nous avons utilisé la méthode de la déformation de la membrane, Buckling Method, qui impose une optimisation préliminaire réalisée pour la boîte de simulation dans toutes les dimensions. Nous avons étudié ensuite la variation du module de courbure  $k_c$  en fonction de la composition d'une bicouche, contenant les phospholipides les plus courantes (y compris DLPC, DPPC, POPC, DOPC, DLiPC, PUPC, DNPC, POPG, POPS, POPE et DPSM). Les résultats ont montré que  $k_c$  diminue fortement avec le nombre d'insaturations, alors qu'il est moins sensible à la longueur de la chaîne acyle. Nous avons exploré la variation de  $k_c$  en fonction de la composition des mélanges lipidiques : une série de mélanges contenant différentes

phosphatidylcholines POPC+POPE, DPPC+DLiPC, DLPC+DNPC, DPSM+DLPC aussi bien que les phosphatidylcholines et le cholestérol DOPC+Chol et DPPC+Chol. Nous avons constaté que dans le cas de mélanges homogènes, les valeurs de  $k_c$  peuvent être prédites à partir de la pondération moyenne des modules des deux composantes. Alors que dans le cas des mélanges à phases séparées, la rigidité apparente est plus proche de la valeur de la composante la plus molle.

La comparaison entre les résultats mesurés par AFM et ceux calculés par la simulation MD pour le module de courbure  $k_c$  d'une part ainsi que la comparaison avec des mesures AFM de ce paramètre disponibles dans la littérature, nous a mené à des conditions expérimentales optimales de mesure obtenues dans le cas de la pointe pyramidale montée sur un levier ayant une constante de force 0,08 N/m et utilisant le modèle mathématique de Shell pour traiter l'indentation élastique de la membrane, dans le cas des liposomes blancs. Dans ces mêmes conditions, nous avons abordé l'effet de la quercétine sur la rigidité d'une membrane.

Nos observations AFM ont montré aucun effet de la quercétine sur la morphologie et la structure des liposomes mais les courbes de forces indiquent une diminution de la rigidité des vésicules contenant cette molécule. Des simulations numériques sur des membranes contenant des concentrations de quercétines respectives de 4, 8, 12 et 16% ont montré que les propriétés structurales et dynamiques de la membrane lipidique sont affectées par la présence de quercétine et varient en terme de concentration de quercétine dans la membrane. Quant à la rigidité de cette dernière, les calculs numériques ont montré comme dans le cas des mesures AFM, sa diminution relative au taux de quercétine présent dans la membrane.

Dans une étape ultérieure, nous avons étudié par la microscopie AFM la stabilité des liposomes du type EggPC et examiné l'organisation des phospholipides E80 dans quatre solvants eutectiques profonds à base de ChCl (Deep eutectic solvents DES): ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, et ChCl:Lev et dans des solutions aqueuses de ces mêmes composants DES. Les observations AFM ont montré que les phospholipides ainsi que les liposomes peuvent être dissous dans les DES et ils peuvent s'auto-assembler conduisant à la formation de vésicules. Nous avons noté que la taille des liposomes réformés a diminué après leur exposition aux DESs. Des résultats similaires ont été obtenus en suivant l'effet de l'incubation de liposomes sphériques dans des solutions aqueuses

des composants DESs au fil du temps. Une fois incubés dans les DESs, les images AFM ont montré que les liposomes se sont convertis en SLB (Supported Lipid Bilayers) après 2 heures et ont fini par réformer des vésicules sphériques 24 heures plus tard.

# Abstract

In this work, we quantified the rigidity of blank EggPC liposomes and liposomes of the same type encapsulating quercetin. For this purpose, we measured the Young modulus from the force curves in the Force Spectroscopy mode of AFM Atomic Force Microscopy. In parallel, we calculated the Bending modulus  $k_c$  of the phospholipid bilayers that mimic the EggPC formulation, while using Molecular Dynamics MD.

Our study was performed following a wide range of rigidity values reported in literature, up to 2 orders of magnitude, for the same lipid composition. Such discrepancies make it impossible to compare values obtained for liposomes encapsulating different compounds. Hence, we aim to establish an experimental procedure in order to obtain accurate and reproducible values of the bending rigidity. We measured the bending rigidity (in terms of Young modulus) of Egg PC liposomes using different AFM tips, and different mathematical models to interpret the data in terms of bending modulus. We found that the tip shape of the AFM probe, its cantilever force constant, and the mathematical model all affect the bending modulus values, and that the choice of the theoretical model (Shell vs. Hertz model) makes the largest differences in the interpretation of the data.

In Molecular Dynamics simulations, we have used the Buckling Method, which imposes a preliminary optimization for the simulation box in all dimensions. Our study allowed to determine the optimal size for buckling simulations, reducing the computational cost while maintaining high reproducibility of the results. We then studied the variation of  $k_c$  as a function of the composition of a bilayer containing the most common phospholipids. Results showed that  $k_c$  decreases with unsaturation number, while it is less sensitive to acyl chain length. Also, we determined the elastic moduli for a number of binary and ternary lipid mixtures, with different chain length and level of unsaturation. We found that, in the case of homogeneous mixtures, the values of the elastic moduli can be predicted from the weighted average of the moduli of the two components. While, in the case of phase-separated mixtures, the apparent bending modulus is closer to the value of the softer component.



Comparison between the results measured by AFM and those calculated by MD Simulation for the bending modulus  $k_c$ , and others obtained in literature have conducted optimal experimental measurement conditions obtained in the case of the Pyramidal tip mounted on a cantilever with a force constant of 0.08 N/m and using the Shell model. Under these conditions, we treated the effect of Quercetin on EggPC membrane rigidity. The AFM observations show no effect of Quercetin on the morphology and structure of Liposomes, while the force curves indicate a decrease in the rigidity of liposomes encapsulating Quercetin. Numerical Simulations on membranes containing several Quercetin concentrations of 4, 8, 12 and 16% showed that the structural and dynamic properties of lipid membrane are affected in terms of Quercetin concentrations. As for the rigidity of the latter, numerical calculations indicated, as in the case of AFM measurements, a decrease of bending modulus in the presence of quercetin.

Finally, we studied by AFM Microscopy the stability of Eggpc Liposomes and examined the organization of Lipoid E80 in four Deep Eutectic Solvents (DES), namely ChCl:U, ChCl:EG, ChCl:G, ChCl:Lev. First, we assessed the stability of preformed liposomes prepared by the ethanol injection method, previously characterized. We found that phospholipids can be dissolved in DES, and they can self-assemble leading to the formation of vesicles. On the other hand, the size of preformed liposomes decreased after their exposure to DES, probably due to osmosis. Similar results were obtained when following the effect of the incubation of preformed liposomes in aqueous solutions of DES components over time. When incubated in DES, liposomes converted into SLBs after 2 hours, and eventually re-formed vesicles 24 hours later.

# Introduction

Les liposomes sont des petites vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre, qui ressemblent par leur structure lipidique à la plus petite unité vivante du corps humain, soit la cellule. Les vésicules se forment lorsqu'une bicouche lipidique encapsule le solvant, le séparant de l'environnement extérieur. Leur paroi est composée d'une ou de plusieurs bicouches de lipides, le plus souvent de nature phospholipidique, refermant un espace interne aqueux isolé du milieu extérieur. A cause de leurs propriétés biodégradables, biocompatibles, généralement non toxiques, et non-immunogéniques, ils sont considérés comme des véhicules idéales de tailles nanométriques et utilisés dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques, médicinales, et alimentaires. Les liposomes sont capables d'encapsuler des molécules hydrophobes, hydrophiles, et amphiphiles. Par conséquent, leurs applications en tant que système de stockage et véhicules pour de multiples composés intéressent de nombreux scientifiques. En effet, les liposomes ont constitué des vecteurs efficaces de principes actifs anticancéreux qui réduisent la toxicité systémique de la chimiothérapie<sup>1-3</sup>. Après de nombreuses années de recherche et de développement dans ce domaine, la FDA a approuvé la mise sur le marché de plusieurs nanomédicaments à base de liposomes en cancérologie<sup>3</sup>. L'efficacité de l'administration des composants dépend des propriétés physico-chimiques des liposomes, mais la relation précise entre les propriétés des liposomes et l'efficacité dans l'administration de médicaments n'est pas bien élaborée.

De nombreuses études expérimentales et théoriques montrent que l'élasticité des particules est un paramètre important qui a un impact sur presque tous les aspects de l'administration de médicaments, et peut être utilisé pour améliorer le ciblage tissulaire et les interactions spécifiques avec les cellules. Pour les liposomes, la propriété élastique la plus importante est la rigidité ou ce qu'on appelle le module de courbure (« Bending modulus ( $k_c$ ) » en anglais). Cette dernière est une propriété macroscopique fondamentale des bicouches lipidiques affectant la formation, la stabilité, la taille, la forme, l'agrégation, la perméabilité et l'efficacité de chargement des liposomes. La détermination de ce paramètre est un critère essentiel influant

leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. En général, le module de courbure est une constante macroscopique mécanique propre au système, qui décrit la tendance d'un certain matériau à s'opposer à la déformation. Dans le cas d'une membrane lipidique, elle est définie comme étant l'énergie nécessaire pour déformer la bicouche de sa courbure intrinsèque à une autre courbure. Pour mieux comprendre le module de courbure, on se réfère à l'équation de Helfrich décrite en 1973, pour l'énergie libre d'un liposome représenté comme une surface paramétrée lisse. Cette équation relie le module de courbure, la pression et les déformations volumiques d'un liposome à l'énergie libre comme c'est indiqué dans le paragraphe 2.2 du chapitre 1.

Il est connu que l'élasticité des liposomes soit affectée par les conditions physiques (par exemple, la température) et par la composition chimique du système d'intérêt (par exemple, la présence de médicaments). Cependant, la dépendance précise de l'élasticité en fonction de la composition chimique est très peu discutée.

L'objectif principal de cette thèse était de caractériser la stabilité et la rigidité des liposomes dans différents milieux, notamment lors de l'encapsulation de composés bioactifs. Nos études ont été réalisées en utilisant les deux techniques expérimentales et computationnelles, la microscopie à force atomique (AFM) et les simulations de dynamique moléculaire respectivement.

La microscopie à force atomique AFM est une technique qui permet l'investigation de la surface d'un échantillon, à l'échelle nanométrique et à une résolution élevée. Elle est basée sur la détection des forces d'attraction ou de répulsion entre une pointe microscopique et la surface balayée. L'AFM est particulièrement utilisée dans ce travail pour son pouvoir de figurer et d'indenter des liposomes de taille nanométrique, se trouvant dans leur état natif sans l'intervention d'additives supplémentaires, comme c'est le cas d'autres méthodes d'investigation expérimentales. Ceci permet de mesurer une valeur réelle du module de courbure des liposomes observés.

D'autre part, la dynamique moléculaire est une technique de simulation numérique dans laquelle les équations du mouvement sont résolues pour un ensemble d'atomes ou de molécules. Elle

repose généralement sur l'utilisation de la relation fondamentale de la dynamique, ou loi de Newton. Les modèles avancés de la dynamique moléculaire sont particulièrement utiles pour fournir une vue détaillée de la structure et de la dynamique des bicouches, encapsulant ou non des molécules, pour calculer aussi le module de courbure des membranes tout en permettant une interprétation des résultats expérimentaux.

Les valeurs de l'élasticité des vésicules phospholipidiques disponibles dans la littérature, et qui sont mesurées par la méthode AFM ou par d'autres méthodes, varient pour la même composition lipidique jusqu'à deux ordres de grandeur. Cette variation dans la valeur du module d'élasticité d'une membrane, elle-même, est plus grande que l'effet de la plupart des composés bioactifs sur le module d'élasticité de cette membrane. Ces divergences ne permettent pas de comparer, à titre d'exemple, les valeurs du module d'élasticité obtenues pour les liposomes encapsulant différents composés, ni de choisir une valeur définitive réelle du module d'élasticité pour une composition lipidique donnée, car il y a une confusion dans les différentes mesures.

Pour expliquer l'origine de cette divergence dans les valeurs du module de courbure, nous avons mesuré la rigidité des liposomes EggPC en utilisant quatre types de sondes AFM : deux pointes de forme pyramidale et deux pointes de forme conique, chaque pointe est montée sur un levier ayant une constante de force 0,08 ou 0,32 N/m. Le traitement des courbes de forces obtenues, a été réalisé en utilisant aussi deux modèles mathématiques ; celui de Hertz ou de Shell (coque). Les résultats ont montré que la forme de la pointe AFM, la constante de force du levier ainsi que le modèle mathématique choisi, affectent tous la valeur mesurée de la rigidité i.e. module de courbure et que le choix du modèle théorique Shell ou Hertz renferme le plus grand impact. Ensuite, nous avons comparé nos résultats expérimentaux avec le module de courbure que nous avons obtenu en simulation MD de bicouches lipidiques, utilisant la technique de déformation de la membrane, et aussi avec les valeurs rapportées dans la littérature utilisant d'autres techniques expérimentales et de simulation. Ces comparaisons ont montré un accord raisonnable des calculs ou des valeurs disponibles dans la littérature, avec une configuration expérimentale particulière, parmi les quatre configurations traitées, celle utilisant une pointe pyramidale ou conique à une constante de force égale à 0,08 N/m et appliquant le modèle de Shell.

Des questions similaires concernant la reproductibilité du module de courbure, calculé par différents modèles de simulation, se posent également dans les calculs numériques. Bien que la divergence dans les valeurs théoriques du module de courbure disponibles dans la littérature, soit beaucoup plus petite que celle trouvée dans le cas des mesures AFM. Plusieurs modèles ont été conçus pour calculer le module de courbure à travers la simulation MD, l'une d'entre elles, nommée méthode de déformation (« Buckling method »), est largement utilisée en raison de sa simplicité et de sa stabilité numérique. Lorsque la méthode de déformation de la membrane est utilisée, les différences entre les modules d'élasticité calculés sont généralement dans un facteur 2, pour une bicouche lipidique avec une composition définie à une température donnée. Pour comprendre l'origine de ces écarts, nous avons étudié les effets de taille finie en modifiant systématiquement la taille de la cellule de simulation dans toutes les dimensions. Nous avons trouvé que les dimensions de la boîte ont un petit impact sur le module d'élasticité, lorsque la taille est supérieure à un seuil minimum que nous avons déterminé dans les trois dimensions. Ensuite, nous avons étudié la variation du module de courbure  $k_c$  en fonction de la composition d'une bicouche, contenant les phospholipides les plus courantes, y compris DLPC, DPPC, POPC, DOPC, DLiPC, PUPC, DNPC, POPG, POPS, POPE et DPSM. Les résultats ont montré que  $k_c$  diminue fortement avec le nombre d'insaturations, alors qu'il est moins sensible à la longueur de la chaîne acyle. Nous avons exploré la variation de  $k_c$  en fonction de la composition des mélanges lipidiques : une série de mélanges contenant différentes phosphatidylcholines, POPC+POPE, DPPC+DLiPC, DLPC+DNPC, DPSM+DLPC aussi bien que les phosphatidylcholines avec du cholestérol DOPC+Chol et DPPC+Chol. Nous avons constaté que dans le cas de mélanges homogènes, les valeurs de  $k_c$  peuvent être prédites à partir de la pondération moyenne des modules des deux composantes. Alors que dans le cas des mélanges à phases séparées, la rigidité apparente est plus proche de la valeur de la composante la plus molle.

En utilisant les conditions de mesure AFM et celles de simulation MD, optimisées de façon à donner des valeurs similaires du module de courbure, nous avons abordé l'effet des composés bioactifs sur la stabilité et l'élasticité des liposomes EggPC. Le seul composé bioactif que nous avons eu le temps d'étudier son effet sur la membrane est la quercétine, un flavonoïde commun présent dans une variété d'aliments. La quercétine possède de nombreuses propriétés

bénéfiques, telles que anti-obésité, antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Malheureusement, elle présente une faible solubilité aqueuse ( $0,01 \text{ mg/ml}$  à  $25 \text{ °C}$ ), une stabilité chimique réduite, une faible biodisponibilité dans le corps humain et une courte demi-vie biologique. Ces inconvénients peuvent être dépassés à travers une encapsulation dans des structures liposomiales stables telles que les EggPC. Nous avons mesuré le module de courbure de la membrane EggPC en absence et en présence de la quercétine. Les observations AFM montrent aucun effet de la quercétine sur la morphologie et la structure des liposomes mais les courbes de forces indiquent une diminution de la rigidité des vésicules contenant cette molécule. Pour mieux comprendre l'effet de la quercétine sur la rigidité de la membrane, sa pénétration à travers la structure de la membrane EggPC, nous avons utilisé encore une fois des simulations MD. En effet, nous avons créé des systèmes de calcul dans des conditions aussi proches que possible des expériences (POPC: POPE dans un rapport molaire 86:10 qui ressemblent au lipide E80 constitué essentiellement de (80-85%) phosphatidylcholine et de (7-9.5%) phosphatidylethanolamine). Des simulations numériques pour des membranes lipidiques contenant des concentrations de quercétine respectives de 0, 4, 8, 12 et 16% ont montré que les propriétés structurales et dynamiques de la membrane lipidique sont affectées par la présence de la quercétine et varient en termes de concentrations de quercétine dans la membrane. Quant à la rigidité de cette dernière, les calculs numériques ont montré comme dans le cas des mesures AFM, sa diminution relative au taux de quercétine présent dans la membrane.

Dans une étape ultérieure, nous avons étudié la stabilité des liposomes en milieu non aqueux, notamment dans les solvants eutectiques profonds (DES). Les DESs sont des mélanges de composés naturels, à savoir des acides et des bases organiques, des acides aminés, des sucres, des alcools et des polyalcools, qui interagissent par liaison hydrogène et qui se liquéfient s'ils sont combinés dans des rapports molaires spécifiques. Le DES est en train de devenir rapidement un solvant vert en raison de sa biodégradabilité, de son accordabilité (tuneability), de son faible coût et de sa préparation simple. Le DES peut potentiellement être utilisé pour stocker et transporter divers composés peu solubles dans l'eau. Toutes ces propriétés le rendent intéressant pour des applications dans plusieurs domaines tels que la santé, les produits pharmaceutiques, les aliments, les cosmétiques et l'agriculture. En même temps, certains DESs présentent une

cytotoxicité plus élevée que leurs composants individuels. Dans l'ensemble, l'interaction du DES avec la matière biologique et les membranes biologiques en particulier, n'est pas bien comprise. Plusieurs études ont parlé de l'auto-assemblage des phospholipides dans des solvants non aqueux, mais peu d'études ont testé l'utilisation possible du DES pour dissoudre les phospholipides. L'objectif principal de nos observations AFM était de comprendre l'interaction entre ces solvants et les membranes lipidiques. Dans ce but, nous avons étudié le comportement des phospholipides et des liposomes stables du type EggPC, préparés par la méthode d'injection d'éthanol, à l'intérieur de quatre DESs à base de chlorure de choline : ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, et ChCl:Lev. Les observations AFM ont montré que les phospholipides ainsi que les liposomes peuvent être dissous dans les DESs et ils peuvent s'auto-assembler conduisant à la formation de vésicules. Nous avons noté que la taille des liposomes réformés a diminué après leur exposition aux DESs. Des résultats similaires ont été obtenus en suivant l'effet de l'incubation de liposomes sphériques dans des solutions aqueuses de composants DESs au fil du temps. Une fois incubés dans les DESs, les images AFM ont montré que les liposomes se sont convertis en SLB (Supported Lipid Bilayers) après 2 heures et ont fini par réformer finalement les vésicules 24 heures plus tard. Le comportement complexe des liposomes dans le DES n'a pas d'explication simple et appelle des investigations supplémentaires.

Au cours de cette thèse, nous avons expliqué pourquoi on repère dans la littérature, pour la même constitution lipidique et en utilisant la même méthode de mesure, plusieurs valeurs du module de courbure, qui est une grandeur physique intrinsèque de la membrane. Nous avons mis en évidence les facteurs et les conditions qui produisent une divergence dans les valeurs mesurées par la microscopie AFM, du module de courbure. En parallèle, nous avons précisé les origines des écarts dans la valeur du module de courbure, obtenu lors des simulations dynamiques. Ce qui nous a permis d'optimiser les conditions de quantification, expérimentales et théoriques, ultérieures. Les résultats que nous avons obtenus ont montré qu'un principe actif peut affecter le module de courbure d'une membrane d'une manière proportionnelle à sa concentration. Nous avons trouvé une dépendance entre le module d'élasticité et la composition des mélanges lipidiques, la rigidité apparente est plus proche de la valeur de la composante la

plus molle. Les liposomes semblent être stables et bien reformés au cours du temps, au sein des solvants verts tels que les DESs.

Cette thèse est divisée en deux parties : une première qui expose notre problématique de recherche et introduit dans les chapitres 1 et 2 les outils matériels et scientifiques que nous avons utilisés pour résoudre le problème. Une deuxième partie constituée des chapitres 3, 4, 5, et 6 qui expose les résultats que nous avons obtenus.

Dans le premier chapitre, on présente une bibliographie détaillée décrivant les liposomes, leurs applications, les modules de l'élasticité, leur importance, la quercétine, les méthodes utilisées dans la littérature pour déterminer la rigidité des membranes et les solvants eutectiques profonds.

Le chapitre 2 est envisagé pour les méthodes expérimentales et théoriques adoptées dans cette thèse, pour mesurer l'élasticité de la membrane. Les principes de fonctionnement du microscope AFM est décrit. L'avantage de cette méthode par rapport à d'autres, disponibles pour les membranes phospholipidiques, est aussi mise en évidence. En parallèle, nous avons explicité les équations de base de la dynamique moléculaire, des potentiels d'interactions intra et inter moléculaire avec le champ de force de MARTINI utilisé et la méthode de déformation de la membrane en simulation.

Le chapitre 3 introduit les résultats que nous avons obtenu en essayant de mettre en évidence l'origine des écarts dans la valeur du module de courbure disponibles dans la littérature. Un article rédigé résume le travail réalisé. Ce travail est le premier de son type de point de vue de la statistique qu'il contient (600 courbes de forces ont été analysées), ainsi que de son problématique. Récemment, et pendant la rédaction de cette thèse, en juillet 2020, Saavedra et al<sup>4</sup>. ont publié un travail portant des tentatives pareilles. Les autres études de recherche qui mesurent la rigidité d'une membrane lipidique par AFM, ont fixé les conditions initiales de mesure. Dans notre cas, nous avons utilisé pour le même échantillon quatre conditions différentes, ajustée chacune selon deux modèles mathématiques, au lieu d'un seul couramment observé dans les articles, pour le traitement des courbes de force.



Dans le chapitre 4, une publication récente résume des calculs de simulation du module de courbure d'une série de bicouches lipidiques, mono-composantes, binaires et tertiaires. Une optimisation de la taille d'un système a été réalisée initialement. La relation entre le module de courbure et le module de compressibilité surfacique a été pareillement discutée.

Dans le chapitre 5, l'effet de la quercétine sur l'élasticité de la membrane a été étudiée par AFM et par simulation dynamique. Les résultats constituent un article attaché.

Le chapitre 6 n'est autre qu'une publication récente où nous traitons la stabilité des liposomes EggPC, l'organisation des phospholipides du même type dans quatre solvants eutectiques profonds à base de chlorure de choline. Nous évoquons dans ce chapitre les protocoles expérimentaux de préparation des DESs et deux protocoles d'incubation des liposomes dans ces solvants.

Cette thèse se termine par une discussion générale de tous les résultats obtenus. Nous finissons par montrer comment nos résultats ont répondu au problème initial et initié des mesures nécessaires dans notre groupe de recherche et utiles au niveau scientifique et industriel.

(1) Batist, G.; Ramakrishnan, G.; Rao, C. S.; Chandrasekharan, A.; Gutheil, J.; Guthrie, T.; Shah, P.; Khojasteh, A.; Nair, M. K.; Hoelzer, K.; Tkaczuk, K.; Park, Y. C.; Lee, L. W. Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared with Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19* (5), 1444–1454. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.5.1444>.

(2) Davis, J. T.; Gale, P. A.; Okunola, O. A.; Prados, P.; Iglesias-Sánchez, J. C.; Torroba, T.; Quesada, R. Using Small Molecules to Facilitate Exchange of Bicarbonate and Chloride Anions across Liposomal Membranes. *Nature Chemistry* **2009**, *1* (2), 138–144. <https://doi.org/10.1038/nchem.178>.

(3) Jain, R. K.; Stylianopoulos, T. Delivering Nanomedicine to Solid Tumors. *Nat Rev Clin Oncol* **2010**, *7* (11), 653–664. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.139>.

(4) Saavedra V., O.; Fernandes, T. F. D.; Milhiet, P.-E.; Costa, L. Compression, Rupture, and Puncture of Model Membranes at the Molecular Scale. *Langmuir* **2020**, *36* (21), 5709–5716. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00247>.

# Première Partie : Bibliographies et méthodes

Cette partie est consacrée à la section bibliographique de la thèse. Elle est limitée aux chapitres 1 et 2.

Dans le chapitre 1, nous présentons une bibliographie détaillée concernant le matériel utilisé au cours de cette thèse. Il s'agit d'une description explicite concernant les liposomes, leurs applications, les modules de rigidité, leur importance, les méthodes de mesure de la rigidité, la quercétine et les solvants eutectiques profonds.

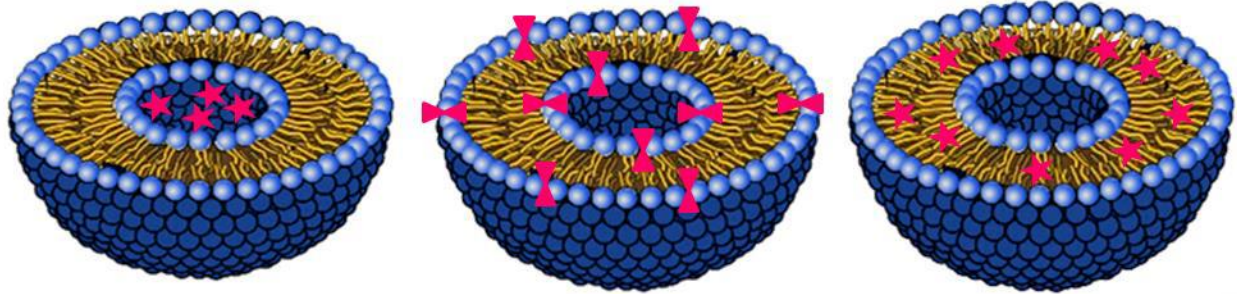
Dans le chapitre 2, nous nous focalisons sur les méthodes utilisées dans cette thèse pour quantifier la rigidité de la membrane : La microscopie à force atomique AFM et les méthodes de simulation en dynamique moléculaire. Nous nous attarderons en particulier sur la description de l'AFM qui a été exploitée en deux modes lors de cette étude, mode contact et mode spectroscopie de force. Pareillement, une illustration complète du principe de calcul en dynamique moléculaire a été incluse. Nous appuyons sur la méthode de la déformation de la membrane et la méthode des fluctuations de la surface avec des champs de forces de MARTINI, appliquées dans ce travail, pour calculer le module d'élasticité des membranes lipidiques ayant différentes constitutions.

# Chapitre 1 : Liposomes, élasticité et solvants eutectiques profonds

## 1. Liposomes

### 1.1. Définition

La première personne à avoir volontairement fabriqué des liposomes est Bangham en 1965<sup>1</sup>. Ce sont des structures sphériques fermées, caractérisées par la courbure d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques entourant une partie du solvant environnant. Ils sont principalement constitués de phospholipides auxquels on peut ajouter du cholestérol ou d'autres composés. Leur taille varie de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre. Principalement utilisés comme modèle membranaire pour l'étude de la structure et des propriétés des membranes biologiques<sup>2</sup>, les liposomes suscitent rapidement un grand intérêt en tant que nanovecteurs de choix pour des applications pharmaceutiques<sup>3,4</sup> et cosmétiques<sup>5,6</sup>. De par leur nature non-toxique, biodégradable et biocompatible et du fait de leur structure vésiculaire, les liposomes constituent des vecteurs uniques pour la délivrance de différents principes actifs (PA). Leurs intérêts résident principalement sur la possibilité de vectoriser des substances, soit par inclusion dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne. Il est donc possible d'y encapsuler des principes actifs de solubilité variable (hydrophile, amphiphile ou lipophile).



*Figure 1: Exemple d'encapsulation de molécules hydrophiles (gauche), amphiphiles (milieu) ou hydrophobes (droite) dans un liposome (les molécules encapsulées sont représentées en rose).*

La classification des liposomes est principalement basée sur des critères structuraux: taille et lamellarité ou nombre de bicouches<sup>7-9</sup> (voir Figure 2). Les liposomes unilamellaires présentent un intérêt majeur grâce à leur préparation facile et à la simplicité de compréhension de leurs propriétés membranaires. Ces vésicules sont en même temps classées en trois sous-types de taille (Figure 2). Les vésicules inférieures à cent nanomètres sont appelées petites vésicules unilamellaires (SUV) ; lorsque l'on va de cent nanomètres à un micromètre, de grosses vésicules unilamellaires apparaissent ; et des vésicules de plus d'un micron sont appelés vésicules unilamellaires géantes (GUV). Bien que les vésicules unilamellaires ont été largement étudiés dans de nombreux domaines, ceux de moins de deux cents nanomètres sont les plus explorés et les plus intéressants en tant que vecteurs de délivrance de médicaments/gènes dans le secteur pharmaceutique, tandis que les GUV sont principalement utilisés comme modèles de membranes simples pour étudier les propriétés des membranes cellulaires vivantes. En outre, des structures alternatives plus grandes se forment lorsqu'ils sont composés de plusieurs bicouches, il s'agit des vésicules oligolamellaires (OLV), des vésicules multilamellaires (MLV) et des vésicules multivésiculaires (MVV).

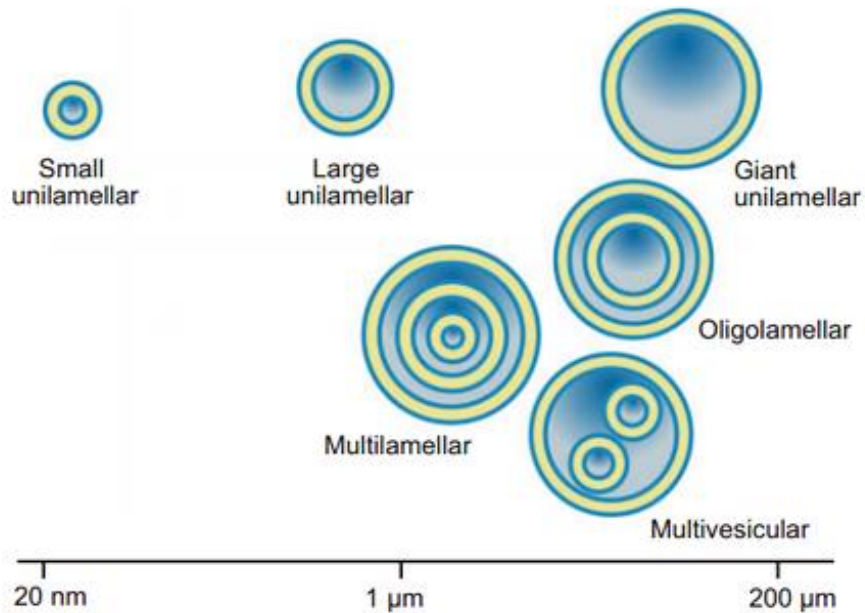


Figure 2 : Classification schématique des liposomes en tenant compte des paramètres structuraux, de la taille et du nombre de lamellaires.

## 1.2. Les phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles contenant à la fois un groupement hydrophile et un autre hydrophobe qui agissent comme des principaux éléments constitutifs des membranes biologiques. En général, ils sont composés de quatre composants, les acides gras, un squelette glycérol, un phosphate et un groupe polaire qui y est attaché.

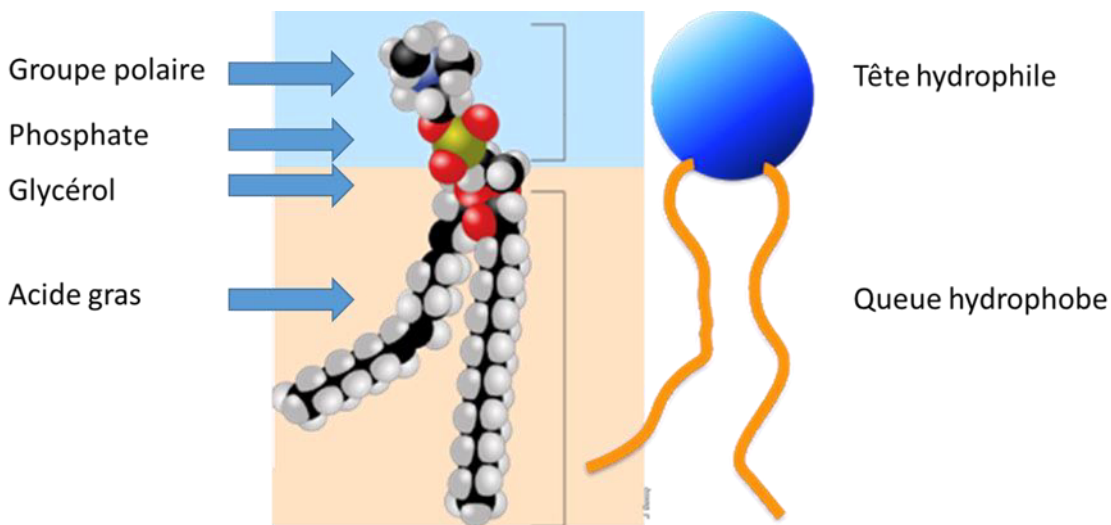


Figure 3: Structure du phospholipide.

Dans le cas des phosphoglycérides, deux des groupes hydroxyles présents dans le squelette glycérol (en positions C-1 et C-2) sont estérifiés en groupes carboxyle (saturés ou insaturés) formant les queues non polaires du lipide qui agit comme une barrière hydrophobe. Le groupe hydroxyle restant du squelette glycérol (en C-3) est estérifié à l'acide phosphorique qui pourrait être, en même temps, lié par une liaison ester entre son groupe phosphate et le groupe hydroxyle de l'un des différents alcools, offrant ainsi les propriétés hydrophiles nécessaires facilitant l'interaction avec l'environnement. Les phospholipides peuvent former des structures polymorphes extraordinairement riches grâce à leur auto-assemblage en milieu aqueux.

Dans cette étude, nous avons utilisé le Lipide E80 pour préparer des liposomes. Le Lipide E80 est composé principalement de phosphatidylcholine (80-85%) et de phosphatidyléthanolamine (7-9,5%). Les phospholipides extraits du jaune d'œuf comprennent l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1) et l'acide linoléique (C18:2) comme principaux acides gras. De plus, pour la lécithine de jaune d'œuf, les acides gras saturés estérifiés sont généralement le glycérol en position 1, tandis que les acides gras insaturés sont présents en position 2. Cette composition préparée à base de produits naturels, également appelée liposomes EggPC, est parmi les formulations les plus utilisées dans l'administration de médicaments, et peut encapsuler une grande variété de composés ayant des propriétés physico-

chimiques variées<sup>10-12</sup>. Elle est parmi les plus pertinentes pour les applications pharmaceutiques. Enfin, les formulations d'EggPC sont bon marché par rapport aux lipides purs.

### 1.3. Formation des vésicules

Le caractère amphiphile des phospholipides s'explique par leur double préférence pour l'eau. En 1972, Singer et Nicholson présentent le « modèle mosaïque de fluide » dans lequel ils rapportent que les groupes de tête lipidiques peuvent être exposés à des environnements aqueux en raison de leur nature hydrophile, tandis que les queues lipidiques sont hydrophobes et donc s'orientent l'une vers l'autre<sup>13</sup>. En solution aqueuse, de très faibles concentrations de lipides ont tendance à se dissoudre mais quand la concentration lipidique augmente au-delà de la concentration micellaire critique (CMC), ils s'auto-assemblent spontanément en raison de l'effet hydrophobe : la protection des chaînes d'hydrocarbures contre l'eau augmente l'entropie du système. Cette organisation lipidique produit une diversité d'architectures lipidiques non covalentes, telles que les structures lamellaires et non lamellaires comprenant les micelles, tubes, bicouches, liposomes, disques, rubans, phases hexagonaux et phases cubiques<sup>14-17</sup>. Les structures résultantes reflètent le conditionnement optimal des lipides qui se manifeste par une énergie minimale équilibrant les forces hydrophobes et les forces répulsives entre les groupes de tête confinés. Les interactions thermodynamiques mentionnées ci-dessus, ainsi que les forces attractives répulsives décrites dans la théorie DLVO<sup>18</sup> (du nom de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) ne sont pas les seuls facteurs déterminants. D'autres propriétés des lipides, tels que leurs propriétés chimiques et géométriques, ainsi que les conditions expérimentales, par exemple la température, le pH, la salinité et la pression sont des facteurs décisifs affectant le résultat structural des lipides<sup>19</sup>.

En 1976, Lachvili et al.<sup>20</sup> ont introduit le concept d'un paramètre de compactage moléculaire comme première tentative de corrélation de la structure moléculaire de l'amphiphile avec la courbure d'une membrane. Le concept décrit la géométrie du volume occupé par un lipide et sa

capacité de s'emballer dans différentes structures. Le paramètre d'emballage dit aussi de tassement, est défini ainsi par :

$$P = \frac{v}{l.a}, \text{ Equation 1}$$

( $v$ ) est le volume effectif occupé par les queues d'hydrocarbures, ( $l$ ) est la longueur des queues et ( $a$ ) est la section transversale moyenne du groupe de tête polaire.

En ce sens, lorsque  $P < 1/3$ , le lipide présente une forme de cône et se tassera en micelles. Si  $1/3 < P < 1/2$ , le lipide adopte une forme de cône tronqué et forme des micelles cylindriques (phases hexagonales). Si  $1/2 < P \leq 1$ , la forme du lipide est entre un cône tronqué et un cylindre, et sera emballé dans des vésicules ou des bicouches lamellaires. Enfin, si  $P > 1$ , le lipide affiche un cône et des micelles inversées se forment (voir Figure 4 ci-dessous).



Figure 4: rapport entre le paramètre de tassement et la structure formée par des lipides.

## 1.4. Préparation des liposomes

Historiquement, Les industries cosmétiques ont été les premières à produire des liposomes en grande quantité. Dans le cadre pharmaceutique, les différentes opérations et la qualité du produit final doivent répondre aux exigences requises dans la fabrication de produits injectables. Il s'agit obtenir des lipides hydratés puis des liposomes de diamètre souhaité.

De nombreuses méthodes de préparation des liposomes ont été développées mais seules quelques-unes permettent d'encapsuler des quantités suffisantes de composés hydrosolubles. La plupart des médicaments hydrosolubles sont incorporés dans les liposomes par la technique

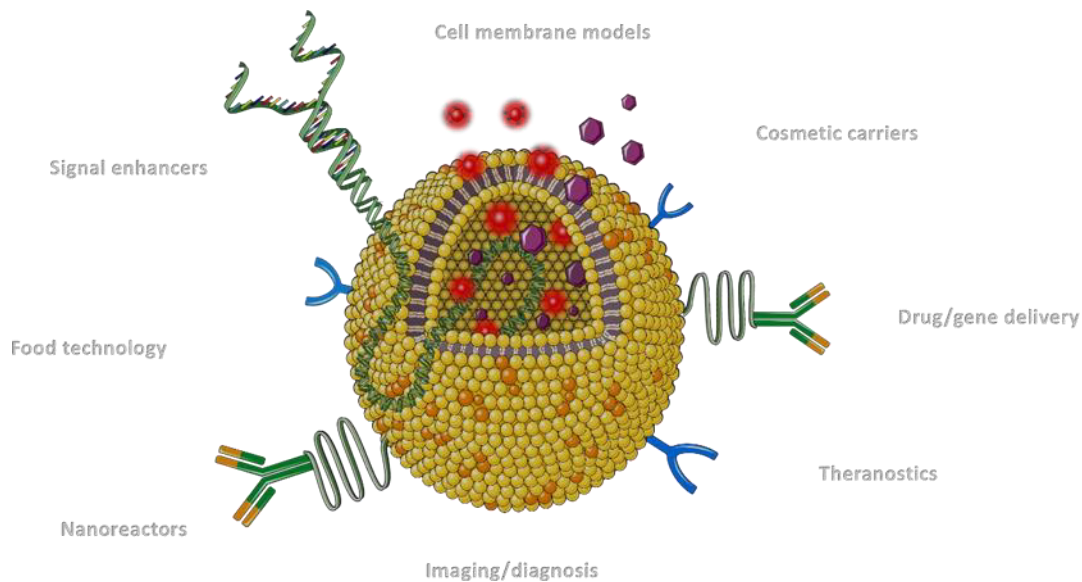


d'évaporation en phase inverse<sup>21</sup>, celle d'infusion d'éther<sup>22</sup> ou par la méthode de congélation-décongélation<sup>23</sup>. Ces techniques permettent d'obtenir des LUV mais généralement toutes les méthodes de préparation de liposomes produisent un mélange hétérogène de vésicules de différentes tailles. La réduction et l'homogénéisation de la taille est effectuée par sonication ou extrusion. Les liposomes ainsi formés sont ensuite séparés du produit non encapsulé resté libre en solution par des méthodes conventionnelles.

Dans ce travail, nous avons utilisé la méthode d'évaporation en phase inverse par injection d'éthanol. Cette méthode offre plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes. Elle est simple, en une seule étape, peu coûteuse, rapide, et évite l'utilisation de solvants nocifs ainsi que des forces puissantes qui peuvent perturber les liposomes et les molécules piégées<sup>24</sup>. En outre, cette méthode est reproductible et permet de préparer des vésicules de petite taille<sup>25</sup>. Des études antérieures ont été menées dans notre laboratoire pour incorporer des composants d'huiles essentielles dans les liposomes<sup>26,27</sup>, dans lesquelles plusieurs paramètres tels que la concentration de phospholipides, la concentration du cholestérol, et le rapport éthanol/eau, ont été optimisés<sup>28</sup>.

## **1.5. Applications des liposomes**

Alec D. Bangham a d'abord proposé les liposomes comme modèles de membranes cellulaires mais ce n'est que quelques années plus tard que Gregory Gregoriadis a étendu leur applicabilité, en établissant l'idée que ces vésicules peuvent piéger des molécules et possèdent un potentiel énorme en tant que transporteurs dans différents domaines<sup>29</sup>. De plus, leur structure particulière qui offre la possibilité de transporter et de protéger des composés hydro et lipophiles dans le cœur ou dans la bicouche respectivement, ainsi que leurs propriétés biocompatibles, biodégradables et non immunogènes, ont positionné les liposomes comme des outils incroyablement polyvalents dans une gamme très vaste de disciplines scientifiques (Figure 5).



*Figure 5: Applications des liposomes dans des domaines divers.*

Les liposomes ont été largement explorés comme des vecteurs pour l'administration d'une variété de médicaments, y compris des agents chimiothérapeutiques anticancéreux<sup>30</sup>, des bactéricides<sup>31</sup>, des fongicides<sup>32</sup>, des hormones<sup>33</sup>, des enzymes<sup>34</sup> et matériel génétique<sup>35</sup>. Dans le domaine thérapeutique, il a été largement rapporté que l'encapsulation d'un médicament dans des nanotransporteurs liposomaux peut prévenir ses effets secondaires toxiques et améliorer son efficacité en optimisant la biodistribution du médicament et sa dynamique pharmacocinétique. Les liposomes sont actuellement utilisés, en raison de leur protection médicamenteuse, de leur longue circulation sanguine, de leur ciblage et de leur libération de médicaments spécifiques<sup>36,37</sup>.

Également, les liposomes ont été explorés dans le domaine de la vaccination<sup>38,39</sup> et comme adjuvants immunologiques pour améliorer l'immunogénicité des petits antigènes<sup>40</sup>, particulièrement lorsqu'ils sont utilisés en tant que porteurs de matériel génétique. Les liposomes cationiques ont été exploités en thérapie génique comme candidats efficaces pour l'encapsulation, la protection et la livraison facile du matériel génétique en raison de la capacité des lipides cationiques à se lier et à transporter des molécules d'ADN / ARN polyanioniques<sup>41</sup>. L'application des liposomes comme des supports cosmétiques a commencé en 1980 par Mezei et Gulasekharam comme des plates-formes de peau de livraison<sup>42</sup>. Depuis, des recherches

intensives cosmétiques ont placé les liposomes comme vecteurs de livraison efficaces en raison de leur protection des molécules et de leur pouvoir de pénétration cutanée<sup>43-46</sup>.

Bien que la recherche sur les liposomes soit orientée vers des applications médicales, il convient de souligner que les liposomes ont abordé de nombreuses disciplines scientifiques. Ils ont été utilisés comme des modèles mathématiques pour simuler la libération de médicaments à partir des liposomes<sup>47</sup> et en théorie physique pour l'analyse du comportement d'agrégation, ségrégation de phase membranaire, et de la morphologie de la vésicule<sup>48</sup>. En science colloïdale, les liposomes sont utilisés pour l'étude des processus d'agrégation, des stabilités colloïdales et de la théorie DLVO<sup>49</sup>. On trouve souvent des liposomes dans les disciplines chimiques, notamment en catalyse<sup>50</sup>, en conversion d'énergie<sup>51,52</sup>, et comme réacteurs ou modèles pour réactions chimiques<sup>53,54</sup>. En outre, en raison du fait que les liposomes sont des analogues synthétiques des membranes biologiques, elles ont été largement utilisées comme modèles membranaires pour comprendre de nombreuses fonctions de la membrane cellulaire<sup>55,56</sup>.

L'industrie alimentaire a également exploité l'utilisation de la technologie des liposomes en raison de leur capacité à encapsuler des molécules hydrophiles et hydrophobes. Les propriétés biocompatibles et biodégradables des liposomes ont été utilisées pour piéger et protéger la fonctionnalité des composés instables tels que les enzymes, les vitamines, les antioxydants et les arômes, ainsi que pour la délivrance de toxines et de pesticides, dans les domaines nutritionnels et agricoles<sup>57</sup>. L'industrie textile a inséré la technologie liposomiale dans ses procédés, principalement dans la teinture de la laine, parfum durable, protecteur textile, insectifuges, et agents antimicrobiennes<sup>58</sup>.

Dans notre étude, nous avons abordé l'effet des composés bioactifs sur la stabilité et la rigidité des liposomes. Le composé bioactif de choix pour notre étude est la quercétine. La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyl-flavone) est un flavonoïde commun présent à l'état naturel dans une variété d'aliments végétaux aux couleurs vives, notamment l'oignon, la pomme, le brocoli, le thé et le vin rouge<sup>59</sup>. La structure chimique de la quercétine est représenté dans la Figure 6 ci-dessous.

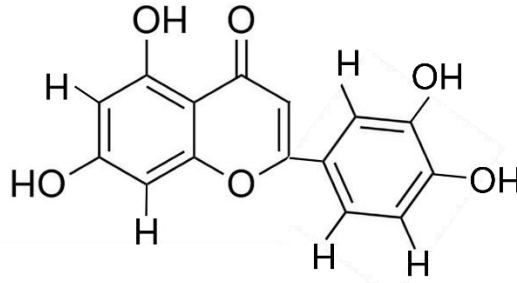


Figure 6: Structure de la Quercétine.

La quercétine fait l'objet d'un nombre croissant de recherches en raison de ses nombreuses propriétés bénéfiques, notamment ses propriétés antioxydants<sup>60,61</sup>, antivirales,<sup>62,63</sup> anticancéreuses<sup>64,65</sup>, antimicrobiennes<sup>66,67</sup>, anti-inflammatoires<sup>68,69</sup>, et anti-obésité<sup>70</sup>. Actuellement, l'utilisation de la quercétine comme ingrédient dans des préparations pharmaceutiques ou des produits alimentaires suscite un intérêt croissant. Toutefois, en raison de sa faible solubilité aqueuse (environ 0,01 mg/mL à 25 °C)<sup>71</sup>, de sa faible biodisponibilité<sup>72</sup> dans le corps humain et de sa stabilité chimique réduite<sup>73</sup>, l'utilisation de la quercétine est limitée. L'encapsulation de la quercétine dans des liposomes EggPC pourrait permettre de surmonter les inconvénients liés aux propriétés physico-chimiques de ce flavonoïde<sup>74-76</sup>.

## 2. Théorie élastique de la membrane

De nombreux mécanismes ont été décrits dans la formation des liposomes, et certains d'entre eux sont plus complexes que d'autres. Une des approches envisageant l'auto-association d'une bicouche dans un liposome, suggère une compétition entre deux effets, l'énergie de courbure et l'énergie de bord d'une bicouche<sup>77</sup>. Une bicouche lipidique dans un environnement hydrophile, sera soumise à une tension superficielle élevée au niveau des bords. L'élasticité de courbure peut réduire cette énergie de bord, toutefois elle peut impliquer une perte d'énergie due à la courbure induite. Pour réduire davantage les effets de bord, une courbure supplémentaire est nécessaire, ce qui va former une sphère, avec une énergie de bord réduite à zéro. Sachant que l'épaisseur membranaire est très faible (3 à 6 nm) par rapport au diamètre de la vésicule (peut atteindre

plusieurs microns), la membrane, d'un point de vue mécanique, est équivalente à deux feuillets élastiques extrêmement fins. En considérant la bicouche lipidique comme un matériel isotrope et homogène, elle est donc modulable à une surface élastique<sup>78</sup>. Les études théoriques considèrent les membranes phospholipidiques comme des milieux élastiques continus. N'importe quelle force exercée sur la surface peut être exprimée comme une combinaison de trois modalités de déformation, à savoir, la courbure, la compressibilité et le cisaillement<sup>77,79,80</sup> illustrés dans la Figure 7.

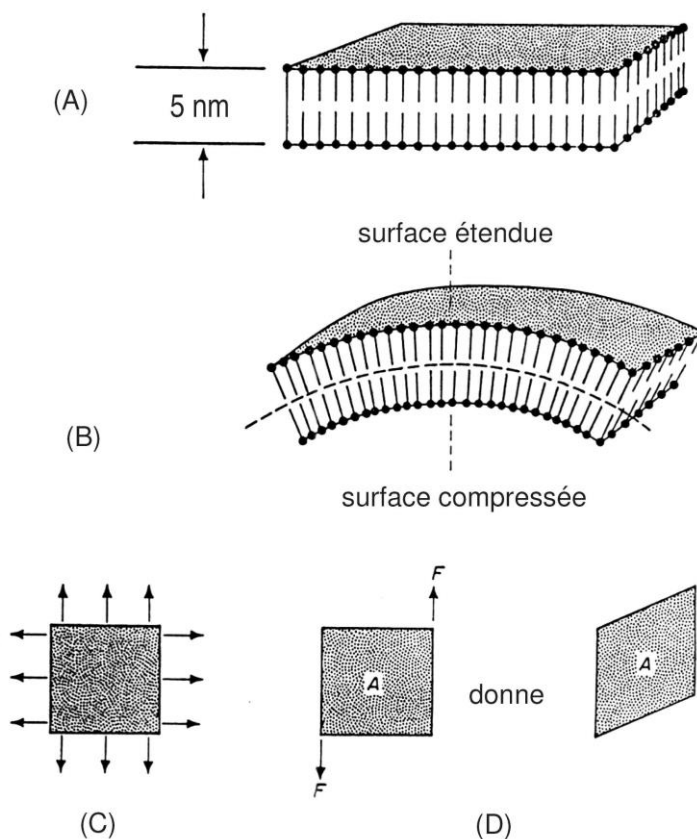


Figure 7: Différents modes de déformations d'une membrane : (A) schéma d'une membrane plane, (B) Courbure, (C) extension / compression, (D) cisaillement, [Canham, 1970]<sup>81</sup>.

Les déformations présentées dans la Figure 7 sont régies par les interactions entre plusieurs acteurs : les lipides ou les complexes lipidiques, et les protéines. En considérant que la déformation est proportionnelle à la forme de stress appliquée (loi de Hooke), les propriétés

mécaniques d'une vésicule sont décrites par les trois paramètres élastiques suivants : la constante de compressibilité ( $K_A$ ), la constante d'étirement ( $\mu$ ) et le module de courbure ( $k_c$ ).

## 2.1. Extension / compression

Cette déformation correspond à une variation de l'aire de la membrane (plus précisément l'aire par lipide dans une description moléculaire). L'augmentation de l'aire correspond à l'extension, sa diminution à la compression. L'énergie d'interaction entre les phospholipides présente une valeur minimale pour une distance de 1nm entre deux têtes polaires successives. Toute déviation de cette distance (compression ou extension) coûte en énergie  $dE$ . La compressibilité de la bicouche est liée à sa résistance à la compression/extension. Cette résistance est caractérisée par une énergie élastique par unité de surface, liée à la tension nécessaire pour maintenir le changement de surface  $\Delta A$ .

$$dE = \frac{1}{2} K_A \left( \frac{\Delta A}{A_0} \right)^2, \text{ Equation 2}$$

Avec  $\Delta A$  est la variation de l'aire de la surface par rapport à une aire d'équilibre  $A_0$ .

## 2.2. La courbure

La courbure d'une membrane peut être décrite par deux courbures principales  $c_1 = \frac{1}{R_1}$  et  $c_2 = \frac{1}{R_2}$  qui dépendent du référentiel utilisé pour paramétrer la membrane (Figure 8). On peut s'affranchir de cette dépendance en considérant la courbure moyenne  $H = c_1 + c_2$  et la courbure gaussienne  $K = c_1 \cdot c_2$  qui sont invariants. D'un point de vue géométrique, ces deux grandeurs sont respectivement la trace et le déterminant du tenseur de courbure, et sont donc invariants quelle que soit la paramétrisation choisie.

On peut donc exprimer la densité d'énergie associée à la courbure comme une combinaison de ces deux grandeurs<sup>77,81</sup>.

$$f_{courb} = \frac{1}{2} k_c (H - H_0)^2 + k_G K, \text{ Equation 3}$$

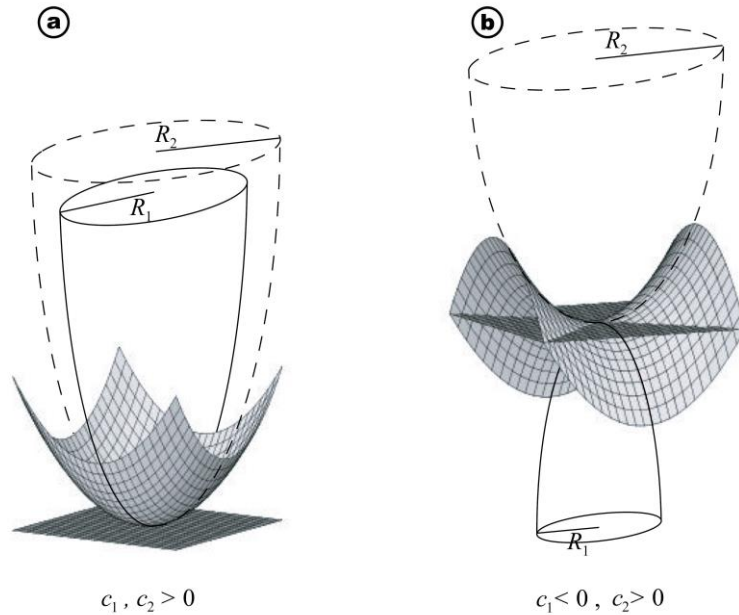


Figure 8: Courbures principales pour deux surfaces courbées : (a) courbures de même signe, forme ellipsoïdale. (b) Courbures de signes opposés, forme dite en "selle de cheval"<sup>82</sup>.

- Module de courbure  $k_C$  : La valeur de ce paramètre dépend de la composition moléculaire de la membrane (longueur et flexibilité des queues lipidiques, interactions entre têtes polaires, ... etc.)<sup>83</sup>. En effet, le module de courbure est une constante macroscopique mécanique qui décrit la tendance énergétique d'un certain matériau à s'opposer à la déformation. C'est ainsi qu'il est mesuré en joules ou en  $k_B T$ . Il varie avec la composition de la membrane et dépend des conditions du milieu extérieur (pH, force ionique, ... etc.). Ce paramètre est de l'ordre de  $10^{-19} \text{J}$  pour des membranes lipidiques. Nous exposerons dans la suite de ce chapitre des méthodes expérimentales et numériques qui permettent de le mesurer (voir paragraphes E et F).
- Module élastique gaussien  $k_G$  : caractérise l'énergie élastique associée à la courbure intrinsèque (ou gaussienne).
- Courbure spontanée  $H_0$  : Ce paramètre caractérise la courbure d'équilibre de la membrane en absence d'aucune contrainte.

Pour décrire la membrane par un modèle théorique il faut définir l'hamiltonien  $H$  qui renferme toutes les formes d'énergies pertinentes. La courbure constitue la contribution dominante pour une membrane fluide et libre. Canham et Helfrich<sup>77,81</sup> ont proposé un hamiltonien sur la base de la densité d'énergie de courbure, appelé Hamiltonien de Canham-Helfrich, qui constitue l'élément clé du modèle dit de courbure et qui s'écrit :

$$H = \int dA \frac{1}{2} [k_c(H - H_0)^2 + k_G K], \text{ Equation 4}$$

Les modélisations proposées ultérieurement pour la simulation des membranes se basent principalement sur cet Hamiltonien en incluant des termes additionnels pertinents pour chaque cas particulier.

Dans notre étude, nous avons déterminé la rigidité de la bicouche lipidique en terme du module de courbure  $k_c$  et du module de compressibilité  $K_A$ , les cisaillements sont supposés négligeables tout le long de ce travail.

### **3. Modèles mathématiques pour la détermination de la rigidité basée sur la mécanique de contact**

#### **3.1. Modèle de Hertz**

La mécanique de contact fait appel à des propriétés qui tiennent en considération les contraintes géométriques. Plusieurs théories décrivent la déformation élastique d'un système. Les différences dans les relations entre la charge appliquée  $F$  et le rayon de contact  $a$  ou la déformation  $\delta$ , lors du contact, sont dues au rôle joué par l'adhérence dans le système considéré. Le premier modèle pour décrire le contact élastique entre deux objets élastiques sphériques a été introduit en 1882 par Heinrich Hertz<sup>84</sup>. Dans sa théorie, il rapporte la zone de contact circulaire d'une sphère avec un plan (ou plus général entre deux sphères) aux propriétés de



déformation élastique des matériaux mises en contact. Le modèle de Hertz considère la surface à indenter comme une surface élastique isotrope et linéaire occupant un demi-espace s'étendant à l'infini. Théoriquement, toutes les interactions de surface telles que les interactions de Van der Waals, ou les interactions adhésives durant le contact, sont négligées par rapport à la force extérieure appliquée (la contrainte). Ce modèle fournit la relation entre l'indentation, le rayon de contact, la force appliquée et le module d'Young des corps en contact. On définit le module d'Young comme une constante élastique qui, pour un matériau homogène isotrope, lie la contrainte à la déformation. Dans le Système International on l'exprime en MPa, ce coefficient n'est autre que la raideur de la matière.

Des modèles avancés se basant sur le modèle de Hertz ont été fournis par Johnson et al. (vers 1970) et ultérieurement par JKR(Johnson, Kendall, Roberts)<sup>85</sup>. Dans la théorie JKR, le contact est considéré comme adhésif. Par conséquent, la théorie corrèle la zone de contact, restreinte aussi aux contacts sphériques élastiques, avec les propriétés élastiques du matériau plus la force adhésive à l'interface. Une théorie plus impliquée (la théorie DMT) considère également les interactions de Van der Waals en dehors du régime de contact élastique, ce qui donne lieu à une force supplémentaire. La théorie JKR peut être appliquée dans le cas de rayons élevés de l'indenteur et d'échantillons mous avec une forte adhérence, tandis que la théorie DMT est applicable dans le cas de petits indenteurs et d'échantillons rigides avec une faible adhérence. Les deux développements ne sont que des approximations non compatibles avec nos indenteurs AFM (nanométriques), ni avec nos échantillons liposomiales (élastiques). C'est ainsi que toutes les mesures que nous avons réalisées, ont été analysées selon les équations de contact de base fournies par Hertz model.

### **1.1.1. Solution Analytique du modèle d'Hertz**

Les équations de Hertz sont établies pour les contraintes qui apparaissent durant un contact entre deux corps élastiques. Hertz a ainsi supposé des petites déformations dans la limite élastique. Le modèle original de Hertz considère le contact peu profond, dit de faibles indentations, entre deux corps sphériques. Le rayon de contact,  $a$ , est considéré comme

significativement plus petit que le rayon de courbure  $R$ , et les deux surfaces en contact sont supposées non conformes (voir Figure 9). De plus, le fluage à l'interface est négligé c'est-à-dire un contact sans frottement est supposé.

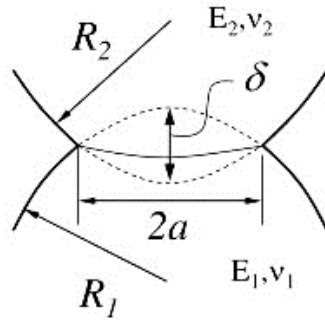


Figure 9: Contact entre deux corps de forme sphérique.

Sur la base de cette hypothèse, le rayon de contact  $a$ , la zone de contact  $A$ , et la pression maximale  $P_{max}$  et la pression moyenne  $P_m$  peuvent être déterminées avec l'analyse de demi-espace infini élastique comme :

$$\text{Rayon de contact Hertz : } a = \left[ \frac{3FR}{4E^*} \right]^{1/3} \text{ Equation 5}$$

$$\text{Zone de contact Hertz: } A = \pi a^2 = \pi \left[ \frac{3FR}{4E^*} \right]^{2/3}, \text{ Equation 6}$$

$$\text{Approche mutuelle ou indentation : } \delta = \frac{a^2}{R} \left[ 1 - \frac{2}{3} \left( \frac{a_0}{a} \right)^{3/2} \right], \text{ Equation 7}$$

$$\text{Pression de Hertz : } P_{max} = \frac{3F}{2\pi a^2} = \frac{3}{2} p_m \left[ \frac{6L(E^*)^2}{\pi^3 R^2} \right]^{1/3}, \text{ Equation 8}$$

où  $F$  est la force normale appliquée (charge), et  $E^*$  est le module d'Young réduit et  $R$  est le rayon de courbure des deux matériaux (1 et 2):

$$E^* = \left( \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right)^{-1} \quad \text{et} \quad R = \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^{-1}$$

avec  $E_1$  et  $E_2$  sont les modules d'élasticité des sphères 1 et 2 et  $\nu_1$  et  $\nu_2$  sont les rapports de poisson, respectivement (à savoir  $\nu \approx 0,5$  pour les polymères). Les interactions adhésives sont négligées dans le modèle de Hertz.

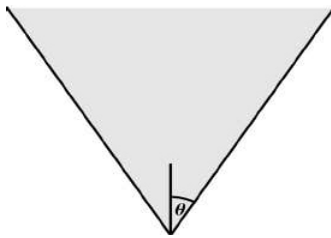
Le module d'Young  $E^*$  peut être extraite à partir de la pente des courbes de force  $F$  vs indentation ( $\delta$ ) qui sont tracées au cours d'un contact.

Cependant les indenteurs AFM possèdent des rayons de contact circulaires différents se caractérisant par des angles d'ouvertures différents (voir Figure 1-b du chapitre 2). Plusieurs extensions ont été faites pour différentes géométries de l'indenteur<sup>86</sup>, nous citons celles qui correspondent aux indenteurs AFM que nous avons utilisés :

Indenteur conique :

$$F = \frac{E^*}{1-\nu^2} \frac{2\tan\theta}{\pi} \delta^2, \text{Equation 9}$$

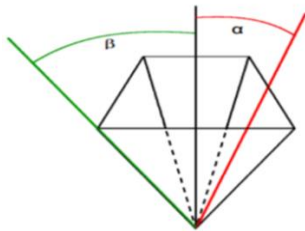
avec  $a = \frac{2\tan\theta}{\pi} \delta$ , et  $\theta$  est l'angle défini sur la figure.



Indenteur Pyramidal :

$$F = \frac{E^*}{1-\nu^2} \frac{\tan\alpha}{\sqrt{2}} \delta^2, \text{Equation 10}$$

avec  $a = \frac{\tan\alpha}{\sqrt{2}} \delta$ , ou  $\alpha$  et  $\beta$  sont définis sur la figure.



Nous avons utilisé l'équation 9 et l'équation 10, pour calculer le module d'Young  $E^*$  des liposomes en se servant des courbes d'indentation de forces récupérées ( $F$  vs  $\delta$ ) dans notre mesure.

### 3.2. Modèle de Coque ou « Shell Model »

Les capsules à parois minces sont des exemples de structures courbées avec une très petite extension dans une dimension spatiale (voir Figure 10). Ces structures de surface incurvées sont généralement appelées coques et leur comportement mécanique est étudié par la théorie des coques<sup>87-89</sup>.

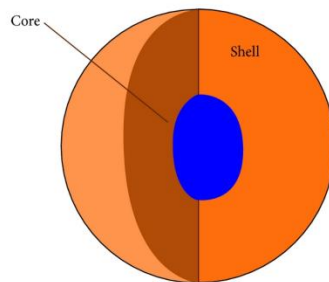


Figure 10: Exemple du modèle de coque

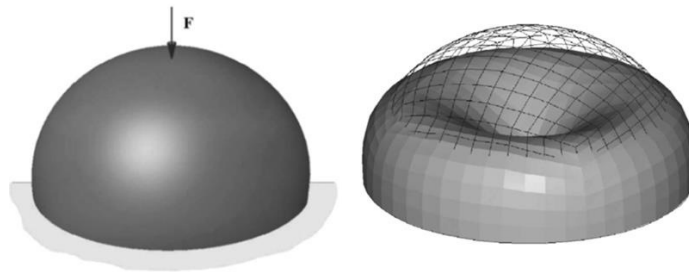
La raison de l'utilisation généralisée des coquilles dans la nature, de laquelle s'étire cette technologie, est que la courbure de la structure permet une utilisation mécanique efficace du matériau. L'approche théorique principale est de considérer le matériau comme un continuum. Une simplification importante repose sur le fait que l'épaisseur de la structure ( $z$ ) est beaucoup plus petite que les deux autres dimensions ( $x$ , et  $y$ ). Cela permet une « réduction dimensionnelle » du problème de description de la coque par sa surface médiane bidimensionnelle. Une fois le problème bidimensionnel est résolu, les hypothèses de KirchhoffLove pour la déformation autorisent l'« extension » dans la troisième dimension: les points sur le même vecteur normal de la surface médiane non déformé reste sur la même normale même après déformation, et les déplacements dus à la force exercée suivant la direction  $z$  sont les mêmes pour tous les points à

la même normale, c'est-à-dire la déformation de cisaillement à travers la paroi de la coque est négligée<sup>90</sup>. La déformation de la coque est soit une extension dans le plan et un cisaillement ou une déformation hors plan. La forme peut être prédite par une minimisation de l'hamiltonien de Helfrich <sup>77</sup>, qui contient la courbure moyenne et gaussienne pour décrire la géométrie locale de la membrane, ainsi la rigidité  $k_c$  est déduite à partir de ces paramètres intrinsèques<sup>91</sup>.

Dans la théorie classique des coquilles, des solutions analytiques peuvent être obtenues uniquement pour une géométrie de coque simple et des conditions de forces simples. Dans notre contexte, un résultat analytique important est la déformation d'une coque sphérique soumise à des charges ponctuelles sur ses pôles<sup>92</sup>. Près du pôle, La résolution du problème s'est avérée équivalente au résultat simple trouvé pour les sphères peu profondes par Reissner<sup>93</sup>. Le déplacement normal du pôle, appelé indentation  $\delta$ , due à la force  $F$  exercée est donné par l'équation suivante :

$$\delta = \frac{\sqrt{3(1-\nu^2)}}{4} \frac{FR}{E^*h^2}, \text{ Equation 11}$$

où  $R$  est le rayon de courbure des liposomes,  $h$  est l'épaisseur de la membrane, et  $E^*$  est le module de Young réduit.



*Figure 11 : Déformation d'une coque sphérique sous une charge ponctuelle (situation de chargement avant déformation comme indiqué sur le schéma de gauche). La coque réagit avec une instabilité de flambage pour des forces supérieures à une force critique<sup>94</sup>.*

La dépendance entre le module de courbure i.e. module d'Young  $E^*$  et la géométrie de la capsule peut être obtenu par un argument énergétique simple : la dimension linéaire de la zone pliée, notée  $a$ , est déterminée par l'exigence que la somme des énergies d'étirement et de déformation atteint un minimum. Pour les coques minces, des déformations peuvent être envisagées « Petits » lorsqu'ils ont à peu près l'épaisseur de la paroi de la coque. Dans la conception de procédures expérimentales, qui utilisent des résultats analytiques dans leur interprétation, il faut limiter la déformation de la capsule à la région de petites déformations.

En se basant sur cette théorie, le module d'Young est déterminé à travers la pente de la courbe force via indentation, conformément à l'équation 11.

## **4. Importance de la rigidité**

### **4.1. Pourquoi on mesure la rigidité d'une membrane ?**

Dans le domaine de la mécanobiologie cellulaire, on essaie de comprendre comment les cellules migrent, se déforment, interagissent, comment elles ressentent, génèrent et répondent aux forces mécaniques. Des modifications de la fonction cellulaire ou des changements pathologiques peuvent significativement modifier les propriétés mécaniques de la cellule. Par conséquence, les propriétés mécaniques des cellules peuvent être utilisées comme indicateurs de leurs états biologiques et peuvent fournir des connaissances approfondies sur la pathologie<sup>95,96</sup>.

Les recherches se sont concentrées sur l'étude de la dynamique du cytosquelette et l'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire (ECM) en fonction de la forme, la fonction, la déformabilité et les propriétés mécaniques des cellules. Les propriétés biomécaniques des cellules sont essentiellement déterminées par le cytosquelette qui est remodelé pendant la migration cellulaire, l'adhésion, la prolifération et la différenciation<sup>96,97</sup>. D'autres études se sont limitées à la viscoélasticité et à la connexion entre les 24 structures subcellulaires comme les

microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires ainsi que l'effet des perturbations mécaniques sur les processus cellulaires<sup>98,99</sup>. Il a été observé qu'une perturbation de la structure et de la dynamique du cytosquelette d'actine résulte en une baisse de la rigidité des cellules<sup>100,101</sup>. Plus récemment, il a été montré que les forces actives générées par le cytosquelette d'actine modifient et contrôlent ses propres propriétés<sup>47</sup>. L'effet de ces forces sur l'organisation du cytosquelette et les propriétés des cellules a été intensément étudié sur différents types cellulaires<sup>102,103</sup>.

Les recherches accomplies sur une variété de pathologies, montrent que ces dernières modifient les fonctions mécaniques de la cellule<sup>104</sup>. A titre d'exemple, les cellules cancéreuses ont un module élastique plus petit que des cellules normales<sup>105</sup>. On a démontré d'ailleurs que des variations dans les propriétés viscoélastiques pendant l'invasion tumorale constituent une signature possible du potentiel métastatique des cellules cancéreuses<sup>106</sup>.

En fait, les globules rouges humains ont la capacité de subir de grandes déformations lorsqu'ils sont soumis à des contraintes externes, ce qui leur permet de passer à travers des capillaires plus étroits que le diamètre d'un globule rouge au repos. Les globules rouges sont plus déformables que tout autre biomatériau<sup>107</sup>, leur élasticité est très élevée. La déformabilité des globules rouges joue un rôle important dans leur principale fonction, le transport de gaz (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) par la circulation sanguine. Cette déformabilité est définie comme étant la capacité à changer de forme par suite à une force extérieure. Toute réduction dans la déformabilité/élasticité des globules rouges reflète un dysfonctionnement de ces cellules. Il a été démontré par exemple qu'une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides (C/PL) de 1.28 à 2.0 entraîne une augmentation de la rigidité de la membrane des erythrocytes<sup>108</sup>.

## **4.2. L'impact de l'élasticité des nanoparticules dans l'administration des médicaments**

L'élasticité des nanoparticules joue un rôle important dans la modulation des processus d'administration des médicaments. Il est clair à partir de nombreuses études in vitro et in vivo

que l'élasticité des particules est un paramètre important qui peut être exploité pour améliorer la circulation sanguine, le ciblage tissulaire et les interactions spécifiques avec les cellules (voir Tableaux 1 et 2).

#### **4.2.1. Interaction in vitro**

Les interactions in vitro entre les cellules et les nanoparticules sont affectées par les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. La détermination de l'effet de l'élasticité des nanoparticules sur les principales interactions in vitro comme liaison cellulaire, internalisation cellulaire et localisation intracellulaire est essentielle de point de vue industrielle. Dans le tableau 1, nous mettons en évidence l'influence de l'élasticité des nanoparticules, leur association et internalisation avec les systèmes immunitaires, endothéliaux et cellules cancéreuses. Des études actuelles qui se sont concentrées sur l'impact de l'élasticité sur les interactions in vitro, ont été résumées tout en notant le type des nanoparticules, leurs propriétés physiques et les résultats expérimentaux.

*Tableau 1 : L'élasticité des différentes nanoparticules et leurs associations et internalisations avec différents systèmes biologiques.*



Type de particules	Elasticité	Résultats in vitro	Reference
PEG spheres hydrogel, ~200 nm	Mou : 10 KPa Rigide : 3000 KPa	Les particules rigides sont mieux internalisées par les macrophages J774. Les particules rigides sont mieux internalisées dans les cellules endothéliales LPS. Les particules rigides sont internalisées davantage par les cellules cancéreuses 4T1 dans les deux cas ciblés et non ciblés.	109
Sphère Polyacrylamide, 1 - 6μ	Les particules rigides avaient un module d'Young 3 fois plus élevé	Les particules rigides sont internalisées davantage par macrophages .	110
Disques PLGA-PEG-lipides de 1000 nm de diamètres et 400 nm de hauteur.	Module de Young varie de 1.3 à 15 kPa	Approximativement deux à trois fois plus d'absorption des disques rigides dans la moelle osseuse et macrophages J774	111
Sphère hydrogel de DEA-HEMA, ~170 nm	Module de Young 18, 35, 136, and 211 kPa	Les particules de modules élastiques intermédiaires internalisées subissent l'absorption cellulaire la plus élevée dans les macrophages	112
PLGA – lipide et sphères PLGA – eau – lipide, ~ 40 nm	Les particules plus dures avaient un module de Young de	Les particules dures sont internalisées davantage par les cellules cancéreuses HeLa. Les particules rigides chargées en médicament présentaient une	113

	trois ordres de grandeur plus élevé	multiplication par deux de la cellule morte dans les cellules HeLa. Les particules rigides sont internalisées davantage dans les cellules HUVEC.	
Hydrogel sphérique HEMA, 900-1300 nm	16.7-155.7 kPa	Les particules plus molles sont internalisées plus rapidement et en plus grandes quantités dans les cellules cancéreuses Hep G2.	114
Sphères TA/PVPON, 2 µm	Molles : 4300 kPa Rigides : 10 <sup>7</sup> kPa	Les sphères molles sont internalisées davantage dans les cellules cancéreuses SUM159. Les particules molles sont internalisées davantage dans les cellules endothélial HMVEC.	115
Hydrogels HEA – PEG en forme de globules rouges, 5.2 à 5.9 µm	7.8–63.9 kPa	Une différence négligeable dans l'association de particules de différentes élasticités avec les cellules endothéliales HUVEC.	116

#### 4.2.2. Interaction in Vivo

Malgré le fait que les nanoparticules se sont avérées efficaces dans le traitement d'un certain nombre de maladies chez des modèles murins, il reste encore beaucoup à faire pour faciliter leur traduction clinique<sup>117–120</sup>. Des efforts importants sont concentrés sur la découverte de nouveaux critères de conception de nanoparticules afin d'améliorer le temps de circulation et contrôler la biodistribution des nanoparticules<sup>121–123</sup>. Ici, nous allons mettre en évidence comment l'élasticité des nanoparticules influe la circulation in vivo et le ciblage tissulaire. Différentes études qui montrent l'impact de l'élasticité sur les interactions in vivo ont été résumées dans le tableau ci-

dessous, avec un accent particulier sur le type de particules, leurs propriétés physiques et leurs performances in vivo en termes de circulation et / ou de ciblage tissulaire.

*Tableau 2 : l'élasticité des nanoparticules mesurée durant des interactions in vivo.*

Type de particules	Elasticité	Résultats in vivo	Reference
Hydrogels HEA – PEG en forme de globules rouges, 5.2 à 5.9 $\mu\text{m}$	7.8 – 63.9 kPa	Circulation plus longue des particules molles. Les particules plus dures étaient moins tolérées et s'accumulaient rapidement dans les poumons. Les particules plus molles étaient mieux tolérées et s'accumulaient dans le rate.	116
Nano-gels (carboxybetaine), 120 nm	180-1350 kPa	Circulation plus longue des particules molles	124
Sphères hydrogel PEG, ~200 nm	Molles : 10 kPa Rigides : 3000 kPa	Circulation plus longue des particules molles (jusqu'à 2h). Les particules plus molles ont montré une accumulation accrue dans le rein, cœur, poumons et cerveau à 30 min et dans les poumons à 12 h. Les particules plus molles avec des anticorps ciblant les poumons ont montré une accumulation dans la rate, le cœur, les poumons et le cerveau à 30 min	109

## 5. Méthodes expérimentales pour mesurer l'élasticité des liposomes

Au cours des trois dernières décennies, de nombreuses techniques ont été développées pour mesurer les modules d'élasticité des membranes lipidiques, en particulier le module de courbure  $k_c$ , basé sur deux types d'approches différentes : a) les fluctuations membranaires activées thermiquement sont mesurées en absence de contraintes appliquées ; b) la membrane est mécaniquement déformée (étirée ou pliée) et la déformation ou la force correspondante est mesurée. Toutes ces méthodes se ressemblent par le fait que l'analyse des données est basée sur le modèle de Helfrich décrit dans le paragraphe 2. Dans ce qui suit, Nous citons en revue ces différentes méthodes.

### 5.1. Spectroscopie scintillante à l'échelle optique

L'analyse des fluctuations thermiques d'une vésicule géante repose sur l'idée que la vésicule est un objet bidimensionnel qui conserve son volume et sa surface. Sous ces hypothèses, une formule peut être dérivée pour exprimer l'amplitude des fluctuations thermiques, comme expliqué dans les travaux de Faucon et al.<sup>125</sup>. La valeur quadratique moyenne dépend essentiellement de trois grandeurs : le module de courbure  $k_c$ , la tension superficielle de la membrane et la pression hydrostatique. Lorsque les fluctuations ne sont pas trop grandes seule la tension superficielle moyenne doit être connue pour dériver  $k_c$ .

Ces fluctuations sont corrélées au rayon de la vésicule<sup>125</sup>, qui peut être calculé à partir des coordonnées du contour de la vésicule. Ce dernier peut être obtenu directement à partir des images de microscopie optique (voir Figure 12), après numérisation.

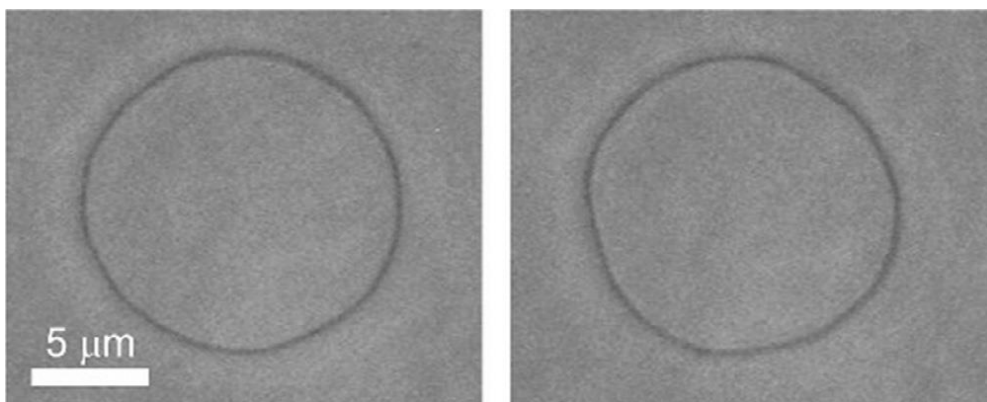


Figure 12: Deux images fournies par un microscope optique pour un GUV fluctuant thermiquement à des moments différents, obtenues en contrat thermique<sup>125</sup>.

La méthode de fluctuation de forme est avantageuse car elle n'est pas exigeante en termes de montage expérimental et ne nécessite pas l'ajout de molécules exogènes dans la membrane. Le principal inconvénient est que, puisque la membrane doit présenter des fluctuations bien visibles, elle ne peut pas être appliquée en cas de tensions superficielles élevées (par exemple, vésicules en phase gel)<sup>126</sup>. Aussi elle est envisagée pour des cellules géantes de quelques microns.

## 5.2. Diffusion des rayons X

La première utilisation de la diffusion des rayons X pour calculer le module de courbure de la membrane lipidique remonte à 1995<sup>127</sup>. Récemment, la technique a été affinée à cet effet par Lyatskaya et al.<sup>128</sup>. Dans la diffusion des rayons X, des piles de bicouches sont montées sur des substrats solides (généralement du verre, du mica ou du silicium) et orientées avec leurs normales alignées le long d'un axe. Ce qui est mesuré est l'intensité du faisceau de rayons X diffracté par ces bicouches par suite à leurs courbures. L'intensité du spectre de diffusion fournit le paramètre de Caillé<sup>129</sup>, la longueur de corrélation dans le plan<sup>130</sup>, et la longueur de pénétration de Gennes<sup>131</sup>. Ces paramètres sont reliés au module de courbure par des formules appropriées.

De grandes incertitudes peuvent survenir dans les mesures du module de courbure, ce qui nécessite une grande étude statistique.

### 5.3. Aspiration par micropipette

La technique d'aspiration par micropipettes est une méthode de manipulation mécanique introduite par Evans et Needham dans les années 1980 <sup>132</sup>. La configuration expérimentale comprend une grande vésicule et une pipette d'aspiration de petit calibre. La vésicule est d'abord légèrement dégonflée puis aspirée dans la pipette. Pendant le processus d'aspiration, le volume délimité par la membrane reste constant. Dans ces conditions, le changement de durée  $\Delta T$  de la projection de vésicule à l'intérieur de la pipette  $\Delta L$  (voir les flèches dans la Figure 13) est reliée à une expansion de surface projetée qui a deux contributions : une réduction des ondulations membranaires et une dilatation directe de la surface par molécule lipidique.

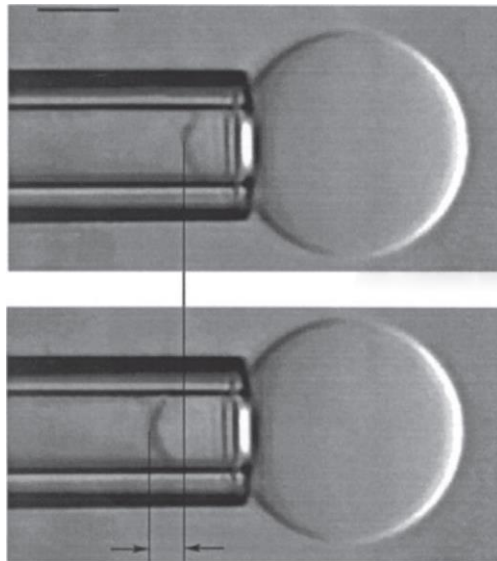


Figure 13. Micrographie d'un test d'expansion de la surface des vésicules.

La variation de la longueur de projection  $\Delta L$  est liée à la surface soustraite aux ondulations de la vésicule, et donc peut être utilisé pour calculer le module de courbure. Dans le régime de basse

tension d'aspiration, l'expansion de la surface totale de la vésicule est reliée à la tension membranaire via le module de courbure  $k_c$ .

Pour une plus grande précision dans la mesure de la longueur de la portion de la vésicule aspirée à l'intérieur de la pipette, l'utilisation des colorants fluorescents sera utile. Malheureusement, ces derniers comme la plupart des autres impuretés peuvent altérer les propriétés élastiques de la membrane. Un autre défaut enregistré pour cette technique découle de l'adhésion possible de la membrane à la pipette : théoriquement la membrane doit glisser librement le long des murs ; un enrobage approprié des parois de la pipette sera donc nécessaire. Enfin, des quantités importantes de sucres (saccharose ou glucose) sont généralement ajoutés aux vésicules pour maintenir un volume constant ; encore une fois, il est possible que de tels sucres affectent la rigidité de la membrane. En plus, cette méthode est limitée aux vésicules à l'échelle micrométrique.

## 5.4. Microscopie à force atomique

L'AFM est un type de microscopie à sonde à très haute résolution qui peut créer des micrographies en trois dimensions avec une résolution allant jusqu'aux échelles nanométriques. Elle permet aussi la détection des forces généralement comprises entre  $10^{-7}$  et  $10^{-12}$  N [34]. Le premier appareil AFM a été inventé par Binnig, Quate et Gerber en 1986<sup>133</sup>. Aujourd'hui, l'AFM est le type de SPM (scanning probe microscope) le plus largement utilisé en raison de la grande variété de combinaisons d'environnements (Air, vide, liquide) et de types d'échantillons (Semi-conducteur, organique, biologique) qu'elle peut traiter <sup>134-136</sup>. L'avantage du microscope AFM provient du fait que l'échantillon peut être étudié dans son état intrinsèque natif, ce qui reflète des valeurs réelles pour les propriétés mécaniques mesurées. Le principe de fonctionnement de cette technique et son usage dans la mesure de la rigidité sera explicitée en détail dans le chapitre 2. Plusieurs mesures en mode force spectroscopie, AFM ont permis de déterminer la rigidité et le module d'élasticité des liposomes <sup>10,137-139</sup>.

Au cours de cette thèse, toutes nos mesures expérimentales du module de courbure des liposomes ont été établies en se servant de la technique AFM. Le paragraphe 6 résume les méthodes de simulation numérique disponibles dans la littérature pour déterminer ce même paramètre, pour des membranes lipidiques.

## 6. Méthodes de simulations pour calculer le module de rigidité des membranes lipidiques

Le nombre de modèles disponibles aujourd'hui pour calculer théoriquement le module de courbure des membranes lipidiques augmente rapidement, avec de nombreux cas dans lesquels les anciennes approches sont légèrement raffinées. Cependant, les modèles les plus utilisés sont essentiellement quatre : l'analyse du spectre d'ondulation thermique<sup>140</sup>, méthode d'orientation de lipide<sup>141</sup>, analyse de la réponse au déformation<sup>142</sup>, et l'étirement d'un tube cylindrique<sup>143</sup>. Historiquement, la première méthode à être introduite est celle basée sur le spectre d'ondulation thermique<sup>140</sup>, par analogie avec le cas expérimental. C'est de loin la plus ancienne et la plus utilisée jusqu'à ce jour.

### 6.1. Spectre d'ondulation thermique

L'analyse du spectre d'ondulation a été introduite par Lindahl et Edholm en 2000 comme une méthode pour dériver le module de courbure par simulations<sup>140</sup>. Le point de départ de cette méthode est la théorie de Helfrich<sup>77</sup>, selon laquelle la bicouche est décrite comme une seule surface  $u(x, y)$ , représentée par :

$$u(x, y) = \frac{1}{2} (z_1(x, y) + z_2(x, y)), \text{ Equation 12}$$

où  $z_1(x, y)$  et  $z_2(x, y)$  sont les deux surfaces monocouches. L'analyse des fluctuations induites thermiquement est effectuée par une expansion de Fourier :



$$u(r) = \sum_q u(q) e^{iq \cdot r}, \text{ Equation 13}$$

Où  $r = (x, y)$  est un vecteur bidimensionnel d'espace réel et  $q = (q_x, q_y)$  est un vecteur à deux dimensions de l'espace réciproque. En utilisant le théorème d'équipartition, on peut montrer que le spectre de puissance des fluctuations (par unité de surface  $A$ ) suit la loi :

$$S(q) = \frac{\langle |u(q)|^2 \rangle}{A} = \frac{k_B T}{(k_c q^4 + \gamma q^2)}, \text{ Equation 14}$$

où  $k_c$  est le module de courbure,  $\gamma$  est la tension superficielle, et les crochets angulaires indiquent la moyenne sur les temps de simulation.

Ainsi, dans l'état sans tension ( $\gamma = 0$ ),  $S(q)$  doit être de l'ordre de  $q^{-4}$ , et devrait pouvoir être obtenu à partir d'un simple ajustement. Cependant, certaines limitations doivent être discutées. La première limitation concerne l'utilisation d'une boîte à frontière périodique, qui discrétise les valeurs de  $q$  et établit un seuil égal à  $q = 2\pi / L$ , où  $L$  est la longueur de la boîte. Cela limite le maximum de longueur d'onde observable. Une deuxième limite provient de la présence d'un seuil élevé dans la valeur de  $q$ , au-dessus duquel des écarts intenses dans le spectre par rapport à un comportement du type  $q^{-4}$  pourraient être observés. Ces écarts ont été initialement attribués aux inclinaisons des lipides<sup>144</sup>. Il a été suggéré qu'un faux comportement  $q^{-2}$  pourrait également être dû au filtrage de l'espace réel<sup>145</sup>. Dans les cas pratiques, si la petite taille de la boîte est conservée, des écarts par rapport au comportement  $q^{-4}$  apparaissent déjà à quelques valeurs faibles de  $q$ , ce qui ne laisse que quelques valeurs  $q$  disponibles pour l'ajustement de  $k_c$ . Comme alternative, des échelles de longueur relativement grandes devraient être utilisées dans les simulations (au moins quelques dizaines de nm), mais celles-ci sont coûteuses en terme computationnel. De plus, l'échantillonnage à grande échelle de modes d'ondulation nécessite relativement des simulations longues, car les temps de relaxation sont de l'ordre de la centaine de nanosecondes<sup>142</sup>. La combinaison d'une grande échelle de longueur et d'une longue échelle de temps rend l'analyse d'ondulation thermique très coûteuse en calcul.

## 6.2. Fluctuations des orientations lipidiques

En 2011, Watson et al.<sup>141</sup> ont commencé à analyser les propriétés mécaniques de bicouches lipidiques en prenant en considération tous les degrés de liberté internes des lipides. Leur énergie libre mécanique n'est donc plus l'équation simple de Helfrich, mais s'écrit comme une fonctionnelle de divers champs connectés avec des changements de forme et d'épaisseur de la membrane, ainsi que des changements de l'orientation lipidique. Le spectre correspondant des fluctuations s'écrit :

$$S(q) = \frac{k_B T}{2} \left( \frac{1}{k_c q^4} + \frac{1}{k_\theta q^2} + \frac{1}{k_\lambda + \gamma q^2} \right), \text{ Equation 15}$$

Où  $k_\lambda$  est le module d'élasticité de la saillie et  $k_\theta$  le module d'inclinaison. Le module de courbure  $k_c$ , avec les autres modules, a été dérivé par des ajustements multiples à tous les spectres de fluctuations extraits des simulations.

Un an plus tard, le même groupe a introduit une nouvelle approche pour extraire le module de courbure<sup>146</sup>, basée sur l'analyse d'un spectre unique, déterminé en définissant l'orientation des lipides. Cette approche repose sur des simulations identiques et des analyses similaires à celles utilisées dans le cas des ondulations thermiques. Cela nécessite la définition d'un vecteur  $\vec{n}$  représentant l'orientation de chaque lipide individuel. En effet, le choix du vecteur d'orientation n'est pas unique, mais il a été démontré que changer la définition d'un tel vecteur par lipide conduit à des résultats qui ne diffèrent pas de plus de 5%<sup>146</sup>. En utilisant une représentation de Fourier et le théorème d'équipartition, on peut démontrer que :

$$\langle |\vec{n}_q^{\parallel}|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c q^2}, \text{ Equation 16}$$

Où  $\vec{n}_q^{\parallel}$  est la composante longitudinale à  $q$  du vecteur  $\vec{m}$ , obtenu comme la différence entre l'orientation des paires de lipides. Ainsi, une simple relation relie directement les fluctuations de l'orientation lipidique à  $k_c$ . Dans leur lettre, Watson et al. ont montré dans quelques cas représentatifs que la théorie et la simulation sont en bon accord jusqu'aux longueurs d'onde courtes, plus courtes que dans le cas du spectre des ondulations.

### 6.3. Étirement d'un tube cylindrique

Une modélisation tout à fait différente des deux décrites ci-dessus est celle introduite par Harmandaris et Deserno en 2006 <sup>143</sup>. Une telle simulation nécessite une déformation de la membrane pour créer une attache (c'est-à-dire un tube cylindrique) et mesurer les forces pour maintenir le tube en place. Ce dernier est relié au module de courbure par une relation très simple. Dans les méthodes de simulation, une attache cylindrique peut être stabilisée par des conditions aux limites périodiques, c'est-à-dire faire un tube bicouche périodique infini. L'énergie de courbure, dans ce cas, est donnée par :

$$E = \frac{k_c}{2} \left(\frac{1}{R}\right)^2 2\pi RL_z = \frac{\pi k_c L_z}{R}, \text{ Equation 17}$$

Où  $L_z$  est la taille de la boîte dans la direction du cylindre infini, et  $R$  est le rayon du cylindre. Sous l'hypothèse que la surface totale de la membrane  $A = 2\pi RL_z$  reste fixe, la force axiale s'écrit :

$$F_z = (\delta E / \delta L_z)_A = \frac{2\pi k_c}{R}, \text{ Equation 18}$$

Étant donné que dans les méthodes de simulation,  $F_z$  peut être facilement obtenue à partir de la composante  $zz$  du tenseur des contraintes, le module de courbure peut être extrait de la simple relation dite d'état, présentée dans l'équation 17. Les fluctuations thermiques sont ici complètement négligées, car leur effet sur la force axiale est très faible, comme on peut en déduire par exemple à partir d'une simple onde plane pour les modes cylindriques <sup>143</sup>.

Cette méthode résout le problème des grandes échelles de temps (durée de la simulation est grande) présentes dans l'analyse du spectre d'ondulation, et a fait ses preuves pour de simples modèles lipidiques simulés dans des solvant implicites <sup>142,143</sup>. Malheureusement, cette méthode souffre également de certaines limitations techniques. Tout d'abord, le tube à membrane infini (périodique) divise la boîte de simulation en deux compartiments distincts, partie intérieure et partie extérieure, entraînant éventuellement une différence de pression qui doit être détendue. Deuxièmement, la surface par lipide diffère entre les deux feuillettes, et doit être équilibrée.

Puisque la basculation des molécules lipidiques est un événement très rare, l'équilibre du nombre de lipides dans les deux feuillettes seraient encombrant ou coûteux pour la plupart des modèles disponibles. Une solution possible consiste à introduire un trou (c'est-à-dire un pore toroïdal) dans le cylindre, permettant un équilibrage libre du nombre de lipides dans chaque feuillet. Un tel pore peut être généré, par exemple, en utilisant une limite de champ potentiel moyen, telle que celle mise en œuvre par Risselada et al.<sup>147</sup>, effort qui n'est pas simple. Compte tenu de tout cela, malgré sa simplicité, la méthode de l'étirement de l'attache n'a été utilisée que rarement<sup>148</sup>.

#### 6.4. Déformation de la membrane :

La théorie reliant la déformation de la membrane au module de courbure est élaborée en 2011 par Noguchi<sup>149</sup>, mais n'est devenue populaire qu'après que Deserno et ses collègues ont déterminé ses solutions analytiques et montré ses applications en 2013<sup>142</sup>. La méthode repose sur la relation entre la contrainte et la déformation dans les membranes courbées. Ces dernières peuvent être décrites comme des feuilles homogènes (Voir figure 14), exerçant des forces contre la boîte qui les contient, dans les directions  $x$  et  $y$  (rectangle). La forme est caractérisée par l'angle  $\psi(s)$  le long de l'arc  $s$ .

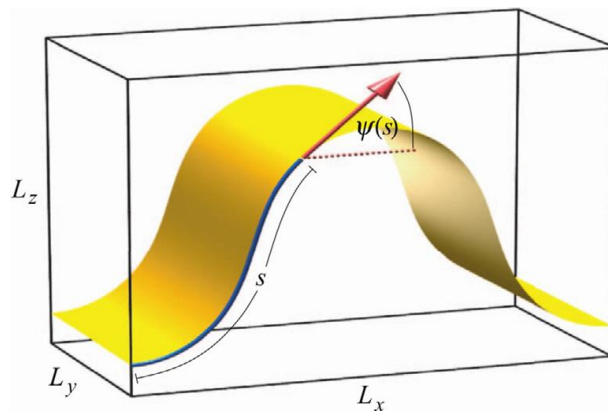


Figure 14: représentation de la membrane sous forme d'un feuillet élastique 2D dans sa boucle<sup>(142)</sup>.

La dérivation de la relation contrainte-déformation nécessite d'exprimer l'énergie de courbure en fonction de la forme de la feuille, paramétrée par l'angle  $\psi(s)$  (voir Figure 14). L'équation de l'énergie est :

$$E[\psi] = L_y \int_0^L ds \left( \frac{1}{2} k_c \psi^2 + f_x \left[ \cos \psi - \frac{Lx}{L} \right] \right), \text{ Equation 19}$$

Où  $L$  est la longueur totale du contour de la membrane et  $f_x$  un multiplicateur de Lagrange nécessaire pour fixer la longueur de la boîte dans la direction  $x$  à une valeur donnée de la surface membranaire globale. Après avoir défini la déformation comme  $\gamma = \frac{L - Lx}{L}$ , et après un long parcours mathématique, on constate que :

$$F_x(\gamma) = 4\pi^2 k_c \frac{L_y}{L^2} \sum_{i=0}^{\infty} b_i \gamma^i, \text{ Equation 20}$$

Où les  $b_i$  sont des coefficients numériques constants, donnés dans l'article d'origine. Cette équation permet le calcul de  $k_c$  par une procédure simple. La configuration bouclée peut être générée via des simulations utilisant le couplage anisotrope de pression, et avec une pression plus élevée dans la direction  $x$ . Une fois que la déformation souhaitée est atteinte (la membrane serait en forme bouclée, comme dans la figure 14), une simulation est démarrée en fixant la taille de la boîte dans les directions  $x$  et  $y$ . Ensuite, la force exercée par la membrane dans la direction  $x$  ( $F_x(\gamma)$ ) peut être immédiatement déduite de la composante  $xx$  du tenseur de pression, moyenné pendant la simulation. Ainsi, en utilisant l'équation 20, on obtient la valeur de  $k_c$ .

Comme dans le cas de la méthode d'étirement des attaches, la méthode de la déformation de la membrane est une approche d'un état fondamental et ne nécessite pas un échantillonnage des fluctuations coûteux en temps de simulation. Ce qui la donne un avantage par rapport aux analyses des spectres de fluctuation thermique. En fait, dans l'approche de la déformation de la membrane, les fluctuations thermiques ne sont qu'une correction de l'état fondamental. Cette correction a des effets négligeables sur la force le long de l'axe  $x$  <sup>142</sup>.

La méthode peut être appliquée à la fois aux systèmes atomiques et à gros grains, ne coûte pas en termes de calcul pour les champs de force de gros grain et semble donc très prometteur. Cependant, il faut faire attention que le flambage n'induit pas de transitions de phase, entraînant par exemple à la gélification de parties de la membrane. Une autre limitation concerne l'exigence

de membranes homogènes, c'est-à-dire l'absence de séparation de phase. Lors de la simulation des mélanges de lipides, la composition locale peut coupler avec la courbure locale, et peut conduire à de fortes inhomogénéités de composition, qui rendent la méthode non applicable. Nous remarquons que la même limitation est également valable pour tous autres calculs et méthodes expérimentales : lorsque la membrane contient des zones de composition chimique différente, l'hypothèse centrale de la membrane homogène comme une feuille élastique n'est plus valide, et la signification des forces, pressions, et autres mesures liées à l'élasticité de la membrane ne sont pas claires.

Dans notre étude, nous avons utilisé cette dernière méthode, pour le calcul du module de courbure des membranes lipidiques.

## **7. Élasticité de la membrane dans les systèmes à composition lipidique complexe**

Les membranes biologiques sont des systèmes à plusieurs composants constitués de mélanges de nombreux lipides et protéines. Etant donné que la composition des bicouches lipidiques affecte leurs propriétés physiques et leurs fonctions biologiques, cette composition varie d'un organisme à l'autre et même entre les organites dans la même cellule<sup>91</sup>. Des exemples typiques sont fournis par les membranes plasmiques des globules rouges et blancs qui sont si flexibles qu'elles peuvent se déplacer à travers des capillaires plutôt petits. Un exemple important des membranes mixtes sont les membranes contenant des phospholipides et du cholestérol. Un paramètre élastique important est la rigidité, qui décrit la résistance de la membrane à la flexion, et qui peut être obtenu à partir de plusieurs méthodes déjà citées. Dans la majorité des études sur la rigidité, le système étudié ne correspond pas aux membranes naturelles qui contiennent de nombreux types de lipides et de protéines. Dans le tableau suivant on cite les valeurs de la rigidité de différentes membranes lipidiques mixtes.

Tableau 3: La rigidité des membranes lipidiques mixtes avec leurs rapports molaires en terme de module d'Young, module de courbure, et module de compressibilité, avec les méthodes expérimentales et/ou de simulation utilisées.

Lipides	Rapport molaire	Température (K)	Rigidité en terme de $E$ (MPa), ou $k_c$ ( $k_B T$ ), ou $K_A$ (mN/m)	Méthode	Référence
DPPC + cholestérol	80 :20	298	$k_c = 140$	Fluctuations des surfaces	150
DOPC + cholestérol	90 :10	303	$k_c = 22.2$	Diffraction des rayon X	151
	80 :20		$k_c = 21.7$		
	70 :30		$k_c = 21.5$		
	60 :40		$k_c = 21.5$		
POPE :POPG	70 :30	298	$k_A = 193 \pm 19$	Fluctuations de la surface de la boite	152
POPC :POPS	70 :30	298	$k_A = 360 \pm 43$	Fluctuations de la surface de la boite	152

DMPC :POPC	75 :25	298	$k_A = 250 \pm 19$	Fluctuations de la surface de la boite	152
DOPC + cholestérol	90 :10	303	$k_A = 260 \pm 27$	Fluctuation de la surface de la boite	152
	80 :20		$k_A = 338 \pm 51$		
	70 :30		$k_A = 532 \pm 57$		
	60 :40		$k_A = 829 \pm 90$		
DOPC :DPPC :Chol	66:19:15	298	$k_c = 26 \pm 3$	Fluctuations des orientations des lipides	153
DOPC :DPPC :Chol	12:58:30	298	$k_c = 64 \pm 4$		
DOPC :DSPC :Chol	74:9:17	298	$k_c = 24 \pm 3$		
DOPC :DSPC :Chol	12:56:32	298	$k_c = 89 \pm 4$		
DOTAP :Chol	90 :10	298	$E = 25.3$	AFM	154
DPPC :Chol	50 :50	298	$E = 59.76$	AFM	154
EggPC :Chol	80 :20	298	$E = 10.77 \pm 0.64$	AFM	155
	50 :50	298	$E = 13.0 \pm 2.97$		



Comme le montre le Tableau 3, la rigidité des liposomes est un paramètre abordé actuellement pour déterminer la stabilité de ces derniers dans les différents milieux, et notamment lors de l'encapsulation de composés bioactifs.

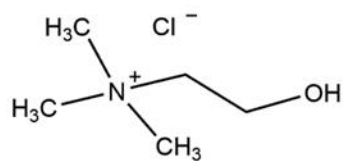
## 8. Solvant Eutectiques profonds

### 8.1. Définition

La recherche de solvants verts est l'une des principales activités de recherche dans le domaine de la chimie verte<sup>156</sup>. Les solvants eutectiques profonds (DES) ont été récemment décrits comme des solvants alternatifs potentiels pour les solvants organiques conventionnels et les liquides ioniques (IL)<sup>157,158</sup>. En fait, les DESs et les autres solvants partagent de nombreuses propriétés telles qu'une faible volatilité, et une haute stabilité<sup>159</sup>. Cependant, leur différence réside dans leur constitution et dans la source de leurs éléments de base. Certaines préoccupations sont liées à l'utilisation des solvants conventionnels et des IL, il s'agit de leurs exigences de synthèse, de purification, leur coût élevé et leur toxicité<sup>160</sup>. Ces limites sont surmontées par les DESs, qui sont bon marché et faciles à préparer à partir de nombreux éléments de base aisément disponibles.

D'abord signalé par Abbott et al<sup>158</sup>, le DES est défini comme un mélange de deux ou trois composants qui sont capables de s'associer entre eux par des interactions du type liaison hydrogène<sup>161</sup>. Les DESs sont obtenus en mélangeant un accepteur de liaison hydrogène (HBA) et un donneur de liaison hydrogène (HBD), à un rapport molaire approprié. La plupart des DESs sont préparés en ajoutant un sel d'ammonium quaternaire à des sucres, acides aminés ou alcools. La majorité des études portent sur des DESs à base de chlorure de choline (ChCl-DES). Approuvé comme additif nutritionnel chez toutes les espèces comme source efficace de choline, le chlorure de choline est non seulement bon marché, mais aussi non toxique et biodégradable<sup>162</sup>. Chlorure de choline: urée (ChCl:U), chlorure de choline:glycérol (ChCl:G), chlorure de choline:éthylène glycol (ChCl:EG) sont les mélanges eutectiques les plus étudiés (Figure 15).

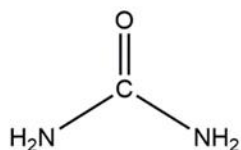
### Hydrogen Bond Acceptor



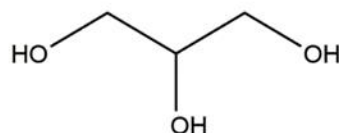
Choline chloride

---

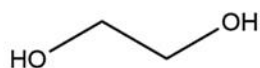
### Hydrogen Bond Donors



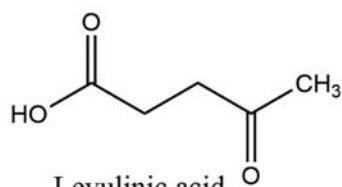
Urea



Glycerol



Ethylene glycol



Levulinic acid

Figure 15: Structures des constituants utilisés pour la synthèse du DES.

Les DESs ont été d'abord utilisés pour extraire les métabolites secondaires des plantes et dans le secteur pharmaceutique et l'industrie alimentaire. La liaison hydrogène est à la base du pouvoir dissolvant des DESs<sup>161</sup>. Les composés phénoliques ont été choisis parmi les produits naturels pour étudier les propriétés des DESs comme des solvants d'extraction. Dans le tableau ci-dessous, nous récupérons les produits naturels extraits récemment en se servant des DESs.

Tableau 4 : Application des DESs dans l'extraction des produits naturels.

DES (rapport molaire)	Source du produit naturel	Composé cible	Référence

Chlorure de choline _ acide citrique (1 :1)	Vanilla pod	Vanillin	163
Chlorure de choline_ glycérol (1:1)	Coque de Fagopyrum tataricum	Rutin	164
Chlorure de choline_ acide malique (1 :1)	Les lies de vin	Anthocyanines	165
Chlorure de choline_ acide oxalique (1:1)	Peau de raisin	phénolique	166
Chlorure de choline_ maltose (1 :2)	Cajanus cajan	phénolique	167

En outre, les DESs peuvent être considérés comme une troisième phase liquide (en dehors de l'eau et des lipides) dans les cellules, jouant des rôles physiologiques et chimiques importants<sup>157</sup>. Ces rôles pourraient inclure leur participation aux processus enzymatiques des cellules<sup>157,168</sup>. Des études récentes montrent l'utilisation des DESs en tant que milieux favorisant les interactions enzymatiques dans les plantes. Le Tableau 5 résume certaines applications des DESs en tant que milieux de réaction enzymatique.

*Tableau 5 : Application des DESs comme milieux dans les réactions enzymatiques.*

DES	Enzyme	substrat	Référence
Chlorure de choline _ glycérol	Subtilisine; a-chymotrypsine	Chitosan	169
Chlorure de choline _ urée	Candida antarctica lipase B	Laurate de vinyle	170
Chlorure de choline _glycérol	Candida antarctica lipase B	(1,2)-trans-2- Methylstyrene oxide	171
Chlorure de choline _ glycérol	Lipase	Huile de soja	169

La capacité de solubilisation des DESs n'a pas été limitée aux petites molécules organiques car les macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides qui sont généralement difficiles à dissoudre, ont également été testées. Lores et al.<sup>172</sup> ont étudié la solubilité du gluten dans différents DESs, et ont obtenu que le gluten était mieux solubilisé dans du fructose:acide citrique dilué alors que l'acide citrique pourrait prévenir l'oxydation du gluten. Mondal et al.<sup>173</sup> ont étudié l'extraction de l'ADN des testicules de saumon dans des DESs composés de chlorure de choline mélangé avec l'acide lévulinique, le glycérol, l'éthylène glycol, le sorbitol ou le résorcinol. Parmi les DESs testés, les combinaisons de chlorure de choline avec le glycérol ou l'éthylène glycol ont montré les meilleurs rendements d'extraction et une stabilité de l'ADN.

L'incorporation des DESs dans les différentes formulations comme un milieu solubilisant, constitué de composés naturels non solubles dans l'eau, a également été abordée dans la littérature. Comme mentionné ci-dessus, le fait que les composants constituant les DESs soient non toxiques et même comestibles, permet d'envisager leur utilisation dans des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Dans le Tableau 6, nous récupérons des études récentes sur des DESs qui répondent facilement aux exigences strictes de telles applications.

*Tableau 6 : utilisation des DESs dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques et agricoles.*

DES	Composés cibles	Applications	Référence
Proline _ urée	Berbérine	Solubilité et biodisponibilité accrues	174
Chlorure de choline_ acide malique	Extrait de peau de raisin	Antioxydant, antitumoral	175
Bétaine_glycérol_ glucose	Catéchine de l'extrait de thé vert	Antioxydant	176

Chlorure de choline_ acide tartrique _ eau (1 :1 :2)	Suppression du cadmium dans la farine de riz	Solvants de lavage	177
--	--	--------------------	-----

## 8.2. Organisation des phospholipides dans un DES.

L'assemblage des phospholipides a été étudié dans de nombreux solvants non aqueux mais polaires, tels que le glycérol et le formamide<sup>178-180</sup>. Peu d'études ont examiné le comportement des lipides dans les DESs. Elles ont toutes été présentées dans notre publication récente présentée dans le chapitre 6 de cette thèse<sup>181</sup>. Bryant et al. ont étudié le comportement de différents lipides constitués de phosphatidylcholine dans ChCl:U<sup>181</sup>. Des expériences de pénétration du solvant, couplées à la microscopie optique polarisante, ont montré que ce DES pénétrait dans les lipides, à température ambiante (23°C) et qu'une phase lamellaire non gonflante se formait. Au-delà d'une certaine température de pénétration, une phase lamellaire très gonflée et dispersible se formait, qui se transformait spontanément en vésicules quelques minutes plus tard. En outre, les températures de fusion de la chaîne ont augmenté avec la longueur de la chaîne alkyle, en présence du DES, ce qui est similaire au comportement approuvé dans l'eau. Après avoir démontré que les phospholipides s'auto-organisent en vésicules dans le ChCl:U, Bryant et al. ont testé leur comportement, dans différents DESs à base d'alkylammonium en utilisant le glycérol ou l'éthylène glycol. Les auteurs ont trouvé que la température minimale pour la formation de la phase lamellaire fluide dépend du type de cations et d'anions dans le DES, mais ne dépend pas vraiment du type de HBD (donneur des liaisons hydrogènes). Comme dans l'eau, la température de fusion ( $T_m$ ) dans le DES a augmenté avec la longueur de la chaîne alkyle lipidique. De plus, Gutierrez et al. ont démontré comment passer de la chimie aqueuse à la chimie du DES afin de préserver la structure membranaire des liposomes dans le DES (ChCl:U et ChCl:thiourea). Les liposomes préformés ont ensuite été mis en présence des solutions aqueuses des différents composants DESs. De même, des vésicules ont été observées par microscopie

confocale, les résultats montrent que les liposomes ont été incorporés dans les DESs et que leur structure membranaire a été maintenue stable dans ces solvants<sup>182</sup>.

Comme nous l'avons mentionné dans ce chapitre les liposomes EggPC sont des structures stables conçus dans plusieurs domaines. La mesure de leur élasticité joue un rôle essentiel pour déterminer leur comportement pharmacocinétique, que ça soit en absence ou en présence d'un principe actif. Des solvants verts sont proposés pour la dissolution des principes actifs dans lesquels ces liposomes semblent conserver leur stabilité. Nous avons montré comment l'élasticité/rigidité peut être mesurée soit expérimentalement et soit théoriquement, se basant sur des modèles divers en physique mécanique, L'AFM et la déformation de la membrane en MD ont été utilisés à cet effet. Ces méthodes seront décrites en détail dans le chapitre suivant.

## 9. Références

- (1) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13* (1), 238-277. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- (2) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Weissmann, G. The Action of Steroids and Streptolysin S on the Permeability of Phospholipid Structures to Cations. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13* (1), 253-278. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80094-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80094-8).
- (3) Bajoria, R.; Sooranna, S. R. Liposome as a Drug Carrier System: Prospects for Safer Prescribing during Pregnancy: A Review. *Placenta* **1998**, *19*, 265-287. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(98)80048-9).
- (4) Niu, Y.; Ke, D.; Yang, Q.; Wang, X.; Chen, Z.; An, X.; Shen, W. Temperature-Dependent Stability and DPPH Scavenging Activity of Liposomal Curcumin at PH 7.0. *Food Chemistry* **2012**, *135* (3), 1377-1382. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.018>.
- (5) Lasic, D. D. Novel Applications of Liposomes. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (7), 307-321. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01220-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01220-7).
- (6) Redziniak, G. [Liposomes and skin: past, present, future]. *Pathol. Biol.* **2003**, *51* (5), 279-281. [https://doi.org/10.1016/S0369-8114\(03\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0369-8114(03)00079-8).
- (7) Habib, L. Étude des propriétés membranaires des vésicules lipidiques incorporant des triterpènes oxygénés bioactifs d'origine végétale: application à la cucurbitacine E et à l'érythrodiol. 206.

- (8) Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2004**.
- (9) Rongen, H. A.; Bult, A.; van Bennekom, W. P. Liposomes and Immunoassays. *J. Immunol. Methods* **1997**, *204* (2), 105–133. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00041-0).
- (10) Azzi, J.; Jraij, A.; Auezova, L.; Fourmentin, S.; Greige-Gerges, H. Novel Findings for Quercetin Encapsulation and Preservation with Cyclodextrins, Liposomes, and Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposomes. *Food Hydrocolloids* **2018**, *81*, 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.006>.
- (11) Laouini, A.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Holdich, R. G.; Vladisavljević, G. T. Preparation of Liposomes: A Novel Application of Microengineered Membranes - Investigation of the Process Parameters and Application to the Encapsulation of Vitamin E. *RSC Adv.* **2013**, *3* (15), 4985–4994. <https://doi.org/10.1039/C3RA23411H>.
- (12) Fathi-Azarbayjani, A.; Ng, K. X.; Chan, Y. W.; Chan, S. Y. Lipid Vesicles for the Skin Delivery of Diclofenac: Cerosomes vs. Other Lipid Suspensions. *Adv Pharm Bull* **2015**, *5* (1), 25–33. <https://doi.org/10.5681/apb.2015.004>.
- (13) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**, *175* (4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- (14) Garg, G.; Saraf, S.; Saraf, S. Cubosomes: An Overview. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30* (2), 350–353. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.350>.
- (15) Simons, K.; Sampaio, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3* (10), a004697. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>.
- (16) J, B.; M, J.; F, T. Self-Assembled Lipid Superstructures: Beyond Vesicles and Liposomes. *Nano Lett* **2005**, *5* (8), 1615–1619. <https://doi.org/10.1021/nl050678i>.
- (17) Mouritsen, O. G. *Life - As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics*; The Frontiers Collection; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2005. <https://doi.org/10.1007/b138577>.
- (18) Ohshima, H. The Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) Theory of Colloid Stability. In *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012; pp 27–34. <https://doi.org/10.1002/9781118135440.ch3>.
- (19) Segota, S.; Tezak, D. Spontaneous Formation of Vesicles. *Adv Colloid Interface Sci* **2006**, *121* (1–3), 51–75. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.01.002>.
- (20) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1976**, *72* (0), 1525–1568. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- (21) Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. Procedure for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, *75* (9), 4194–4198.
- (22) D, D.; Ad, B. Large Volume Liposomes by an Ether Vaporization Method. *Biochim Biophys Acta* **1976**, *443* (3), 629–634. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90483-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90483-1).
- (23) Pick, U. Liposomes with a Large Trapping Capacity Prepared by Freezing and Thawing of Sonicated Phospholipid Mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *212* (1), 186–194. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90358-1).

- (24) Justo, O. R.; Moraes, Â. M. Economical Feasibility Evaluation of an Ethanol Injection Liposome Production Plant. *Chemical Engineering & Technology* **2010**, *33* (1), 15–20. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800502>.
- (25) Batzri, S.; Korn, E. D. Single Bilayer Liposomes Prepared without Sonication. *Biochim Biophys Acta* **1973**, *298* (4), 1015–1019. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90408-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90408-2).
- (26) Gharib, R.; Auezova, L.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposomes as a Carrier System for Volatile Essential Oil Components: Application to Anethole. *Food Chemistry* **2017**, *218*, 365–371.
- (27) Sebaaly, C.; Jraij, A.; Fessi, H.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Preparation and Characterization of Clove Essential Oil-Loaded Liposomes. *Food Chem* **2015**, *178*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.067>.
- (28) Sebaaly, C.; Greige-Gerges, H.; Stainmesse, S.; Fessi, H.; Charcosset, C. Effect of Composition, Hydrogenation of Phospholipids and Lyophilization on the Characteristics of Eugenol-Loaded Liposomes Prepared by Ethanol Injection Method. *Food Bioscience* **2016**, *15*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.04.005>.
- (29) Gregoriadis, G.; Ryman, B. E. Liposomes as Carriers of Enzymes or Drugs: A New Approach to the Treatment of Storage Diseases. *Biochem J* **1971**, *124* (5), 58P.
- (30) Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51* (4), 691–743.
- (31) Jones, M. N. Use of Liposomes to Deliver Bactericides to Bacterial Biofilms. *Meth. Enzymol.* **2005**, *391*, 211–228. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91013-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91013-6).
- (32) El-Badry, M.; Fetih, G.; Shakeel, F. Comparative Topical Delivery of Antifungal Drug Croconazole Using Liposome and Micro-Emulsion-Based Gel Formulations. *Drug Delivery* **2014**, *21* (1), 34–43. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.843610>.
- (33) Agrawal, A. K.; Harde, H.; Thanki, K.; Jain, S. Improved Stability and Antidiabetic Potential of Insulin Containing Folic Acid Functionalized Polymer Stabilized Multilayered Liposomes Following Oral Administration. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (1), 350–360. <https://doi.org/10.1021/bm401580k>.
- (34) Chaize, B.; Colletier, J.-P.; Winterhalter, M.; Fournier, D. Encapsulation of Enzymes in Liposomes: High Encapsulation Efficiency and Control of Substrate Permeability. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **2004**, *32* (1), 67–75. <https://doi.org/10.1081/bio-120028669>.
- (35) Monnard, P.-A.; Oberholzer, T.; Luisi, P. Entrapment of Nucleic Acids in Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1997**, *1329* (1), 39–50. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00066-7).
- (36) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- (37) Kraft, J. C.; Freeling, J. P.; Wang, Z.; Ho, R. J. Y. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci* **2014**, *103* (1), 29–52. <https://doi.org/10.1002/jps.23773>.
- (38) Watson, D. S.; Endsley, A. N.; Huang, L. Design Considerations for Liposomal Vaccines: Influence of Formulation Parameters on Antibody and Cell-Mediated Immune Responses



- to Liposome Associated Antigens. *Vaccine* **2012**, *30* (13), 2256–2272. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.070>.
- (39) Schwendener, R. A.; Ludewig, B.; Cerny, A.; Engler, O. Liposome-Based Vaccines. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *605*, 163–175. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_11).
- (40) Haensler, J. Liposomal Adjuvants: Preparation and Formulation with Antigens. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *626*, 73–90. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-585-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-585-9_6).
- (41) Kikuchi, H.; Suzuki, N.; Ebihara, K.; Morita, H.; Ishii, Y.; Kikuchi, A.; Sugaya, S.; Serikawa, T.; Tanaka, K. Gene Delivery Using Liposome Technology. *J Control Release* **1999**, *62* (1–2), 269–277. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00047-4](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00047-4).
- (42) Mezei, M.; Gulasekharan, V. Liposomes--a Selective Drug Delivery System for the Topical Route of Administration. Lotion Dosage Form. *Life Sci.* **1980**, *26* (18), 1473–1477. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(80\)90268-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90268-4).
- (43) Honeywell-Nguyen, P. L.; Bouwstra, J. A. Vesicles as a Tool for Transdermal and Dermal Delivery. *Drug Discov Today Technol* **2005**, *2* (1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.003>.
- (44) Honeywell-Nguyen, P. L.; Bouwstra, J. A. Vesicles as a Tool for Transdermal and Dermal Delivery. *Drug Discov Today Technol* **2005**, *2* (1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.003>.
- (45) Elsayed, M. M. A.; Abdallah, O. Y.; Naggar, V. F.; Khalafallah, N. M. Lipid Vesicles for Skin Delivery of Drugs: Reviewing Three Decades of Research. *Int J Pharm* **2007**, *332* (1–2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.005>.
- (46) Cevc, G. Lipid Vesicles and Other Colloids as Drug Carriers on the Skin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (5), 675–711. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.028>.
- (47) Hendriks, B. S.; Reynolds, J. G.; Klinz, S. G.; Geretti, E.; Lee, H.; Leonard, S. C.; Gaddy, D. F.; Espelin, C. W.; Nielsen, U. B.; Wickham, T. J. Multiscale Kinetic Modeling of Liposomal Doxorubicin Delivery Quantifies the Role of Tumor and Drug-Specific Parameters in Local Delivery to Tumors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* **2012**, *1* (11), e15. <https://doi.org/10.1038/psp.2012.16>.
- (48) Murrell, M. P.; Voituriez, R.; Joanny, J.-F.; Nassoy, P.; Sykes, C.; Gardel, M. L. Liposome Adhesion Generates Traction Stress. *Nature Physics* **2014**, *10* (2), 163–169. <https://doi.org/10.1038/nphys2855>.
- (49) Sabín, J.; Prieto, G.; Sarmiento, F. Studying Colloidal Aggregation Using Liposomes. In *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 2: Biological Membrane Models*; Weissig, V., Ed.; Methods in Molecular Biology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp 189–198. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-447-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-447-0_14).
- (50) M, Y.; Y, M.; Y, K.; K, F.; K, N. Glucose Oxidation Catalyzed by Liposomal Glucose Oxidase in the Presence of Catalase-Containing Liposomes. *Biotechnol Prog* **2006**, *22* (3), 704–709. <https://doi.org/10.1021/bp050416m>.
- (51) Steinberg-Yfrach, G.; Liddell, P. A.; Hung, S. C.; Moore, A.; Gust, D.; Moore, T. Conversion of Light Energy to Proton Potential in Liposomes by Artificial Photosynthetic Reaction Centres. *NATURE* **1997**, *385* (6613), 239–241. <https://doi.org/10.1038/385239a0>.
- (52) Fujita, S.; Matsumoto, R.; Ogawa, K.; Sakai, H.; Maesaka, A.; Tokita, Y.; Tsujimura, S.; Shirai, O.; Kano, K. Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose with Antibiotic Channel-

- Containing Liposomes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (8), 2650–2653. <https://doi.org/10.1039/C3CP43998D>.
- (53) Tanner, P.; Baumann, P.; Enea, R.; Onaca, O.; Palivan, C.; Meier, W. Polymeric Vesicles: From Drug Carriers to Nanoreactors and Artificial Organelles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 1039–1049. <https://doi.org/10.1021/ar200036k>.
- (54) Kazakov, S.; Kaholek, M.; Teraoka, I.; Levon, K. UV-Induced Gelation on Nanometer Scale Using Liposome Reactor. *Macromolecules* **2002**, *35* (5), 1911–1920. <https://doi.org/10.1021/ma011644+>.
- (55) Gregoriadis, G. Liposomes as Carriers of Enzymes and Proteins in Medicine. In *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*; Chang, T. M. S., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1977; pp 191–218. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2610-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2610-6_14).
- (56) Nakane, Y.; Ito, M. M.; Kubo, I. Novel Detection Method of Endocrine Disrupting Chemicals Utilizing Liposomes as Cell Membrane Model. *Analytical Letters* **2008**, *41* (16), 2923–2932. <https://doi.org/10.1080/00032710802440509>.
- (57) Taylor, T. M.; Weiss, J.; Davidson, P. M.; Bruce, B. D. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2005**, *45* (7–8), 587–605. <https://doi.org/10.1080/10408390591001135>.
- (58) Barani, H.; Montazer, M. A Review on Applications of Liposomes in Textile Processing. *Journal of Liposome Research* **2008**, *18* (3), 249–262. <https://doi.org/10.1080/08982100802354665>.
- (59) Lakhanpal, P.; Rai, D. K. Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL* **2007**, *2* (2). <https://doi.org/10.4314/ijmu.v2i2.39851>.
- (60) Jan, A. T.; Kamli, M. R.; Murtaza, I.; Singh, J. B.; Ali, A.; Haq, Q. M. R. Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits—An Overview. *Food Reviews International* **2010**, *26* (3), 302–317. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.484285>.
- (61) Boots, A. W.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A. Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* **2008**, *585* (2), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>.
- (62) Coelho-Dos-Reis, J. G. A.; Gomes, O. A.; Bortolini, D. E.; Martins, M. L.; Almeida, M. R.; Martins, C. S.; Carvalho, L. D.; Souza, J. G.; Vilela, J. M. C.; Andrade, M. S.; Barbosa-Stancioli, E. F. Evaluation of the Effects of Quercetin and Kaempferol on the Surface of MT-2 Cells Visualized by Atomic Force Microscopy. *J. Virol. Methods* **2011**, *174* (1–2), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.019>.
- (63) Zandi, K.; Teoh, B.-T.; Sam, S.-S.; Wong, P.-F.; Mustafa, M. R.; Abubakar, S. Antiviral Activity of Four Types of Bioflavonoid against Dengue Virus Type-2. *Virol. J.* **2011**, *8*, 560. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-560>.
- (64) Dajas, F. Life or Death: Neuroprotective and Anticancer Effects of Quercetin. *J Ethnopharmacol* **2012**, *143* (2), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.005>.
- (65) Gibellini, L.; Pinti, M.; Nasi, M.; Montagna, J. P.; De Biasi, S.; Roat, E.; Bertocelli, L.; Cooper, E. L.; Cossarizza, A. Quercetin and Cancer Chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**, *2011*, 591356. <https://doi.org/10.1093/ecam/nea053>.
- (66) S, A.; MI, T.; R, B.; L, M.; N, P.; C, B.; Fj, G. Quercetin Dietary Supplementation of Fattening Lambs at 0.2% Rate Reduces Discolouration and Microbial Growth in Meat during

- Refrigerated Storage. *Meat Sci* **2012**, *93* (2), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.08.023>.
- (67) Wu, D.; Kong, Y.; Han, C.; Chen, J.; Hu, L.; Jiang, H.; Shen, X. D-Alanine:D-Alanine Ligase as a New Target for the Flavonoids Quercetin and Apigenin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *32* (5), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.06.010>.
- (68) Lin, C.-F.; Leu, Y.-L.; Al-Suwayeh, S. A.; Ku, M.-C.; Hwang, T.-L.; Fang, J.-Y. Anti-Inflammatory Activity and Percutaneous Absorption of Quercetin and Its Polymethoxylated Compound and Glycosides: The Relationships to Chemical Structures. *Eur J Pharm Sci* **2012**, *47* (5), 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.024>.
- (69) De Souza, K. C. B.; Bassani, V. L.; Schapoval, E. E. S. Influence of Excipients and Technological Process on Anti-Inflammatory Activity of Quercetin and Achyrocline Satureioides (Lam.) D.C. Extracts by Oral Route. *Phytomedicine* **2007**, *14* (2–3), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.10.007>.
- (70) Nabavi, S. F.; Russo, G. L.; Daglia, M.; Nabavi, S. M. Role of Quercetin as an Alternative for Obesity Treatment: You Are What You Eat! *Food Chem* **2015**, *179*, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.006>.
- (71) Aditya, N. P.; Macedo, A. S.; Doktorovová, S.; Souto, E. B.; Kim, S.; Chang, P.-S.; Ko, S. Development and Evaluation of Lipid Nanocarriers for Quercetin Delivery: A Comparative Study of Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Nanostructured Lipid Carriers (NLC), and Lipid Nanoemulsions (LNE); 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.058>.
- (72) Cai, X.; Fang, Z.; Dou, J.; Yu, A.; Zhai, G. Bioavailability of Quercetin: Problems and Promises. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (20), 2572–2582. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990120>.
- (73) Aditya, N. P.; Macedo, A. S.; Doktorovová, S.; Souto, E. B.; Kim, S.; Chang, P.-S.; Ko, S. Development and Evaluation of Lipid Nanocarriers for Quercetin Delivery: A Comparative Study of Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Nanostructured Lipid Carriers (NLC), and Lipid Nanoemulsions (LNE). **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.058>.
- (74) Tamjidi, F.; Shahedi, M.; Varshosaz, J.; Nasirpour, A. Nanostructured Lipid Carriers (NLC): A Potential Delivery System for Bioactive Food Molecules. **2013**.
- (75) Hao, J.; Guo, B.; Yu, S.; Zhang, W.; Zhang, D.; Wang, J.; Wang, Y. Encapsulation of the Flavonoid Quercetin with Chitosan-Coated Nano-Liposomes. *LWT - Food Science and Technology* **2017**, *85*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.048>.
- (76) Toniazzo, T.; Peres, M. S.; Ramos, A. P.; Pinho, S. C. Encapsulation of Quercetin in Liposomes by Ethanol Injection and Physicochemical Characterization of Dispersions and Lyophilized Vesicles. *Food Bioscience* **2017**, *19*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.003>.
- (77) Helfrich, W. Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments. *Zeitschrift für Naturforschung C* **1973**, *28* (11–12), 693–703. <https://doi.org/10.1515/znc-1973-11-1209>.
- (78) *Theory of Elasticity*; Elsevier, 1986. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-25521-8>.
- (79) Evans, N. J. A Framework for Assisting Student Affairs Staff in Fostering Moral Development. *Journal of Counseling & Development* **1987**, *66* (4), 191–194. <https://doi.org/10.1002/j.1556-6676.1987.tb00845.x>.

- (80) Sackmann, E. Intra- and Extracellular Macromolecular Networks: Physics and Biological Function. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1994**, *195* (1), 7–28. <https://doi.org/10.1002/macp.1994.021950103>.
- (81) Canham, P. B. The Minimum Energy of Bending as a Possible Explanation of the Biconcave Shape of the Human Red Blood Cell. *Journal of Theoretical Biology* **1970**, *26* (1), 61–81. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(70\)80032-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(70)80032-7).
- (82) Girard, P.; Prost, J.; Bassereau, P. Passive or Active Fluctuations in Membranes Containing Proteins. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94* (8), 088102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.088102>.
- (83) Rawicz, W.; Olbrich, K. C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophys J* **2000**, *79* (1), 328–339.
- (84) Greenwood, J. A.; Tripp, J. H. The Elastic Contact of Rough Spheres. *J. Appl. Mech* **1967**, *34* (1), 153–159. <https://doi.org/10.1115/1.3607616>.
- (85) Johnson, K. L.; Kendall, K.; Roberts, A. D.; Tabor, D. Surface Energy and the Contact of Elastic Solids. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* **1971**, *324* (1558), 301–313. <https://doi.org/10.1098/rspa.1971.0141>.
- (86) Lin, D. C.; Dimitriadis, E. K.; Horkay, F. Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis—I. Non-Adhesive Indentation of Soft, Inhomogeneous Materials. *J Biomech Eng* **2007**, *129* (3), 430–440. <https://doi.org/10.1115/1.2720924>.
- (87) Pozrikidis, C. *Modeling and Simulation of Capsules and Biological Cells*; Chapman and Hall/CRC, 2003. <https://doi.org/10.1201/9780203503959>.
- (88) Timoshenko - Theory of plates and shells.Pdf.
- (89) Ugural-Stresses in Plates and Shells-Mcgraw-Hill (1981)[4916103].Pdf.
- (90) Shell Theory, Volume 29 - 1st Edition <https://www.elsevier.com/books/shell-theory/niordson/978-0-444-87640-9> (accessed Aug 4, 2020).
- (91) Lipowsky, R. Spontaneous Tubulation of Membranes and Vesicles Reveals Membrane Tension Generated by Spontaneous Curvature. *Faraday Discuss.* **2013**, *161* (0), 305–331. <https://doi.org/10.1039/C2FD20105D>.
- (92) Simmonds, J. G.; Tropic, C. G. The Fundamental (Normal Point Load) Solution for a Shallow Hyperbolic Paraboloidal Shell. *SIAM Journal on Applied Mathematics* **1974**, *27* (1), 102–120.
- (93) Reissner, E. Stresses and Small Displacements of Shallow Spherical Shells. I. *Journal of Mathematics and Physics* **1946**, *25* (1–4), 80–85. <https://doi.org/10.1002/sapm194625180>.
- (94) Fery, A.; Weinkamer, R. Mechanical Properties of Micro- and Nanocapsules: Single-Capsule Measurements. *Polymer* **2007**, *48* (25), 7221–7235. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.07.050>.
- (95) Bao, G.; Suresh, S. Cell and Molecular Mechanics of Biological Materials. *Nature Materials* **2003**, *2* (11), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nmat1001>.
- (96) Zhu, C.; Bao, G.; Wang, N. Cell Mechanics: Mechanical Response, Cell Adhesion, and Molecular Deformation. *Annu Rev Biomed Eng* **2000**, *2*, 189–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.2.1.189>.
- (97) Laurent, V. M.; Fodil, R.; Cañadas, P.; Féréol, S.; Louis, B.; Planus, E.; Isabey, D. Partitioning of Cortical and Deep Cytoskeleton Responses from Transient Magnetic Bead Twisting.

- Annals of Biomedical Engineering* **2003**, 31 (10), 1263–1278. <https://doi.org/10.1114/1.1616932>.
- (98) Vogel, V.; Sheetz, M. Local Force and Geometry Sensing Regulate Cell Functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, 7 (4), 265–275. <https://doi.org/10.1038/nrm1890>.
- (99) Bershadsky, A.; Kozlov, M.; Geiger, B. Adhesion-Mediated Mechanosensitivity: A Time to Experiment, and a Time to Theorize. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, 18 (5), 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.012>.
- (100) Rotsch, C.; Radmacher, M. Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophys J* **2000**, 78 (1), 520–535.
- (101) Martens, J. C.; Radmacher, M. Softening of the Actin Cytoskeleton by Inhibition of Myosin II. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **2008**, 456 (1), 95–100. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0419-8>.
- (102) Levayer, R.; Lecuit, T. Biomechanical Regulation of Contractility: Spatial Control and Dynamics. *Trends Cell Biol.* **2012**, 22 (2), 61–81. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.10.001>.
- (103) Prost, J.; Jülicher, F.; Joanny, J.-F. Active Gel Physics. *Nature Physics* **2015**, 11 (2), 111–117. <https://doi.org/10.1038/nphys3224>.
- (104) Moeendarbary, E.; Harris, A. R. Cell Mechanics: Principles, Practices, and Prospects. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2014**, 6 (5), 371–388. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1275>.
- (105) Se, C.; Ys, J.; J, T.; R, W.; J, R.; Jk, G. AFM-Based Analysis of Human Metastatic Cancer Cells. *Nanotechnology* **2008**, 19 (38), 384003–384003. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/38/384003>.
- (106) Rother, J.; Nöding, H.; Mey, I.; Janshoff, A. Atomic Force Microscopy-Based Microrheology Reveals Significant Differences in the Viscoelastic Response between Malign and Benign Cell Lines. *Open Biol* **2014**, 4 (5). <https://doi.org/10.1098/rsob.140046>.
- (107) Kim, J.; Lee, H.; Shin, S. Advances in the Measurement of Red Blood Cell Deformability: A Brief Review. *Journal of Cellular Biotechnology* **2015**, 1 (1), 63–79. <https://doi.org/10.3233/JCB-15007>.
- (108) Wiley, J. S.; Cooper, R. A. Inhibition of Cation Cotransport by Cholesterol Enrichment of Human Red Cell Membranes. *Biochim Biophys Acta* **1975**, 413 (3), 425–431. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(75\)90125-x](https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90125-x).
- (109) Anselmo, A. C.; Zhang, M.; Kumar, S.; Vogus, D. R.; Menegatti, S.; Helgeson, M. E.; Mitragotri, S. Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting. *ACS Nano* **2015**, 9 (3), 3169–3177. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00147>.
- (110) Beningo, K. A.; Wang, Y.-L. Fc-Receptor-Mediated Phagocytosis Is Regulated by Mechanical Properties of the Target. 9.
- (111) Key, J.; Palange, A. L.; Gentile, F.; Aryal, S.; Stigliano, C.; Di Mascolo, D.; De Rosa, E.; Cho, M.; Lee, Y.; Singh, J.; Decuzzi, P. Soft Discoidal Polymeric Nanoconstructs Resist Macrophage Uptake and Enhance Vascular Targeting in Tumors. *ACS Nano* **2015**, 9 (12), 11628–11641. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b04866>.

- (112) Banquy, X.; Suarez, F.; Argaw, A.; Rabanel, J.-M.; Grutter, P.; Bouchard, J.-F.; Hildgen, P.; Giasson, S. Effect of Mechanical Properties of Hydrogel Nanoparticles on Macrophage Cell Uptake. *Soft Matter* **2009**, *5* (20), 3984–3991. <https://doi.org/10.1039/B821583A>.
- (113) Sun, J.; Zhang, L.; Wang, J.; Feng, Q.; Liu, D.; Yin, Q.; Xu, D.; Wei, Y.; Ding, B.; Shi, X.; Jiang, X. Tunable Rigidity of (Polymeric Core)–(Lipid Shell) Nanoparticles for Regulated Cellular Uptake. *Advanced Materials* **2015**, *27* (8), 1402–1407. <https://doi.org/10.1002/adma.201404788>.
- (114) Liu, W.; Zhou, X.; Mao, Z.; Yu, D.; Wang, B.; Gao, C. Uptake of Hydrogel Particles with Different Stiffness and Its Influence on HepG2 Cell Functions. *Soft Matter* **2012**, *8* (35), 9235–9245. <https://doi.org/10.1039/C2SM26001H>.
- (115) Alexander, J. F.; Kozlovskaya, V.; Chen, J.; Kunczewicz, T.; Kharlampieva, E.; Godin, B. Cubical Shape Enhances the Interaction of Layer-by-Layer Polymeric Particles with Breast Cancer Cells. *Adv Healthc Mater* **2015**, *4* (17), 2657–2666. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500537>.
- (116) Merkel, T. J.; Jones, S. W.; Herlihy, K. P.; Kersey, F. R.; Shields, A. R.; Napier, M.; Luft, J. C.; Wu, H.; Zamboni, W. C.; Wang, A. Z.; Bear, J. E.; DeSimone, J. M. Using Mechanobiological Mimicry of Red Blood Cells to Extend Circulation Times of Hydrogel Microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (2), 586–591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010013108>.
- (117) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. An Overview of Clinical and Commercial Impact of Drug Delivery Systems. *J Control Release* **2014**, *190*, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.053>.
- (118) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. *AAPS J* **2015**, *17* (5), 1041–1054. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9780-2>.
- (119) Mitragotri, S.; Burke, P. A.; Langer, R. Overcoming the Challenges in Administering Biopharmaceuticals: Formulation and Delivery Strategies. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13* (9), 655–672. <https://doi.org/10.1038/nrd4363>.
- (120) Mitragotri, S.; Anderson, D. G.; Chen, X.; Chow, E. K.; Ho, D.; Kabanov, A. V.; Karp, J. M.; Kataoka, K.; Mirkin, C. A.; Petrosko, S. H.; Shi, J.; Stevens, M. M.; Sun, S.; Teoh, S.; Venkatraman, S. S.; Xia, Y.; Wang, S.; Gu, Z.; Xu, C. Accelerating the Translation of Nanomaterials in Biomedicine. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 6644–6654. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03569>.
- (121) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- (122) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5* (4), 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>.
- (123) Li, S.-D.; Huang, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- (124) Zhang, L.; Cao, Z.; Li, Y.; Ella-Menye, J.-R.; Bai, T.; Jiang, S. Softer Zwitterionic Nanogels for Longer Circulation and Lower Splenic Accumulation. *ACS Nano* **2012**, *6* (8), 6681–6686. <https://doi.org/10.1021/nn301159a>.
- (125) Faucon, J. F.; Mitov, M. D.; Méléard, P.; Bivas, I.; Bothorel, P. Bending Elasticity and Thermal Fluctuations of Lipid Membranes. Theoretical and Experimental Requirements.

- Journal de Physique* **1989**, *50* (17), 2389–2414.  
<https://doi.org/10.1051/jphys:0198900500170238900>.
- (126) Dimova, R. Recent Developments in the Field of Bending Rigidity Measurements on Membranes. *Adv Colloid Interface Sci* **2014**, *208*, 225–234.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.003>.
- (127) Lei, N.; Safinya, C. R.; Bruinsma, R. F. Discrete Harmonic Model for Stacked Membranes: Theory and Experiment. *J. Phys. II France* **1995**, *5* (8), 1155–1163.  
<https://doi.org/10.1051/jp2:1995174>.
- (128) Lyatskaya, Y.; Liu, Y.; Tristram-Nagle, S.; Katsaras, J.; Nagle, J. F. Method for Obtaining Structure and Interactions from Oriented Lipid Bilayers. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **2001**, *63* (1 Pt 1), 011907. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.63.011907>.
- (129) Caille, A. Physique cristalline: remarques sur la diffusion des rayons X dans les smectiques /paper/Physique-cristalline%3A-remarques-sur-la-diffusion-X-Caille/d9888dbbb09e95f4bdb81baaa5434642a8923e55 (accessed Oct 16, 2020).
- (130) Lipowsky, R.; Sackmann, E.; Hoff, A. J. Structure and Dynamics of Membranes I. from Cells to Vesicles. *Handbook of Biological Physics* **1995**, *1*.
- (131) Lavrentovich, O. D. The Physics of Liquid Crystals, Second Edition, by PG de Gennes and J Prost, International Series of Monographs on Physics No 83, Published OUP (1993) ISBN 0 19852024 7. *Liquid Crystals Today* **1994**, *4* (3), 7–7.  
<https://doi.org/10.1080/13583149408628646>.
- (132) Evans, Evan.; Needham, David. Physical Properties of Surfactant Bilayer Membranes: Thermal Transitions, Elasticity, Rigidity, Cohesion and Colloidal Interactions. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91* (16), 4219–4228. <https://doi.org/10.1021/j100300a003>.
- (133) Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, Ch.; Weibel, E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49* (1), 57–61.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.49.57>.
- (134) Boonaert, C. J. P.; Toniazzo, V.; Mustin, C.; Dufrière, Y. F.; Rouxhet, P. G. Deformation of Lactococcus Lactis Surface in Atomic Force Microscopy Study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, *23* (2), 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00250-8](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00250-8).
- (135) Orisaka, S.; Minobe, T.; Uchihashi, T.; Sugawara, Y.; Morita, S. The Atomic Resolution Imaging of Metallic Ag(111) Surface by Noncontact Atomic Force Microscope. *Applied Surface Science* **1999**, *140* (3), 243–246. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(98\)00534-0](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(98)00534-0).
- (136) Continuous microscopy of ceramic materials with atomic force microscopy (Journal Article) | ETDEWEB <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/257846> (accessed Aug 4, 2020).
- (137) 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* (1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.042>.
- (138) Park, J.-W. Effect of Aminoglycoside on Mechanical Properties of Zwitterionic Phospholipid Vesicles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2011**, *88*, 517–520.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.046>.

- (139) Takechi-Haraya, Y.; Sakai-Kato, K.; Abe, Y.; Kawanishi, T.; Okuda, H.; Goda, Y. Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. *Langmuir* **2016**, *32* (24), 6074–6082. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741>.
- (140) Lindahl, E.; Edholm, O. Mesoscopic Undulations and Thickness Fluctuations in Lipid Bilayers from Molecular Dynamics Simulations. *Biophys J* **2000**, *79* (1), 426–433.
- (141) Watson, M. C.; Penev, E. S.; Welch, P. M.; Brown, F. L. H. Thermal Fluctuations in Shape, Thickness, and Molecular Orientation in Lipid Bilayers. *J Chem Phys* **2011**, *135* (24), 244701. <https://doi.org/10.1063/1.3660673>.
- (142) Hu, M. (胡明暘); Diggins, P.; Deserno, M. Determining the Bending Modulus of a Lipid Membrane by Simulating Buckling. *J. Chem. Phys.* **2013**, *138* (21), 214110. <https://doi.org/10.1063/1.4808077>.
- (143) Harmandaris, V. A.; Deserno, M. A Novel Method for Measuring the Bending Rigidity of Model Lipid Membranes by Simulating Tethers. *J Chem Phys* **2006**, *125* (20), 204905. <https://doi.org/10.1063/1.2372761>.
- (144) May, E. R.; Narang, A.; Kopelevich, D. I. Role of Molecular Tilt in Thermal Fluctuations of Lipid Membranes. *Phys. Rev. E* **2007**, *76* (2), 021913. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.76.021913>.
- (145) Brandt, E. G.; Braun, A. R.; Sachs, J. N.; Nagle, J. F.; Edholm, O. Interpretation of Fluctuation Spectra in Lipid Bilayer Simulations. *Biophys J* **2011**, *100* (9), 2104–2111. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.010>.
- (146) Watson, M. C.; Brandt, E. G.; Welch, P. M.; Brown, F. L. H. Determining Biomembrane Bending Rigidities from Simulations of Modest Size. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109* (2), 028102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.028102>.
- (147) Risselada, H. J.; Mark, A. E.; Marrink, S. J. Application of Mean Field Boundary Potentials in Simulations of Lipid Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (25), 7438–7447. <https://doi.org/10.1021/jp0758519>.
- (148) Baoukina, S.; Monticelli, L.; Risselada, H. J.; Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. The Molecular Mechanism of Lipid Monolayer Collapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105* (31), 10803–10808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711563105>.
- (149) Noguchi, H. Anisotropic Surface Tension of Buckled Fluid Membranes. *Phys. Rev. E* **2011**, *83* (6), 061919. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.83.061919>.
- (150) Doktorova, M.; Harries, D.; Khelashvili, G. Determination of Bending Rigidity and Tilt Modulus of Lipid Membranes from Real-Space Fluctuation Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (25), 16806–16818. <https://doi.org/10.1039/C7CP01921A>.
- (151) Gracià, R. S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R. L.; Lipowsky, R.; Dimova, R. Effect of Cholesterol on the Rigidity of Saturated and Unsaturated Membranes: Fluctuation and Electrodeformation Analysis of Giant Vesicles. *Soft Matter* **2010**, *6* (7), 1472–1482. <https://doi.org/10.1039/B920629A>.
- (152) Pan, J.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Effect of Cholesterol on Structural and Mechanical Properties of Membranes Depends on Lipid Chain Saturation. *Phys. Rev. E* **2009**, *80* (2), 021931. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.021931>.



- (153) Khelashvili, G.; Kollmitzer, B.; Heftberger, P.; Pabst, G.; Harries, D. Calculating the Bending Modulus for Multicomponent Lipid Membranes in Different Thermodynamic Phases. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9* (9), 3866–3871. <https://doi.org/10.1021/ct400492e>.
- (154) Takechi-Haraya, Y.; Sakai-Kato, K.; Abe, Y.; Kawanishi, T.; Okuda, H.; Goda, Y. Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. *Langmuir* **2016**, *32* (24), 6074–6082. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741>.
- (155) Liang, X.; Mao, G.; Simon Ng, K. Y. Probing Small Unilamellar EggPC Vesicles on Mica Surface by Atomic Force Microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2004**, *34* (1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.017>.
- (156) Teles, A. R. R.; Capela, E. V.; Carmo, R. S.; Coutinho, J. A. P.; Silvestre, A. J. D.; Freire, M. G. Solvatochromic Parameters of Deep Eutectic Solvents Formed by Ammonium-Based Salts and Carboxylic Acids. *Fluid Phase Equilib* **2017**, *448*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.04.020>.
- (157) Choi, Y. H.; Spronsen, J. van; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiology* **2011**, *156* (4), 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>.
- (158) Abbott, A. P.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K.; Tambyrajah, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride/Urea Mixtures. *Chem. Commun.* **2003**, No. 1, 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>.
- (159) Florindo, C.; Oliveira, F. S.; Rebelo, L. P. N.; Fernandes, A. M.; Marrucho, I. M. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2014**, *2* (10), 2416–2425. <https://doi.org/10.1021/sc500439w>.
- (160) Zainal-Abidin, M. H.; Hayyan, M.; Hayyan, A.; Jayakumar, N. S. New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds Using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Anal Chim Acta* **2017**, *979*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.012>.
- (161) Zhang, Q.; Vigier, K. D. O.; Royer, S.; Jérôme, F. Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>.
- (162) Scientific Opinion on Safety and Efficacy of Choline Chloride as a Feed Additive for All Animal Species. *EFSA Journal* **2011**, *9* (9), 2353. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2353>.
- (163) Bakirtzi, C.; Triantafyllidou, K.; Makris, D. P. Novel Lactic Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents: Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Common Native Greek Medicinal Plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2016**, *3* (3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003>.
- (164) Huang, Y.; Feng, F.; Jiang, J.; Qiao, Y.; Wu, T.; Voglmeir, J.; Chen, Z.-G. Green and Efficient Extraction of Rutin from Tartary Buckwheat Hull by Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Food Chemistry* **2017**, *221*, 1400–1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>.
- (165) Bosiljkov, T.; Dujmić, F.; Cvjetko Bubalo, M.; Hribar, J.; Vidrih, R.; Brnčić, M.; Zlatic, E.; Radojčić Redovniković, I.; Jokić, S. Natural Deep Eutectic Solvents and Ultrasound-

- Assisted Extraction: Green Approaches for Extraction of Wine Lees Anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing* **2017**, *102*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.005>.
- (166) Cvjetko Bubalo, M.; Ćurko, N.; Tomašević, M.; Kovačević Ganić, K.; Radojčić Redovniković, I. Green Extraction of Grape Skin Phenolics by Using Deep Eutectic Solvents. *Food Chemistry* **2016**, *200*, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>.
- (167) Wei, Z.; Qi, X.; Li, T.; Luo, M.; Wang, W.; Zu, Y.; Fu, Y. Application of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction and Determination of Phenolics in Cajanus Cajan Leaves by Ultra Performance Liquid Chromatography. *Separation and Purification Technology* **2015**, *149*, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.05.015>.
- (168) Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *766*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- (169) Zhao, H.; Baker, G. A.; Holmes, S. Protease Activation in Glycerol-Based Deep Eutectic Solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *72* (3), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.015>.
- (170) Durand, E.; Lecomte, J.; Baréa, B.; Piombo, G.; Dubreucq, E.; Villeneuve, P. Evaluation of Deep Eutectic Solvents as New Media for *Candida Antarctica B* Lipase Catalyzed Reactions. *Process Biochemistry* **2012**, *47* (12), 2081–2089. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027>.
- (171) Lindberg, D.; de la Fuente Revenga, M.; Widersten, M. Deep Eutectic Solvents (DESs) Are Viable Cosolvents for Enzyme-Catalyzed Epoxide Hydrolysis. *Journal of Biotechnology* **2010**, *147* (3), 169–171. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.04.011>.
- (172) Lores, H.; Romero, V.; Costas, I.; Bendicho, C.; Lavilla, I. Natural Deep Eutectic Solvents in Combination with Ultrasonic Energy as a Green Approach for Solubilisation of Proteins: Application to Gluten Determination by Immunoassay. *Talanta* **2017**, *162*, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.078>.
- (173) Mondal, D.; Sharma, M.; Mukesh, C.; Gupta, V.; Prasad, K. Improved Solubility of DNA in Recyclable and Reusable Bio-Based Deep Eutectic Solvents with Long-Term Structural and Chemical Stability. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (83), 9606–9608. <https://doi.org/10.1039/C3CC45849K>.
- (174) Sut, S.; Faggian, M.; Baldan, V.; Poloniato, G.; Castagliuolo, I.; Grabnar, I.; Perissutti, B.; Brun, P.; Maggi, F.; Voinovich, D.; Peron, G.; Dall'Acqua, S. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) to Enhance Berberine Absorption: An In Vivo Pharmacokinetic Study. *Molecules* **2017**, *22* (11). <https://doi.org/10.3390/molecules22111921>.
- (175) Radošević, K.; Ćurko, N.; Gaurina Srček, V.; Cvjetko Bubalo, M.; Tomašević, M.; Kovačević Ganić, K.; Radojčić Redovniković, I. Natural Deep Eutectic Solvents as Beneficial Extractants for Enhancement of Plant Extracts Bioactivity. *LWT* **2016**, *73*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>.
- (176) Jeong, K. M.; Ko, J.; Zhao, J.; Jin, Y.; Yoo, D. E.; Han, S. Y.; Lee, J. Multi-Functioning Deep Eutectic Solvents as Extraction and Storage Media for Bioactive Natural Products That Are Readily Applicable to Cosmetic Products. *Journal of Cleaner Production* **2017**, *151*, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>.

- (177) Huang, Y.; Feng, F.; Chen, Z.-G.; Wu, T.; Wang, Z.-H. Green and Efficient Removal of Cadmium from Rice Flour Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Food Chemistry* **2018**, *244*, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.060>.
- (178) Habib, L.; Jraij, A.; Khreich, N.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Effect of Erythrodiol, A Natural Pentacyclic Triterpene from Olive Oil, on the Lipid Membrane Properties. *J Membr Biol* **2015**, *248* (6), 1079–1087. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9821-x>.
- (179) Jass, J.; Tjärnhage, T.; Puu, G. From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophys J* **2000**, *79* (6), 3153–3163.
- (180) Reviakine, I.; Brisson, A. Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2000**, *16* (4), 1806–1815. <https://doi.org/10.1021/la9903043>.
- (181) Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophys J* **2003**, *85* (5), 3035–3047.
- (182) Charrier, A.; Thibaudau, F. Main Phase Transitions in Supported Lipid Single-Bilayer. *Biophysical Journal* **2005**, *89* (2), 1094–1101. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062463>.

# Chapitre 2 : Méthodes

Dans ce chapitre nous allons décrire de façon détaillée les différentes méthodes utilisées au cours de cette thèse.

La microscopie à force atomique a été utilisée pour étudier la stabilité et la rigidité des liposomes dans différentes conditions expérimentales. Nous nous attarderons en particulier sur la description de cette technique qui a été exploitée en deux modes lors de cette étude.

Nous introduisons aussi les bases de calcul en dynamique moléculaire, les potentiels d'interactions dans les champs de force en général. Nous décrivons spécifiquement le champ de force de MARTINI utilisé pour paramétrer les interactions entre les molécules de lipides. Nous montrons les équations numériques utilisées dans les deux méthodes de la déformation de la membrane et des fluctuations de la surface avec des champs de forces de MARTINI ou tout atome, dans le but de calculer le module d'élasticité des membranes lipidiques ayant différentes constitutions.

## 1. Microscopie de force atomique (AFM en anglais)

### 1.1. Définition et avantage

Parmi les instruments à sonde locale, le microscope à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscope*) est le plus répandu. Il permet d'accéder rapidement avec une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre, à une grande variété de surfaces (mécaniques, électriques, magnétiques, biologiques, etc.). Il est modulable et peut fonctionner à l'air libre, dans le vide ou en milieu liquide avec une préparation peu contraignante de l'échantillon, presque dans son état naturel. L'AFM est utilisé dans de nombreux domaines tels que la physique, la chimie, la micro-informatique ou la biologie<sup>1-4</sup>. Il est présent à nos jours dans les laboratoires de recherche en

nanosciences, ainsi que dans l'industrie comme outil de contrôle de production. Dans la suite, nous allons détailler le principe de fonctionnement de l'AFM, et surtout le mode contact utilisé dans notre étude pour la visualisation des liposomes, et le mode force spectroscopie qui est utilisé pour quantifier la rigidité des liposomes.

## 1.2. Éléments principaux du microscope AFM

### 1.2.1. La Sonde

La sonde AFM est l'élément central du microscope, ses propriétés physico-chimiques intrinsèques influent le caractère local de la mesure ainsi que la nature et la portée des interactions sondées qui donnent l'image d'une surface. La sonde est constituée d'un micro levier muni d'une pointe (Figure 1-a).

Un micro levier d'AFM est constitué d'un support et d'un levier sur lequel est fixée la pointe. Les micro leviers utilisés en AFM sont généralement en silicium ou en nitrure de silicium suivant l'application à laquelle ils sont destinés. Typiquement les micro leviers ont une longueur comprise entre 100  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$ . Ils sont assimilables à des ressorts oscillants (Figure 1-c) caractérisés par des constantes de raideur  $k$  et des fréquences propres. Il est commun qu'un levier plus long soit destiné à des oscillations plus grandes.

La raideur  $k$  d'un micro levier rectangulaire peut aller de quelques centièmes à quelques dizaines de N/m, elle peut être exprimée par la relation :

$$k = \frac{wEe^3}{4l^3}, \quad \text{Equation 21}$$

Où  $E$  est le module d'Young du matériau,  $w$  sa largeur,  $l$  la longueur et  $e$  l'épaisseur du micro levier.

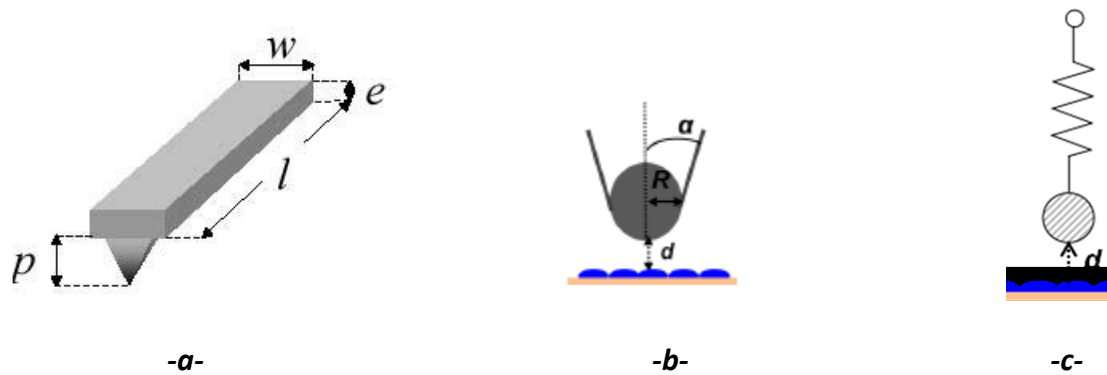


Figure 16: Bruker AFM Probes. Description schématique d'un micro levier qui porte une pointe (a), simulation de la pointe AFM par un cône circulaire (b), Modélisation de la pointe et du levier AFM par un ressort (c).

La pointe est modélisée par un cône caractérisé par un apex ayant un rayon  $R$  et un angle d'ouverture  $\alpha$  compris entre  $10^\circ$  et  $45^\circ$  (Figure 1-b). Il est possible d'estimer grossièrement les deux paramètres  $\alpha$  et  $R$  de la pointe soit par la microscopie électronique, soit in situ en AFM en utilisant des échantillons de calibration (dépôts de billes, nanostructures présentant des marches, etc. ...) <sup>5,6</sup>. La nature et les propriétés envisagées de l'échantillon, nous permettent de sélectionner la forme de la pointe à utiliser (conique ou pyramidale, fine ou large).

Comme nous l'avons vu, le système micro levier-pointe, ou aussi la sonde AFM, peut-être assimilée, à l'air, à un système masse-ressort (Figure 1-c). La déflexion verticale  $d$  du levier lié à l'interaction de la pointe avec la surface de l'échantillon permet de mesurer la force d'interaction pointe-surface,  $F$ , selon la loi de Hooke :

$$F = k \cdot d, \quad \text{Equation 22}$$

Il est utile de noter au lecteur le suivant : Cette force peut être repérée pour chaque point de la surface au cours du balayage, dans le cas de l'imagerie AFM, ou en un point fixe en fonction de la distance pointe-surface, dans le cas de l'enregistrement des courbes de forces. Les détails sont inclus dans la partie 1.6.

### 1.2.2. Système de détection

Le système de détection est composé d'une diode laser, d'un miroir et d'une cellule photoélectrique, appelée « photodétecteur quatre quadrants » (formé de quatre photodiodes). Le photodétecteur permet de définir avec précision la position et l'intensité du spot lumineux réfléchi au bout du micro levier. Les quatre quadrants A, B, C et D permettent de mesurer les déviations verticales (déflexions) et latérales (torsions) du micro levier, qui sont déduites de l'expression des valeurs des signaux  $(A+B)-(C+D)$  et  $(A+C)-(B+D)$  respectivement (Figure 2).

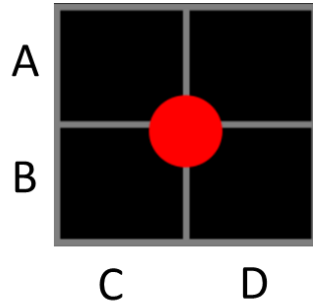


Figure 17: Représentation schématique du photodétecteur à quatre quadrants (A, B, C, D).

Au début de chaque imagerie, le spot lumineux est réglé exactement au centre du quadrant comme l'indique la Figure 2. Ce spot n'est autre que la réflexion du laser sur la face supérieure du micro levier, qui à son tour se déplace selon les interactions pointe-surface. Durant le balayage les déviations du spot par rapport au centre sont transmises à la cellule photoélectrique, pour former l'image de l'échantillon.

### 1.2.3. Scanner et céramique piézoélectrique

Dans le but de contrôler les déplacements de la pointe au-dessus de l'échantillon, des céramiques piézoélectriques sont utilisées. L'effet piézo-électrique est relié à un déplacement du barycentre des charges dans un cristal à maille non centro-symétrique. Une force extérieure appliquée sur un matériau piézoélectrique change l'orientation des dipôles dans la cellule élémentaire et déforme la différence de potentiel dans le cristal : les propriétés élastiques et diélectriques sont

couplées. A l'inverse, une différence de potentiel appliquée au cristal provoque une déformation et donc un déplacement de celui-ci. C'est cette dernière propriété qui est utilisée dans les techniques de sondes locales.

La réponse des céramiques n'est pas linéaire, elle présente une hystérésis liée à des effets de polarisation cristalline et à des frictions moléculaires. Pour limiter cette distorsion, la plupart des systèmes commerciaux récents incluent des capteurs de position qui corrigent en temps réel la réponse des céramiques. Selon les systèmes, les céramiques piézoélectriques peuvent être sur la pointe, sous la surface où on met l'échantillon, ou sur les deux, en tube ou en tripode.

#### 1.2.4. Boucle de contre réaction

Si la pointe balaye l'échantillon sans précautions particulières, elle risque de se détériorer avec la surface imagée, normalement rugueuse. Pour éviter le dommage des pointes à chaque usage, une boucle de rétroaction est appliquée pour permettre de rapprocher ou d'éloigner la pointe dans la direction perpendiculaire à la surface, soit le piézo dans la direction « z ». Le signal maintenu constant par la boucle de rétroaction, dépend du mode d'utilisation de l'AFM. En balayant la surface, on enregistre ainsi le déplacement des céramiques qui permettent de maintenir la déflexion constante : c'est le « signal de la hauteur ». Cette boucle de contre-réaction sur le déplacement vertical du piézo différencie la résolution verticale de la résolution spatiale x et y. Dans les techniques de champ proche, c'est dans la direction verticale « z » que la résolution est la meilleure.

La boucle de contre-réaction comprend généralement un système de sécurité « **PID** » (Proportionnel, Intégral, Dérivé). Il compare le signal mesuré à celui de la consigne choisie et utilise la différence trouvée qu'il va :

- Multiplier par une constante « **P** » : le gain proportionnel.
- Intégrer par rapport au temps, puis multiplier par une constante « **I** » : le gain intégral.
- Dériver par rapport au temps puis multiplier par une constante « **D** » : le gain différentiel.



La somme de ces trois signaux est amplifiée pour ajuster le déplacement du piézo et sa position.

Pour simplifier, la valeur du gain proportionnel définit l'ampleur de la réponse du système, le gain intégral évite l'écart entre la valeur de consigne et la valeur mesurée, et le gain différentiel permet de jouer sur la stabilité de la boucle de contre-réaction.

L'ordre de grandeur de ces gains dépend de chaque système, seules leurs valeurs relatives sont prises en considération, elles sont décisives pour la qualité de la mesure. La réponse la plus forte possible serait tentante pour un système très réactif. Cependant, cela provoquerait des instabilités de la boucle ou des sur-oscillations qui peuvent endommager fortement la sonde, la surface ou les deux. Les industries établissent des valeurs par défaut qui sont adaptées à la plupart des applications courantes. Certains systèmes AFM proposent des optimisations automatiques. Dans le cas d'un système manuel, le réglage des gains peut s'effectuer en augmentant progressivement la valeur de **P** jusqu'à déclencher des oscillations du signal, puis la réduire jusqu'à leurs disparitions. Il faut faire de même pour les autres gains **I** et **D**.

### **1.3. Modes d'utilisation de l'AFM**

L'AFM est un outil de balayage des surfaces à l'aide d'une pointe. Une ou plusieurs céramiques piézo-électriques permettent le déplacement de la pointe par rapport à l'échantillon dans l'une ou les trois directions de l'espace. Il existe plusieurs modes d'utilisation en AFM, qui, en plus d'accéder à la topographie de la surface, permettent de sonder ses propriétés mécaniques. Les 3 principaux modes sont : le mode « contact », le mode contact intermittent (dit « *tapping* ») ainsi que le mode « non contact ». Nous allons nous focaliser essentiellement sur le mode « contact » que nous avons utilisé pour l'étude de nos échantillons.

## 1.4. Mode « contact »

### 1.4.1. Principe de fonctionnement

Le principe général du mode contact est de balayer une surface par une pointe en contact direct avec elle. Nous avons utilisé ce mode pour étudier la morphologie et la stabilité des liposomes EggPC adsorbés sur une surface mica. Le montage expérimental de l'AFM est schématisé dans la Figure 3.

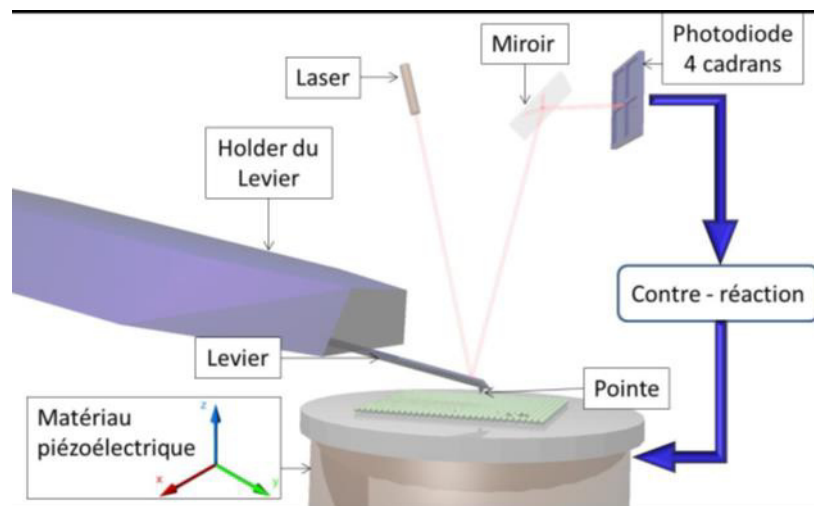


Figure 18: Composants et fonctionnement du montage expérimental d'un microscope AFM.

Dans la tête du microscope qui constitue la partie principale de l'AFM, la pointe se trouve sur l'extrémité libre d'un levier, l'autre partie est fixée sur un holder pour faciliter son utilisation. En l'absence de champ externe, la pointe, étant à une distance  $d$  de l'ordre de quelques angströms, est sensible aux forces de courte et de longue portée qui dépendent des propriétés physico-chimiques aussi bien du micro levier que de l'échantillon (en vert dans la Figure 3). Les forces de courte portée, comme leur nom l'indique, sont mesurées pour des distances de quelques angströms et sont essentiellement des forces répulsives. Les forces de longue portée, quant à elles, sont des forces capillaires, électrostatiques, magnétiques et de van der Waals. A noter que selon la distance  $d$ , distance entre le sommet de la pointe et la surface supérieure de

l'échantillon, que la nature de ces interactions change. Les interactions entre la pointe et la surface entraînent des changements de courbure dans le micro levier. Pour suivre ces changements, on utilise le plus souvent une détection optique : un faisceau laser est envoyé sur l'extrémité libre du levier qui reflète celui-ci, pour éclairer l'assemblage de photodiodes en quatre cadrans décrit dans le paragraphe 1.2.2. Ces photodiodes permettent la conversion des photons du laser en différence de potentiel. Si on observe une variation de la différence de potentiel entre les photodiodes du haut et du bas, un déplacement vertical (déflexion) du levier est enregistré, et une variation de la différence de potentiel entre les photodiodes de droite et de gauche indique une torsion du levier. Enfin, le système de contre-réaction, décrite dans le paragraphe 1.2.4, permet de contrôler les déplacements selon la direction  $z$  perpendiculaire à la surface, afin de garder le système en état de sécurité.

Ainsi, les variations des forces suivant le point considéré de coordonnées  $(x, y)$  sur la surface de l'échantillon et/ou l'hétérogénéité (du point de vue mécanique, chimique, électrique...) permettent de reconstituer des images. Il existe différents régimes opératoires d'imagerie en mode « contact » : le mode « contact » à déflexion constante et le mode « contact » à hauteur constante.

**Le mode « contact » à déflexion constante :** Lors du balayage de la surface, la déflexion du ressort est maintenue constante grâce à la boucle d'asservissement. La pointe suit une trajectoire d'isoforces. Ainsi lorsqu'un obstacle apparaît sur la surface, la boucle de régulation commande le déplacement du tube piézoélectrique dans la direction  $z$ . La valeur de ce déplacement correspond exactement à la distance qui doit être appliquée pour garder la flexion du ressort constante. Les images ainsi formées donnent des informations sur la topographie des surfaces.

**Le mode « contact » à hauteur constante :** Ce mode de fonctionnement est caractérisé par la mesure directe des variations de flexion du ressort. A partir de ces mesures, il est possible de déterminer les forces qu'exerce la surface sur la pointe à l'aide de l'équation de Hooke indiquée dans l'équation 2. Grâce à la boucle d'asservissement, la hauteur maximale du micro levier est maintenue constante pendant que l'échantillon est déplacé en  $x, y, et z$ . Le contraste dans les images observées reflète les variations des forces d'interaction pointe-surface.

Dans ce travail, nous avons réalisé les mesures dans le mode « contact » à déflexion constante.

### 1.4.2. Frottement ou friction en mode contact :

Lors du balayage de la surface de l'échantillon en mode « contact », il est possible de sonder les propriétés nano tribologiques de la surface en mesurant la force de frottement agissant sur la pointe. Cette force  $F_f$  est fonction de deux autres forces  $P$  et  $F_{adh}$  :

-  $P$  la force normale appliquée par la pointe sur l'échantillon ;

-  $F_{adh}$  la force d'adhésion de la surface, lorsque les analyses sont réalisées à l'air.

La mesure de la force de friction  $F_f$ , induite par la déflexion ou torsion du levier, permet de remonter à l'anisotropie de frottement détectée dans la surface sondée.

En microscopie AFM, le système levier-pointe peut balayer la surface suivant l'axe de symétrie du levier ou perpendiculairement à l'axe de symétrie du levier. Ces deux types de balayage sont respectivement appelés balayage en déflexion (qui fait intervenir la constante de raideur verticale du levier  $k$ ) ou en torsion (qui fait intervenir la constante de raideur transversale du levier  $k_t$ ), (Figure 4). Les forces de friction  $F_f$  ainsi mesurées induisent une déflexion verticale additionnelle  $\Delta z$  telle que :

dans le cas de la déflexion  $F_f = k \cdot \Delta z$  Equation 23

et dans le cas de la torsion  $F_f = k_t \cdot \Delta z$  Equation 24

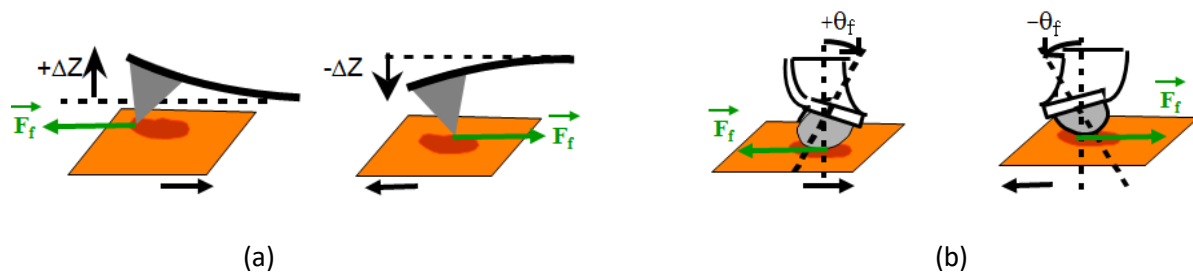


Figure 19: Représentation schématique de la déviation supplémentaire produite par le frottement : (a) déflexion verticale du levier et (b) déviation angulaire du levier.

### 1.4.3. Images en mode « contact »

Trois images peuvent être enregistrées lors d'une imagerie AFM, en mode « contact » conseillé pour des surfaces de faible rugosité.

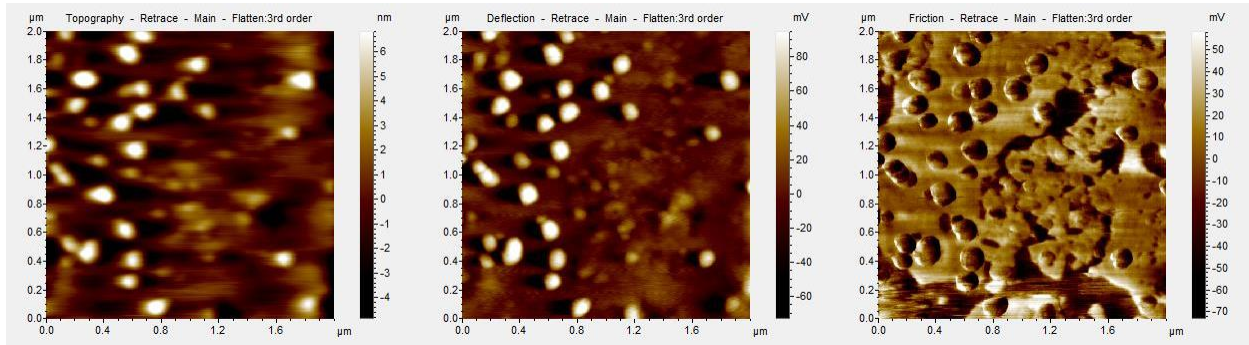


Figure 20: Exemple des figures en mode contact (Topographie, déflexion et friction) pour des liposomes E80 adsorbés sur un mica.

Comme des signaux verticaux, latéraux et de frottement peuvent être détectés simultanément, au cours d'un balayage de la surface d'un échantillon par une pointe AFM, l'imagerie en mode contact, et dans tous les modes, donne pour chaque signal trois images respectives présentées dans la Figure 5. Chacune parmi les trois images reflète la surface réelle de l'échantillon. La première image dite « topography » représente le contraste de hauteur de la surface de l'échantillon. Elle provient de la variation de la déflexion verticale. Les zones claires de l'image de hauteur (voir l'échelle de la hauteur en nm à droite de l'image topographie dans la Figure 5) correspondent aux points d'altitudes les plus élevées. L'image de déflexion ou d'erreur provient de la déviation du spot lumineux dans la direction haut et bas. Alors que l'image de friction est intégrée aux forces appliquées par la pointe, l'adhésion de la surface et les forces de friction. L'image de friction est reliée, alors, à la déviation du spot lumineux dans la direction gauche ou droite. Le contraste observé sur l'image est lié à l'hétérogénéité des propriétés tribologiques de la surface de l'échantillon.

## 1.5. Les forces d'interaction en AFM

Comme nous venons de le mentionner, l'AFM est basée sur la mesure des forces ( $F$ ) ou gradients de force ( $dF/dz$ ) qui apparaissent entre la pointe et la surface étudiée,  $z$  étant la direction perpendiculaire à la surface de l'échantillon. Les forces entrant en jeu lors de l'approche de la pointe vers la surface sont nombreuses et dépendent du type de la pointe, de la nature de la surface sondée mais aussi du milieu dans lequel la mesure est réalisée (sous vide, à l'air, en milieu liquide). La Figure 6 résume les forces qui peuvent apparaître lorsqu'une pointe à l'air libre approche vers la surface d'un échantillon :

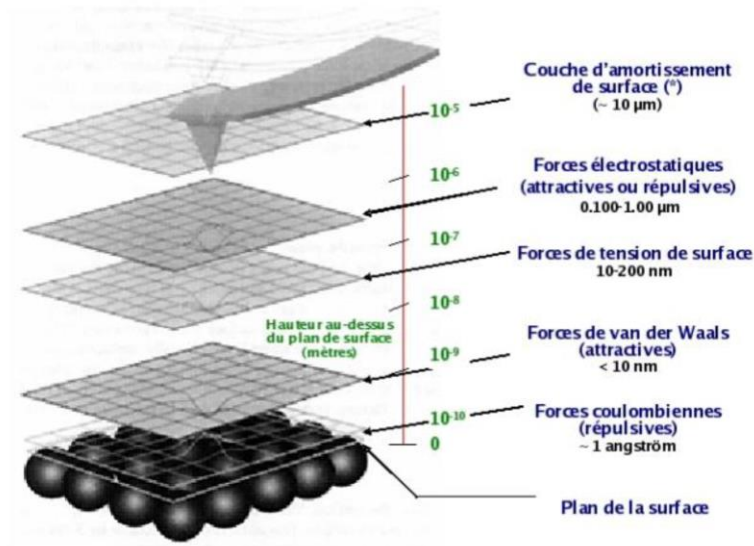


Figure 21: Nature des forces rencontrées par la pointe AFM au cours d'un engagement à l'air ambiant <sup>7</sup>.

Les forces répulsives à courte portée s'établissent pour des distances très faibles ( $d \sim 1 \text{ \AA}$  tout au plus) et sont liées à la répulsion coulombienne positive et à l'impossibilité de l'interpénétration des orbitales électroniques (principe d'exclusion de Pauli).

Les forces de van der Waals sont des forces attractives négatives distinguées selon leur origine. Trois interactions dipolaires différentes sont communes :

- l'interaction entre dipôles permanents de la pointe et la surface (force d'orientation de Keesom) résultent du fait que les barycentres des charges positives et négatives d'une molécule ne coïncident pas.

- l'interaction dipôle permanent-dipôle induit (force de Debye). Le dipôle induit résulte de la déformation du nuage électronique en présence d'un champ électrique.

- l'interaction dipôle induit-dipôle induit (force de dispersion de London) qui correspond à la polarisation instantanée créée par les fluctuations de la densité électronique autour du noyau.

En AFM, il convient de considérer l'interaction entre surfaces et non pas entre atomes ou molécules ; il faut donc sommer l'ensemble de ces contributions. Les forces de van der Waals, principalement mesurées en AFM, agissent sur des distances  $d$  comprises entre 1 et 100 Å et sont suffisamment fortes pour provoquer une déflexion du micro levier AFM. Des modèles de potentiels d'interaction sont disponibles pour décrire les différentes géométries des surfaces en interaction (sphère-sphère, sphère-plan, pyramide-sphère, cône-sphère ...) <sup>8,9</sup>.

La tension de surface de l'ordre de  $10^{-7} N$  est une conséquence de la présence d'une couche fluide, contaminant la surface de l'échantillon (couche de vapeur d'eau condensée par exemple). Dépendant de la quantité de vapeur d'eau présente sur l'échantillon, la tension de surface agit entre 10 et 200 nm au-dessus de la surface.

Les forces électrostatiques découlent des propriétés électriques de la surface et du matériau étudiés. Elles peuvent être attractives ou répulsives suivant le signe des charges mises en jeu. L'intensité de la force électrostatique entre deux charges électriques ponctuelles est proportionnelle au produit des deux charges et est inversement proportionnelle au carré de la distance entre les deux charges. Pour une distance pointe-échantillon de l'ordre de 0.5 nm, la force électrostatique est de l'ordre de 2.5 nN et demeure importante même à longue portée.

Finalement, les forces capillaires (couche d'amortissement) sont liées à la condensation de l'humidité de l'air d'un milieu expérimental ambiant. Un ménisque peut ainsi se former au voisinage de la pointe par mouillage. Ce ménisque entraîne la présence d'une force attractive

entre la pointe et la surface. Outre le taux d'humidité environnant, les forces capillaires dépendent également du rayon de courbure de la pointe et de la partie hydrophile l'échantillon.

## 1.6. Spectroscopie de force, courbes de force

### 1.6.1. Interprétation générale de la courbe de force

Sur la Figure 7 est présentée une courbe de force caractéristique d'une surface dure (surface de mica pure). La courbe de force est obtenue en enregistrant les déflexions verticales du levier en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique, dans la direction z, en un seul point fixé de la surface mica.

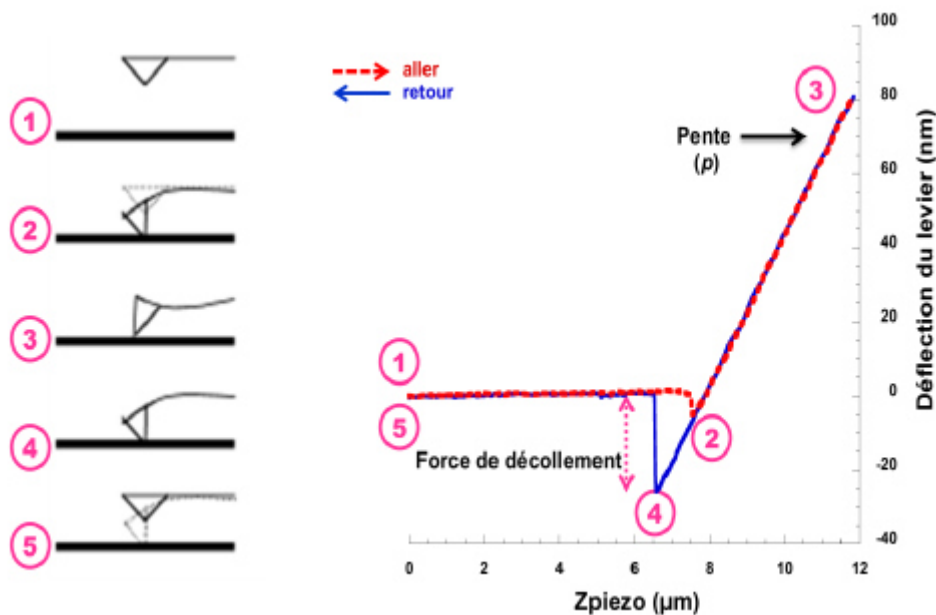


Figure 22: Comportement de la pointe au contact d'une surface de mica et courbe de force aller-retour expérimentale correspondante.

Une courbe de force s'effectue en deux temps : d'abord l'approche de la sonde vers la surface (courbe « aller » ou « approche ») puis le retrait de la surface (courbe « retour » ou « retrait »).

**Courbe « aller » ou « approche »** : loin de la surface, la sonde ne « sent » pas les forces, la déflexion du levier est nulle (point 1 sur la Figure 7). En s'approchant de la surface, la pointe se



trouve sous l'effet des forces attractives, rentre brusquement en contact avec la surface de l'échantillon : la déflexion est négative (2). Parfois, dans le cas de leviers raides, cette déflexion (saut sur la courbe de force) n'est pas détectable. Lorsque la distance  $d$  pointe-surface de l'échantillon devient très petite ( $d \approx 2\text{\AA}$ ), les forces attractives deviennent maximales et induisent une inversion du sens de la déviation du micro levier : la déflexion devient positive et croît linéairement avec le déplacement vertical du piézo (3).

**Courbe « retour » ou « retrait »** : la déflexion décroît linéairement jusqu'à atteindre le point de déflexion nulle et devient négative du fait des forces d'adhésion et de la raideur finie du levier. Sous l'effet des forces répulsives, l'échantillon se retire, entraînant avec lui la pointe grâce à la force d'adhésion (4). Enfin lorsque l'adhésion est maximale, la force élastique du levier (liée à la déflexion de celui-ci) emporte la force d'adhésion, la pointe se décolle alors de la surface (« *pull off point* ») pour revenir à sa position d'équilibre (5), c'est-à-dire sa position sans interaction.

### 1.6.2. Traitement de la courbe de force dans le cas d'une surface molle ou rigide

Lorsque la pointe attachée au levier entre en contact avec une surface balayée, le système (levier + échantillon) est assimilé à deux ressorts en série ( $\frac{1}{k_{\text{système}}} = \frac{1}{k_{\text{ech}}} + \frac{1}{k}$  pour des élongations additives), voir Figure 8.

Pour une surface molle, la rigidité du levier (sa raideur  $k$ ) est très grande devant celle de la surface ( $k \gg k_{\text{ech}}$ ), et la déformation élastique du système est celle de l'échantillon. Dans ce cas, on parle d'une indentation de la pointe dans la surface de l'échantillon. La Figure 8 montre une modélisation de l'indentation d'une surface molle.

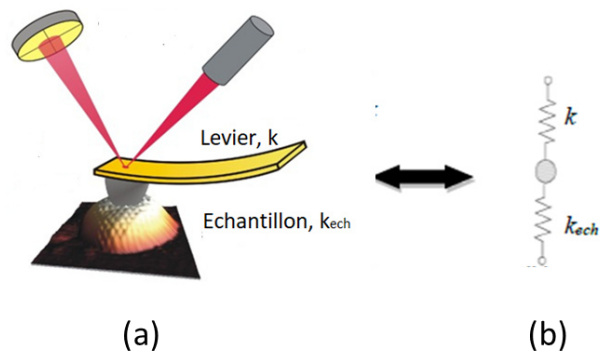


Figure 23: Contact pointe-surface élastique (a). Simulation d'un contact par un système de deux ressorts en série (b).

La raideur du levier étant connue et la calibration est effectuée à chaque mesure, il est possible d'estimer à partir de la pente  $p$  de la courbe de force (partie 2-3 sur la Figure 7) la raideur de l'échantillon  $k_{ech}$ . En assimilant l'ensemble pointe-surface à un système de ressorts en série, la pente  $p$  de la courbe de force est liée à la raideur de l'échantillon par la relation<sup>10,11</sup>:

$$p = \frac{1}{1 + \frac{k}{k_{ech}}}, \quad \text{Equation 25}$$

Pour une surface dure, la déflexion du micro levier est proportionnelle au déplacement  $z$  du piézo (la pente  $p$  est égale à 1) et on n'observe aucune indentation de la pointe dans la surface de l'échantillon.

Dans le cas d'une surface molle, la déflexion est inférieure au déplacement  $z$  du piézo (le déplacement du piézo n'est que la somme de la déflexion + la déformation de l'échantillon), ce qui se traduit par une pente de la courbe inférieure à 1. A titre d'exemple nous montrons dans la Figure 9 les réponses différentes (pentes différentes) d'une surface élastique et celle d'une surface dure, par suite à leur indentation par la même pointe, chacune en un point fixe de leurs surfaces.

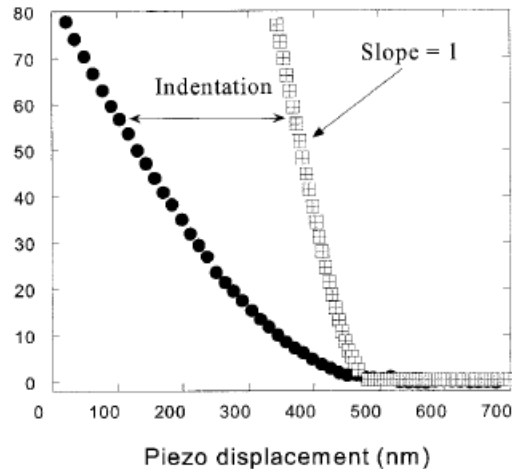


Figure 24: Exemples de courbes de force « approche » effectuées en milieu liquide sur une surface dure (mica) et une surface molle (cellule de type ostéoblaste)<sup>12</sup>.

Sur la Figure 9 sont présentées des exemples de courbes de forces enregistrées en sondant une surface mica (slope=1 sur la figure) et une cellule molle du type ostéoblaste<sup>12</sup>. On voit clairement une variation de la pente suivant l'élasticité de la surface sondée, la courbe de force réalisée sur la cellule montre une réponse mécanique différente de celle de la surface dure. Ceci est lié à l'indentation de la surface de la cellule produite par la pointe AFM, qui réduit la déflexion du levier.

## 2. Dynamique Moléculaire

La simulation en dynamique Moléculaire (MD)<sup>13</sup> est une méthode biophysique computationnelle largement utilisée, qui fournit efficacement un aperçu de nombreux processus biophysiques à un niveau atomistique (propriétés structurales, mécanismes, dynamiques, thermodynamiques). Cette méthode génère une trajectoire, étape par étape de toutes les particules dans le système, utilisant un champ de force pour approximer l'énergie potentielle d'un système<sup>14</sup>. Cela donne un aperçu de l'évolution du système avec le temps, fournissant ainsi des informations détaillées sur les fluctuations atomiques et les changements conformationnels. Dans la suite, nous expliquons

les notions de bases de la dynamique moléculaire, avec les potentiels d'interactions utilisés pour construire les champs de force en général.

## 2.1. Contexte

L'histoire des simulations MD remonte à la fin des années 1950, lorsque la technique a été introduite pour la première fois par Alder et Wainwright<sup>15,16</sup>. Les auteurs ont élucidé des informations utiles sur le comportement des liquides. Plus tard, Rahman<sup>17</sup> a réalisé la première simulation en utilisant un potentiel réaliste de l'Argon liquide. Après cet avancement, Rahman et Stillinger<sup>18</sup> ont fait la première simulation en dynamique moléculaire pour un système réaliste, l'eau liquide. Les premières simulations étaient principalement limitées aux petits systèmes, pour une durée de simulation de l'ordre de quelques ps et dans les conditions de vide en raison des dépenses élevées en termes de calcul. Cependant, le passage d'une durée de simulation de l'ordre de quelques ps à celle de quelques ns ou  $\mu$ s, a commencé autour de l'année 1988. Ceci a amélioré la quantification et la visualisation des liaisons entre les atomes. Plusieurs groupes ont réalisé des simulations MD pour des systèmes biologiques depuis le travail pionnier de Karplus, nous citons ceux de Brooks<sup>19</sup>, van Gunsteren<sup>20</sup>, Levitt<sup>21</sup>, Jorgensen<sup>22</sup>, Daggett<sup>23</sup>, Kollman<sup>24</sup>, Pande<sup>25</sup>, Berendsen<sup>26</sup>, Baker<sup>27</sup>, McCammon<sup>28</sup>, entre autres.

## 2.2. Notions de base dans un calcul MD

La simulation de dynamique moléculaire (MD) est une technique par laquelle on génère les trajectoires atomiques d'un système de  $N$  particules, par intégration de l'équation de mouvement de Newton :

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2}, \quad \text{Equation 26}$$

Où  $\vec{F}_i$  est la force agissant sur l'atome  $i$  au temps  $t$  et  $m_i$  est la masse de cet atome.  $\vec{r}_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$  est le vecteur position de l'atome  $i$ .

Cette intégration est réalisée pour un potentiel interatomique spécifique, avec certaines conditions initiales (IC « initial conditions ») et des conditions aux limites (BC « Boundary conditions »), tout en satisfaisant les contraintes thermodynamiques macroscopiques. Les forces appliquées sur l'atome  $i$  peuvent être déterminées comme le gradient négatif d'énergie potentielle :

$$\vec{F}_i = -\vec{\nabla} V, \text{ Equation 27}$$

Ces forces dépendent de la position de la particule qui change à chaque fois que la particule se déplace ou interagit. Cela nécessite la connaissance d'une séquence continue d'états mis à jour en fonction du temps, c'est-à-dire de l'état actuel de l'atome ( $\vec{r}(t), \vec{v}(t)$ ) à l'état suivant ( $\vec{r}(t + \delta t), \vec{v}(t + \delta t)$ ). Ces positions et vitesses sont intégrées en utilisant la méthode des différences finies qui suppose que la position et la vitesse de l'atome peuvent être développées en série de Taylor :

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2} \vec{a}(t)\delta t^2 + \frac{1}{6} \vec{b}(t)\delta t^3 + \dots, \text{ Equation 28}$$

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}(t) + \vec{a}(t)\delta t + \frac{1}{2} \vec{b}(t)\delta t^2 + \frac{1}{6} \vec{c}(t)\delta t^3 + \dots, \text{ Equation 29}$$

$$\vec{a}(t + \delta t) = \vec{a}(t) + \vec{b}(t)\delta t + \frac{1}{2} \vec{c}(t)\delta t^2 + \dots, \text{ Equation 30}$$

$$\vec{b}(t + \delta t) = \vec{b}(t) + \vec{c}(t)\delta t + \dots, \text{ Equation 31}$$

Où  $\vec{r}$  est la position,  $\vec{v}$  est la vitesse (première dérivée de la position),  $\vec{a}$  est l'accélération (dérivée seconde de la position) et  $\vec{b}$  est la dérivée première de l'accélération (troisième dérivée de la position) par rapport au temps et ainsi de suite.

Le fonctionnement de base de la méthode des différences finies est que l'intégration est décomposée en plusieurs petites étapes, entièrement séparées dans le temps par un pas de temps fixe  $\delta t$ . La force totale appliquée sur chaque particule de la configuration à un instant  $t$ , est évaluée comme la somme vectorielle de ses interactions avec toutes les autres particules, à cet instant. Alors, de la force, supposée constante pendant le pas de temps, on peut déterminer

les accélérations des particules, qui sont ensuite combinées avec les positions et les vitesses au moment  $t$ , pour calculer les positions et les vitesses au temps  $(t + \delta t)$ . La trajectoire quantifiée d'une particule dans la simulation de dynamique moléculaire est représentée dans la Figure 10.

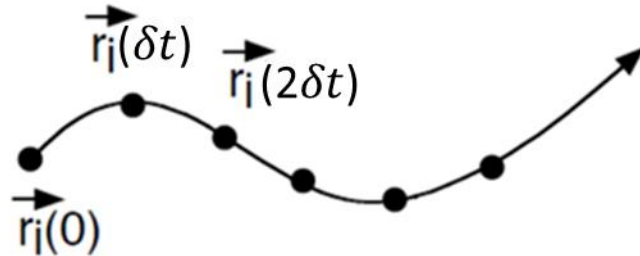


Figure 25 : La trajectoire d'une particule dans une simulation de dynamique moléculaire.  $\delta t$  étant l'intervalle de temps, et  $\vec{r}_i(\delta t)$  est le vecteur position à chaque intervalle temps.

L'un des algorithmes les plus simples pour résoudre les équations de mouvement de Newton est l'algorithme de Verlet <sup>25</sup>. Cet algorithme utilise les positions et les accélérations à un instant  $t$ , les positions de l'étape précédente  $\vec{r}(t - \delta t)$ , dans le but de calculer de nouvelles positions à l'instant  $(t + \delta t)$ . Selon l'algorithme de Verlet :

$$\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \vec{a}(t)\delta t^2, \quad \text{Equation 32}$$

Afin d'obtenir les vitesses à un instant  $t$ , nous devons diviser la différence entre les positions à  $(t + \delta t)$  et  $(t - \delta t)$  par  $2\delta t$  :

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t+\delta t) - \vec{r}(t-\delta t)}{2\delta t}, \quad \text{Equation 33}$$

La vitesse à un instant  $t$  ne peut être calculée que lorsque la coordonnée à l'instant  $(t + \delta t)$  soit calculée. Les vitesses doivent être estimées, ce qui indique que le calcul ne démarre pas automatiquement. Afin de surmonter cette limitation, plusieurs variations et algorithmes ont amélioré l'algorithme de Verlet. Parmi les approches avancées de cet algorithme, on cite celle de leap-frog, de Beeman ou celle de vitesse de Verlet dans laquelle les vitesses apparaissent explicitement ; les positions, les vitesses ainsi que les accélérations sont toutes stockées en même temps sans aucune perte de précision :

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\delta t + \frac{1}{2} \vec{a}(t)\delta t^2, \quad \text{Equation 34}$$

$$\vec{v}(t + \delta t) = \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t [\vec{a}(t) + \vec{a}(t + \delta t)], \text{ Equation 35}$$

Lors du choix d'un algorithme d'intégration, il faut garder à l'esprit la stabilité (c.-à-d. la conservation de l'énergie), la précision, la rapidité et l'efficacité du calcul.

La valeur de l'intervalle de temps détermine l'efficacité de tout algorithme utilisé. Par conséquent, il doit être d'un ordre de grandeur inférieur aux mouvements les plus rapides du système. Il doit être au moins de l'ordre de 1fs, période de vibration d'une liaison qui implique un atome d'hydrogène.

Un petit intervalle de temps conduirait à un échantillonnage insuffisant de l'espace des phases alors qu'un intervalle de temps large entraîne des instabilités dans l'algorithme d'intégration et une énergie de chevauchement élevée. Il y a donc toujours un compromis entre la précision de calcul et le coût du temps. Pour une augmentation effective des pas de temps sans production des instabilités dans le système, plusieurs algorithmes tels que SHAKE, RATTLE et LINCS existent qui contraignent la géométrie des molécules (liaisons, angles). Les simulations sont approuvées par rapport aux observables physiques, les algorithmes tendent à respecter les conditions expérimentales. Ces dernières constituent des modèles de température, de pression, de solvant, etc.

### **2.2.1. Conditions initiales:**

Un état thermodynamique particulier est caractérisé par un ensemble. Un ensemble est une collection de systèmes appartenant à un seul état macroscopique avec différents états microscopiques. Les propriétés d'un système macroscopique sont décrites par des principes établis empiriquement. Le principe zéro de la thermodynamique introduit la notion d'équilibre thermique. Le premier principe décrit la conservation d'énergie pour un système par la notion d'énergie interne. Le deuxième principe introduit la notion d'irréversibilité d'une transformation, équivalente à une augmentation de l'entropie. Le troisième principe attribue une valeur non nulle à l'entropie d'un système lors de l'approche du zéro absolu en température. Pour respecter les principes de la thermodynamique lors d'une simulation d'un nombre restreint de molécules, plusieurs outils mathématiques ont été développés. Ces outils introduits par Gibbs sont les

ensembles thermodynamiques. Ces ensembles représentent le comportement statistique des molécules sous des contraintes macroscopiques en accord avec les principes de la thermodynamique. Les ensembles largement utilisés sont NVT (nombre de particules  $N$ , volume  $V$ , température  $T$ ) fixes, NPH (Nombre de particules  $N$ , pression  $P$ , enthalpie  $H$ ) fixes, NPT (nombre de particules  $N$ , Pression  $P$ , température  $T$ ) fixes, et NVE (Nombre de particules  $N$ , volume  $V$ , énergie  $E$ ), fixes.

L'ensemble NVT est en général mis en contact avec un thermostat pour garder une stabilité thermique. Le bain thermostaté agit comme l'environnement entourant le système. Numériquement, plusieurs thermostats sont fournis par les programmes de simulation atomistique. Ces thermostats ont comme fonction de garder la température du système constante. Nous avons utilisé le thermostat de  $v$ -rescale qui agit comme un bain thermique sur l'ensemble du système. La température du système est ajustée sur un intervalle de temps par une augmentation des vitesses des atomes qui se traduit par une augmentation de l'énergie cinétique du système (théorie cinétique). L'intervalle de temps utilisé pour ajuster la température doit être plus grand que les fluctuations thermiques du système. Si le temps est plus court, la correction thermique apportée par le bain sera trop abrupte et le système restera hors d'équilibre tout au long de la simulation. L'ensemble NVT a été utilisé pour minimiser et équilibrer l'énergie du système entre les dynamiques à NPT.

L'ensemble NPT utilise un thermostat pour garder la stabilité thermique et un barostat pour maintenir la pression constante. Le thermostat utilisé lors des calculs de dynamique moléculaire pour l'ensemble NPT est le même que celui de l'ensemble NVT. Le barostat que nous avons utilisé lors des dynamiques atomistiques est le barostat de Parinello-Rahman. Ce dernier agit sur le système en appliquant une pression constante sur toutes les faces de la boîte. Les forces exercées sur les faces caractérisent la compressibilité du système. La pression prédéfinie par l'utilisateur est ajustée par une variation du volume. L'ensemble NPT a été utilisé pour collecter de données statistiques du système simulé lors des dynamiques atomistiques.



### 2.2.2. Les conditions périodiques aux limites

Il est impératif de définir des limites correctes au cours d'une simulation, ceci garantit les grandeurs macroscopiques à calculer, même en utilisant un nombre de particules relativement petit. Les conditions périodiques aux limites permettent de simuler des systèmes solides et liquides avec un petit nombre d'atomes tout en éliminant les effets de surface.

Les conditions périodiques aux limites permettent la simulation d'un système dans le volume ; la boîte est répliquée dans l'espace autour de la boîte originale. La Figure 11 représente une schématisation à deux dimensions des conditions périodiques aux limites. La molécule centrale est la molécule originale du système. La boîte centrale contient tout le système à simuler. Les autres molécules sont des répliques de cette molécule originale et ces molécules ne font pas partie de la simulation, elles sont présentes tout simplement comme aide visuelle. Au cours d'une simulation de dynamique moléculaire, un atome sortant d'un côté est transféré automatiquement de l'autre côté de la boîte. De cette façon, le nombre de particules dans le système demeure constant tout au long de la simulation.

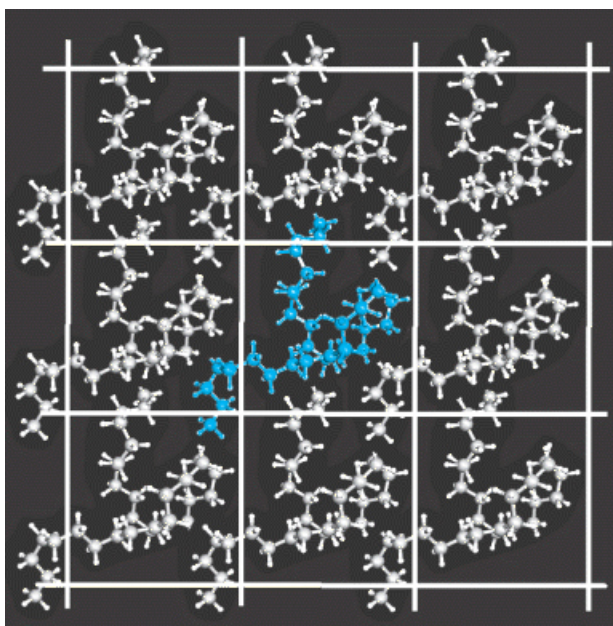


Figure 26: conditions périodiques aux limites en 2 dimensions.

### 2.2.3. Le milieu ambiant

Un autre facteur important au cours d'une simulation est le traitement des solvants qui écrantent les interactions électrostatiques. Il existe deux modèles, implicite et explicite, pour les solvants disponibles au sein d'un système. Dans le cas des modèles implicites, un milieu principalement homogène est utilisé pour représenter le solvant et l'effet est imité en utilisant les constants diélectriques du solvant. Le modèle explicite, quant à lui, représente les molécules sous forme d'atomes et est donc plus réaliste physiquement.

Ayant défini les ensembles et les contraintes sur le système, dans la suite nous allons introduire les potentiels d'interaction en simulation de dynamique moléculaire, ainsi que le champ de force de MARTINI.

## 2.3. Energie potentielle du système et Champ de Force :

L'énergie totale du système est une énergie potentielle qui décrit les interactions intermoléculaires (qui impliquent des atomes non-liés par des liaisons explicites) et intramoléculaires (qui impliquent des atomes liés directement par des liaisons explicites). Elle est donnée par l'équation suivante :

$$U_{totale} = U_{intramoléculaire} + U_{intermoléculaire} \quad \text{Equation 36}$$

De nombreuses différences au niveau de l'approche de cette énergie totale, donnent naissance à plusieurs champs de forces, regroupés en deux catégories. Les plus utilisés sont OPLS<sup>29-31</sup>, CHARMM<sup>32-34</sup>, DREIDING<sup>35</sup> et GROMOS<sup>36</sup>.

### 2.3.1. Paramètres des champs de force

Les champs de force sont créés pour faciliter et accélérer l'exécution d'un calcul. Une caractérisation exhaustive de l'environnement de chaque type d'atome simulé doit avoir lieu. La

caractérisation de chaque type d'atome associe des termes énergétiques en fonction de la participation de l'atome à un groupement fonctionnel. Un champ de force doit contenir plusieurs paramètres pour un seul atome. Ces paramètres sont fonction de l'environnement chimique dans lequel l'atome se trouve. Par exemple, le carbone possède des paramètres différents pour les carbones hybridés  $sp^3$ ,  $sp^2$  ou  $sp$ .

### 2.3.2. Potentiel d'interaction intramoléculaire ( $U_{intramoléculaire}$ )

Les interactions intramoléculaires désignent les interactions entre des atomes liés par des liaisons covalentes. Elles décrivent l'élongation des liaisons, la déformation des angles de valence et les torsions pour les angles dièdres. Trois termes sont à simuler :

$$U_{Intramoléculaire} = U_{liaison} + U_{angle} + U_{torsion}, \text{ Equation 37}$$

La liaison entre deux atomes est souvent décrite par un oscillateur harmonique d'énergie  $\frac{1}{2} k(x - x_0)^2$ . Ainsi on effectue la somme sur toutes les liaisons du système et dans toutes les directions :

$$U_{liaison} = \frac{1}{2} \sum_{liaisons} k_{liaison} (\vec{r} - \vec{r}_0)^2, \text{ Equation 38}$$

Où  $k_{liaison}$  représente la constante d'élongation pour la liaison considérée,  $\vec{r}$  est la distance de séparation entre deux atomes et  $\vec{r}_0$  est la longueur de la liaison à l'équilibre.

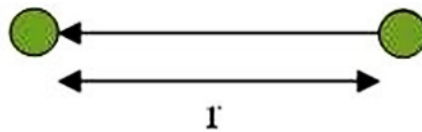


Figure 27: représentation à une dimension des interactions intramoléculaires entre deux atomes (Élongation  $r$ ).

Pareillement, le potentiel de déformation ou de pliage  $U_{angle}$  est simulée en considérant le mouvement entre les liaisons comme oscillatoire. Ainsi :

$$U_{angle} = \frac{1}{2} \sum_{angles} k_{angle} (\theta - \theta_0)^2, \text{ Equation 39}$$

où  $k_{angle}$  est la constante de pliage,  $\theta$  est l'angle entre deux liaisons et  $\theta_0$  est l'angle de liaison à l'équilibre.

Ce potentiel peut être représenté sous une forme harmonique équivalente :

$$U_{angle} = \frac{1}{2} \sum_{angles} k_{angle} (\cos(\theta) - \cos(\theta_0)), \text{ Equation 40}$$

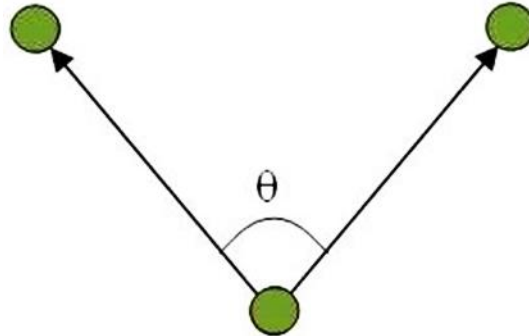


Figure 28: Représentation des interactions intramoléculaire entre trois atomes.

Quant au potentiel de torsion  $U_{torsion}$ , il est déduit de la rotation du dièdre formé par quatre atomes (voir Figure 14). Ce potentiel est décrit par la fonction :

$$U_{Torsion} = \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} (1 + \cos(nw - \gamma)), \text{ Equation 41}$$

$V_n$  est un terme d'énergie ( $kcal. mol^{-1}$ ) qui dépend des atomes,  $w$  désigne l'angle de torsion (en degré),  $\gamma$  est le facteur de phase (en degré) représentant l'angle où l'énergie de torsion passe par un minimum, et  $n$  est le terme de multiplicité qui détermine le minimum de la fonction lorsque l'angle tourne de  $360^\circ$ .

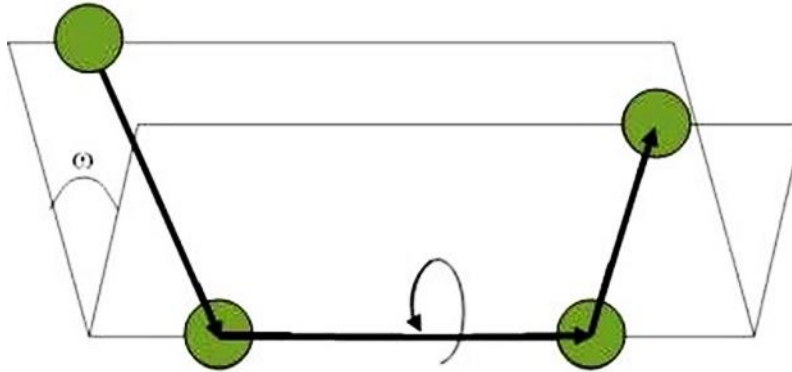


Figure 29: Représentation des interactions intramoléculaires à quatre atomes (angles dièdres – torsion).

Une autre fonction, parmi de nombreuses fonctions périodiques, qui permet de décrire le potentiel de torsion est celle de Ryckaert-Bellemans :

$$U_{dih} = \sum_{n=0}^5 V_n (\cos(w))^n, \text{ Equation 42}$$

Cette dernière équation est utilisée par le programme de calcul GROMACS.

### 2.3.3. Le potentiel d'interaction intermoléculaire ( $U_{intermoléculaire}$ )

Les interactions intermoléculaires impliquent les interactions entre les atomes d'une même molécule ou entre les atomes de différentes molécules, séparées par plus de deux liaisons. Elles proviennent essentiellement des interactions électrostatiques et de van der Waals :

$$U_{intermoléculaire} = U_{électrostatique} + U_{Van\ der\ Waals}$$

Les interactions de Van der Waals sont exprimées par deux termes : un terme répulsif et un terme attractif.

Les forces répulsives sont locales et plus intenses, leur portée est très courte. Elles décrivent les forces d'échange qui empêchent les électrons d'occuper la même région de l'espace. Quand la distance  $r$  qui sépare les deux atomes diminue, l'énergie de répulsion évolue rapidement. Elle peut être exprimée par la fonction simple ci-dessous :

$$U_{repulsif}^{VDW}(r) = \left(\frac{\sigma}{r}\right)^n, \text{ Equation 43}$$

où  $n$  est une constante de puissance allant de 9 à 16 qui dépend des systèmes en interaction et  $\sigma$  est une constante qui caractérise l'interaction entre 2 atomes.

Le deuxième terme attractif désigne les forces de dispersion de London. L'énergie de dispersion peut être représentée par la relation :

$$U_{attractif}^{VDW}(r) = -C \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6, \text{ Equation 44}$$

où  $C$  et  $\sigma$  sont des constantes qui caractérisent l'interaction entre 2 atomes.

La fonction couramment utilisée dans la simulation du potentiel de Van de Waals, est celle de Lennard-Jones. La forme générale du potentiel de Lennard-Jones, comprend un terme répulsif (terme à l'exposant douze), et un terme attractif (terme à l'exposant six) :

$$U_{LJ}(r_{AB}) = 4\varepsilon_{AB} \left[ \left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}}\right)^6 \right], \text{ Equation 45}$$

Avec  $r_{AB}$  (en Å) est la distance entre les deux atomes  $A$  et  $B$ ,  $\varepsilon_{AB}$  et  $\sigma_{AB}$  sont les paramètres de Lennard-Jones caractéristiques de l'interaction entre les atomes  $A$  et  $B$ .  $\varepsilon_{AB}$  représente le minimum d'énergie potentielle pour une distance interatomique d'équilibre  $\sigma_{AB}$ .

Quant aux forces électrostatiques, elles représentent l'interaction coulombienne entre les charges partielles des atomes :

$$U_{électrostatique} = k \frac{q_A q_B}{r_{AB}}, \text{ Equation 46}$$

Le signe de la charge partielle de chaque atome  $A$  ou  $B$  est conservé. Cette conservation de signe assure une répulsion entre les charges de même signe et une attraction entre les atomes de signes opposés,  $k$  est dans cette équation la constante diélectrique du milieu et  $r_{AB}$  est la distance entre l'atome  $A$  et l'atome  $B$ .

## 2.4. Champ de force de MARTINI

Tous les potentiels décrits dans le paragraphe 2.3 sont introduits dans un champ de force qui régit le mouvement global du système. Les modèles de champ tous atomes (AA pour All Atoms) traditionnels, qui introduisent les paramètres et les fonctions de chaque atome du système dans la simulation, rendent le temps de calcul non abordable, pour les systèmes qui contiennent un très grand nombre d'atomes. L'utilisation du modèle gros grains (CG pour Coarse Grain en anglais) se présente comme solution à ce problème. En général, le modèle CG est basé sur l'association d'un certain nombre d'atomes en un seul grain, et par conséquent les interactions entre ces atomes seront représentées en une seule interaction. Les interactions du système seront alors assimilées par celles entre les grains. Ce modèle réduit donc le nombre d'interactions dans le système et par la suite le coût de temps de calcul. Les ajustements du modèle CG pour les lipides en particulier, ont été mis au point par Smit<sup>37</sup> et sont devenus largement utilisés<sup>37-39</sup>. Depuis, une diversité d'approches dans la théorie CG sont disponibles<sup>39-42</sup>, parmi eux le modèle MARTINI<sup>43</sup> qui a été développé en relation étroite avec des modèles atomistiques plus détaillés. En effet, ce champ de forces a été paramétré de manière systématique : Les interactions non liées sont basées sur la reproduction d'énergies libres expérimentales entre les phases polaires et apolaires d'un grand nombre de composés chimiques, tandis que les interactions liées sont dérivées des simulations de champ de force tous atomes. Ce modèle est devenu l'un des champs de force à gros grains les plus utilisés dans le domaine des simulations de dynamique moléculaire pour les biomolécules. La liste des applications du modèle de MARTINI à ce jour comprend la formation et la fusion de vésicules, les transformations de phase lamellaire, la structure et la dynamique de l'assemblage des protéines membranaires<sup>44,45</sup>, la structure des bicelles<sup>46</sup>, l'équation de l'état des monocouches<sup>46,47</sup>, et l'effet de diverses molécules sur les membranes (butanol, DMSO, dendrimères).

La description détaillée des paramètres du champ de force de MARTINI, utilisé dans notre thèse, est présentée dans la section suivante.

### 2.4.1. Paramétrisation du champ MARTINI pour les phospholipides étudiés

Le modèle est basé sur un mappage de quatre à un, c'est-à-dire en moyenne quatre atomes lourds sont représentés par une seule interaction (un seul grain). Dans une description simplifiée, ce modèle n'envisage que quatre principaux types de sites d'interaction : polaire (P), non polaire (N), apolaire (C) et chargé (Q). Chaque type de site a un certain nombre de sous-types, ce qui permet une représentation de la nature chimique du site. Dans chaque type principal, les sous-types sont soit distingués par une lettre désignant la capacité de liaison hydrogène (d = donneur, a = accepteur, da = les deux, 0 = aucun), ou par un nombre indiquant le degré de polarité (de 1 à 5, soit de faible à haute polarité). La représentation de trois molécules dans le modèle de MARTINI est donnée dans la Figure 15.

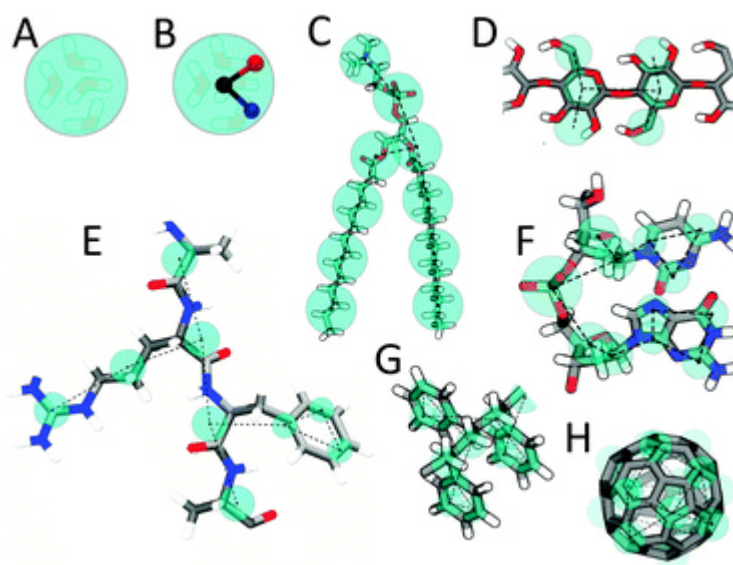


Figure 30: Représentation en modèle Gros Grain de MARTINI : (A) Particule d'eau standard représentant quatre molécules d'eau, (B) Molécule d'eau polarisable avec des charges incorporées, (C) Lipide DMPC, (D) Fragment de polysaccharide, (E) Peptide, (F) Fragment d'ADN, (G) Fragment de polystyrène, (H) Molécule de fullerène.

Dans la Figure 15, les grains de MARTINI sont représentés comme des billes transparentes en couleur de cyan recouvrant la structure atomique.



Pour les structures en cycle, La procédure de l'assemblage des atomes quatre à un est inadéquat. Ainsi t un mappage différent est introduit. Une stratégie de modélisation des cycles vient d'inclure autant de sites gros grains si nécessaire afin de conserver la géométrie du cycle, généralement résultant en une représentation de 2 ou de 3 sites par cycle. Ainsi, des détails géométriques sont induits pour imiter suffisamment la géométrie de petits composés tels que le cyclohexane, le benzène, les stérols en particulier le cholestérol.

Le potentiel qui décrit les interactions non liées (potentiels intermoléculaires) dans le cas du champ de Martini est celui de Leonard-Jones décrit dans l'équation 25. Cependant, la taille effective est  $\sigma = 0.47$  nm, pour chaque paire d'interaction, sauf pour les cycles. Dans le cas des particules en cycle, la taille et la force d'interaction efficaces sont réduites par rapport à l'ensemble. Plus précisément, le paramètre  $\sigma$  est fixé à 0.43 plutôt que 0.47 nm. Le potentiel coulombien est toujours donné par l'équation 26 avec la restriction d'une constante diélectrique relative  $k_r = \frac{1}{15}$ .

Les liaisons interatomiques (potentiels intramoléculaires) dans le champ de MARTINI sont décrites par le potentiel de liaison introduit dans l'équation 18 avec une distance d'équilibre  $r_0 = \sigma = 0.47$  nm et la constante de force de liaison,  $k_{liaison} = 1250 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ .

Pour les chaînes aliphatiques, la constante de force est  $k_{angle} = 25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  avec un angle de liaison d'équilibre  $\theta_0 = 180^\circ$ , tandis que pour les angles impliquant une liaison double ces paramètres sont  $k_{angle} = 45 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  et  $\theta_0 = 120^\circ$ .

Cette paramétrisation générale des forces d'interaction spécifique du champ MARTINI est utilisée dans nos calculs.

Dans la suite, nous allons expliciter le calcul du module de courbure des membranes lipidiques, à travers la méthode de simulation décrite dans le paragraphe 6.4 du chapitre 1, tout en utilisant les paramètres du champ MARTINI, tandis que la méthode de fluctuation de la surface qui détermine le module de compressibilité est décrite pour la première fois dans le paragraphe 2.5 ci-dessous.

## 2.5. Module de compressibilité, fluctuations de la surface

Suivant le formalisme de Helfrich, nous traitons la bicouche comme une feuille élastique (2D) avec des constantes mécaniques décrivant ses modes de déformation. Pour de petites fluctuations superficielles autour du minimum de l'énergie libre, chaque mode de déformation est associé à une énergie élastique qui est approchée par une fonction quadratique de la déformation concernée, analogue à la loi de Hooke pour une élongation linéaire  $((x - x_0))$  et  $V = \frac{1}{2}k(x - x_0)^2$ ). Pour les changements de surface, l'énergie élastique  $E_{\text{élastique}}$  de l'étirement / la compression des bicouches avec une surface d'équilibre  $a_0$  est donnée par<sup>49</sup>:

$$E_{\text{élastique}} = \frac{1}{2} K_A \frac{(a-a_0)^2}{a_0}, \text{ Equation 47}$$

où  $a$  est la surface déformée et  $K_A$  est le module de compressibilité de la surface de la bicouche. En supposant que l'étirement / la compression de la surface de la bicouche correspond à des degrés de liberté indépendants dans le contexte de la fonctionnelle de l'énergie décrivant la mécanique de la bicouche (i.e. courbure ou inclinaison),  $K_A$  peut être obtenue par des fluctuations thermiques de la surface de la bicouche<sup>49</sup>. Plus précisément, à partir du théorème d'équipartition d'énergie  $E_{\text{élastique}} = \langle E \rangle = \frac{1}{2} k_B T$  où  $k_B$  est la constante Boltzmann et  $T$  est la température, il s'ensuit que :

$$K_A = = \frac{a_0}{\langle (a - a_0)^2 \rangle} k_B T, \text{ Equation 48}$$

C'est l'expression couramment utilisée pour obtenir  $K_A$  à partir des simulations MD d'une bicouche en échantillonnant les fluctuations de la surface latérale d'une boîte définie de simulation.

## 2.6. Méthode de la déformation de la membrane

La méthode de la déformation de la membrane impose le calcul des forces exercées par une membrane déformée. Les bicouches sont initialement dans le plan  $xy$ , on génère une boucle en

comprimant les bicouches dans la dimension  $x$ , jusqu'à ce qu'on atteigne la déformation souhaitée,  $\gamma$ , définie comme :

$$\gamma = \frac{L-l}{L} = \frac{\Delta L}{L}, \text{ Equation 49}$$

où est  $L$  la longueur de la boîte comprimée (la dimension  $x$ , dans notre cas, exprimée en nm), et  $l$  est l'étendue de la compression (exprimée en nm).

La méthode de la déformation de la membrane consiste à effectuer deux simulations. Une pour calculer la taille de la boîte en dimension  $x$  pour le système plat à l'équilibre (c-à-dire que la bicouche est à l'état d'équilibre,  $x$  est (la valeur  $L$  dans l'Equation 29), cette première simulation est appelée simulation de la taille de la bicouche. Une deuxième simulation est consacrée pour calculer la force exercée par la même bicouche, mais après flambement, sur les parois de la boîte (plan  $yz$ ). Cette simulation est appelée la simulation de forces.

La boucle a été générée en appliquant une contrainte dans la dimension  $x$  pendant au moins 600 ns, jusqu'à ce que la déformation souhaitée soit obtenue. La simulation pour le système plat pour les bicouches sans tension (simulation de taille) se réalise généralement pendant  $2 \mu\text{s}$  avec des tailles non-variables dans la direction  $y$  (mais la taille est variable dans les dimensions  $x$  et  $z$ ). Nous avons utilisé ces simulations pour calculer la longueur moyenne de la boîte  $L$ , à tension nulle dans la dimension  $x$ . Les simulations de production des bicouches déformées (simulations de force) ont été réalisées pendant  $8 \mu\text{s}$ , avec des dimensions  $x$  et  $y$  fixes et le couplage de la pression agit uniquement dans la dimension  $z$ . Nous avons utilisé ces simulations pour calculer la pression (et donc la force exercée par la membrane) sur le plan  $yz$ . Cette force peut être déduite de la composante  $xx$  du tenseur des contraintes ( $P_{xx}$ ), moyennée pendant le cycle de production :

$$F_x = P_{xx}(L_y L_z), \text{ Equation 50}$$

À partir de la force, nous pouvons calculer la module de courbure en appliquant l'équation développée par Deserno<sup>50</sup>, définie au paragraphe 6.4 du chapitre 1.

## Analyse de la simulation et calcul des erreurs

Nous appliquons des règles de propagation d'erreur pour déterminer les incertitudes statistiques (erreur statistique) sur la valeur moyenne de la force,  $F_x$ :

$$\Delta F_x = F_x \sqrt{\left(\frac{\Delta P_x}{P_x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta L_z}{L_z}\right)^2}, \text{ Equation 51}$$

$\Delta F_x$ ,  $\Delta P_x$  et  $\Delta L_z$  sont des incertitudes statistiques sur la force, la pression, et sur la taille de la boîte dans la direction  $z$ , respectivement. Elles sont calculées à partir des simulations de la force  $F_x$  à l'aide de l'outil « gmx analyze » en GROMACS.

Lors du calcul de la force exercée par la membrane, nous incluons aussi l'effet des ondulations thermiques<sup>50</sup>, correspondant à :

$$\delta F_x = -k_B T \frac{3}{2L} \sum_{i=0}^{\infty} d_i \gamma^i, \text{ Equation 52}$$

où  $\delta F_x$  est la contribution des ondulations thermiques à la force,  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  est la température absolue,  $L$  est la taille de la boîte dans le sens de la compression (direction  $x$ ),  $d_i$  sont des coefficients numériques donnés dans l'article original publié par Deserno<sup>50</sup>, et  $\gamma$  est la déformation (telle que définie dans l'équation 29). Par conséquent, la force utilisée pour calculer le module de courbure est  $F_x + \delta F_x$ .

Tant que la force est connue, on applique l'Equation 20 du paragraphe 6.4 du chapitre 1 pour calculer le module de courbure de la membrane simulée.

Pour estimer les incertitudes statistiques du module de courbure, nous divisons la simulation de production en deux parties égales ; la différence entre les valeurs moyennes de chaque partie a été utilisée comme estimation des incertitudes.

### 3. Matériels utilisés

Pour éviter toute répétition, le matériel utilisé dans chaque partie de la mesure ou du calcul, réalisé au cours de cette thèse, est décrit en détail avec ses ressources, dans des paragraphes appropriés au matériel, dans les chapitres 3, 4, 5 et 6.

Le lipide E80 (EggCPC), la quercétine, le cholestérol, l'éthanol, les chlorures de choline, urée, glycérol, éthylène glycol, la pompe à seringue, l'évaporateur rotatif, les substrats en mica, les deux sondes pyrex-nitride triangulaires PNP-TR, les deux sondes de qualité uniforme Uniqprobes BioT triangulaires qp-BioT, le microscope Agilent 5420, les logiciels GROMACS, VMD, XMGRACE, et CHIMERA ; les propriétés et les ressources de tout ce matériel sont incluses dans les paragraphes 3.2, 4.2, 5.2 ou 6.2.

Dans le chapitre 2, nous avons décrit les méthodes utilisées dans notre thèse pour quantifier la rigidité de la membrane lipidique EggPC.

Nous avons décrit la méthode AFM dans les deux modes de contact et de spectroscopie de force, qui sont utilisés dans nos mesures expérimentales de la rigidité en termes de module d'Young. Les principes de base de la dynamique moléculaire ont été exposés. Nous avons décrit le champ de force de MARTINI utilisé dans nos calculs pour paramétrer les molécules lipidiques étudiées. Nous avons défini les paramètres nécessaires dans les méthodes de simulation, utilisées pour le calcul de la rigidité en termes de module de compressibilité  $K_A$  (méthode de fluctuation d'aire), et de module de courbure  $k_c$  (méthode de la déformation de la membrane).

Dans ce qui reste, nous présentons la deuxième partie de cette thèse constituée des résultats que nous avons obtenus.

## 4. Références

- (1) H, U.; T, O.; A, I. Quantitative Measurement of mRNA at Different Loci within an Individual Living Cell. *Ultramicroscopy* **2004**, *100* (3–4), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2004.01.014>.
- (2) Ruozi, B.; Tosi, G.; Tonelli, M.; Bondioli, L.; Mucci, A.; Forni, F.; Vandelli, M. A. AFM Phase Imaging of Soft-Hydrated Samples: A Versatile Tool to Complete the Chemical-Physical Study of Liposomes. *Journal of Liposome Research* **2009**, *19* (1), 59–67. <https://doi.org/10.1080/08982100802584071>.
- (3) Stylianou, A.; Stylianopoulos, T. Atomic Force Microscopy Probing of Cancer Cells and Tumor Microenvironment Components. *BioNanoSci.* **2016**, *6* (1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s12668-015-0187-4>.
- (4) Vahabi, S.; Nazemi Salman, B.; Javanmard, A. Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. *Iran J Med Sci* **2013**, *38* (2), 76–83.
- (5) Odin, C.; Aimé, J. P.; El Kaakour, Z.; Bouhacina, T. Tip's Finite Size Effects on Atomic Force Microscopy in the Contact Mode: Simple Geometrical Considerations for Rapid Estimation of Apex Radius and Tip Angle Based on the Study of Polystyrene Latex Balls. *Surface Science* **1994**, *317* (3), 321–340. [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(94\)90288-7](https://doi.org/10.1016/0039-6028(94)90288-7).
- (6) Boisset, M.-C.; Frétigny, C. Monocouches de billes de latex ou de silice : utilisation pour la calibration et pour le contrôle des pointes en AFM. *Microsc. Microanal. Microstruct.* **1994**, *5* (1), 71–77. <https://doi.org/10.1051/mmm:019940050107100>.
- (7) Detrez, F. Nanomécanismes de déformation des polymères semi-cristallins: étude in situ par microscopie à force atomique et modélisation. 171.
- (8) Hamaker, H. C. The London—van Der Waals Attraction between Spherical Particles. *Physica* **1937**, *4* (10), 1058–1072. [https://doi.org/10.1016/S0031-8914\(37\)80203-7](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(37)80203-7).
- (9) Israelachvili, J. N. Intermolecular and Surface Forces. 706.
- (10) Bouhacina, T.; Aimé, J. P.; Gauthier, S.; Michel, D.; Heroguez, V. Tribological Behavior of a Polymer Grafted on Silanized Silica Probed with a Nanotip. *Phys. Rev. B* **1997**, *56* (12), 7694–7703. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.56.7694>.
- (11) Simon, A.; Cohen-Bouhacina, T.; Porté, M. C.; Aimé, J. P.; Amédée, J.; Bareille, R.; Baquey, C. Characterization of Dynamic Cellular Adhesion of Osteoblasts Using Atomic Force Microscopy. *Cytometry Part A* **2003**, *54A* (1), 36–47. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10052>.
- (12) Garcia-Manyes, S.; Domènech, Ò.; Sanz, F.; Montero, M. T.; Hernandez-Borrell, J. Atomic Force Microscopy and Force Spectroscopy Study of Langmuir–Blodgett Films Formed by Heteroacid Phospholipids of Biological Interest. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, *1768* (5), 1190–1198. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.004>.
- (13) van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenzholz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F. A.; Yu, H. B. Biomolecular Modeling: Goals,

- Problems, Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (25), 4064–4092. <https://doi.org/10.1002/anie.200502655>.
- (14) Karplus, M.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (9), 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>.
- (15) Alder, B. J.; Wainwright, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27* (5), 1208–1209. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>.
- (16) Alder, B. J.; Wainwright, T. E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. *J. Chem. Phys.* **1959**, *31* (2), 459–466. <https://doi.org/10.1063/1.1730376>.
- (17) Rahman, A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. *Phys. Rev.* **1964**, *136* (2A), A405–A411. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.A405>.
- (18) Rahman, A.; Stillinger, F. H. Molecular Dynamics Study of Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1971**, *55* (7), 3336–3359. <https://doi.org/10.1063/1.1676585>.
- (19) Brooks, C. L. Characterization of “Native” Apomyoglobin by Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Molecular Biology* **1992**, *227* (2), 375–380. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90893-O](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90893-O).
- (20) van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E. Validation of Molecular Dynamics Simulation. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108* (15), 6109–6116. <https://doi.org/10.1063/1.476021>.
- (21) Daggett, V.; Levitt, M. Protein Folding↔unfolding Dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* **1994**, *4* (2), 291–295. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90322-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90322-0).
- (22) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- (23) Daggett, V.; Fersht, A. R. Is There a Unifying Mechanism for Protein Folding? *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28* (1), 18–25. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00012-9).
- (24) Duan, Y.; Kollman, P. A. Pathways to a Protein Folding Intermediate Observed in a 1-Microsecond Simulation in Aqueous Solution. *Science* **1998**, *282* (5389), 740–744. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.740>.
- (25) Pande, V. S.; Rokhsar, D. S. Molecular Dynamics Simulations of Unfolding and Refolding of a  $\beta$ -Hairpin Fragment of Protein G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (16), 9062–9067.
- (26) Roccatano, D.; Amadei, A.; Di Nola, A.; Berendsen, H. J. A Molecular Dynamics Study of the 41-56 Beta-Hairpin from B1 Domain of Protein G. *Protein Sci* **1999**, *8* (10), 2130–2143.
- (27) Tsai, J.; Levitt, M.; Baker, D. Hierarchy of Structure Loss in MD Simulations of Src SH3 Domain Unfolding. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291* (1), 215–225. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2949>.
- (28) Adcock, S. A.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (5), 1589–1615. <https://doi.org/10.1021/cr040426m>.
- (29) Damm, W.; Frontera, A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. OPLS All-Atom Force Field for Carbohydrates. *Journal of Computational Chemistry* **1997**, *18* (16), 1955–1970. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199712\)18:16<1955::AID-JCC1>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199712)18:16<1955::AID-JCC1>3.0.CO;2-L).

- (30) McDonald, N. A.; Jorgensen, W. L. Development of an All-Atom Force Field for Heterocycles. Properties of Liquid Pyrrole, Furan, Diazoles, and Oxazoles. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (41), 8049–8059. <https://doi.org/10.1021/jp981200o>.
- (31) Price, M. L. P.; Ostrovsky, D.; Jorgensen, W. L. Gas-Phase and Liquid-State Properties of Esters, Nitriles, and Nitro Compounds with the OPLS-AA Force Field. *Journal of Computational Chemistry* **2001**, *22* (13), 1340–1352. <https://doi.org/10.1002/jcc.1092>.
- (32) Klauda, J. B.; Venable, R. M.; Freites, J. A.; O'Connor, J. W.; Tobias, D. J.; Mondragon-Ramirez, C.; Vorobyov, I.; MacKerell, A. D.; Pastor, R. W. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (23), 7830–7843. <https://doi.org/10.1021/jp101759q>.
- (33) J, L.; X, C.; Jm, S.; Ms, Y.; Pk, E.; Ja, L.; S, W.; J, B.; Jc, J.; Y, Q.; S, J.; Vs, P.; Da, C.; CL 3rd, B.; Jr, M. A.; Jb, K.; W, I. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput* **2015**, *12* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- (34) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J Comput Chem* **2008**, *29* (11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- (35) Mayo, S. L.; Olafson, B. D.; Goddard, W. A. DREIDING: A Generic Force Field for Molecular Simulations. *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94* (26), 8897–8909.
- (36) Christen, M.; Hünenberger, P. H.; Bakowies, D.; Baron, R.; Bürgi, R.; Geerke, D. P.; Heinz, T. N.; Kastenholz, M. A.; Kräutler, V.; Oostenbrink, C.; Peter, C.; Trzesniak, D.; van Gunsteren, W. F. The GROMOS Software for Biomolecular Simulation: GROMOS05. *J Comput Chem* **2005**, *26* (16), 1719–1751. <https://doi.org/10.1002/jcc.20303>.
- (37) Smit, B.; Hilbers, P. a. J.; Esselink, K.; Rupert, L. a. M.; van Os, N. M.; Schlijper, A. G. Computer Simulations of a Water/Oil Interface in the Presence of Micelles. *Nature* **1990**, *348* (6302), 624–625. <https://doi.org/10.1038/348624a0>.
- (38) Shillcock, J. C.; Lipowsky, R. The Computational Route from Bilayer Membranes to Vesicle Fusion. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**, *18* (28), S1191–S1219. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/28/S06>.
- (39) Muller, M.; Katsov, K.; Schick, M. Biological and Synthetic Membranes: What Can Be Learned from a Coarse-Grained Description? *Physics Reports* **2006**, *434* (5–6), 113–176. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2006.08.003>.
- (40) Revalee, J. D.; Laradji, M.; Sunil Kumar, P. B. Implicit-Solvent Mesoscale Model Based on Soft-Core Potentials for Self-Assembled Lipid Membranes. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128* (3), 035102. <https://doi.org/10.1063/1.2825300>.
- (41) Hu, K.; Ivanov, P. Ch.; Chen, Z.; Carpena, P.; Eugene Stanley, H. Effect of Trends on Detrended Fluctuation Analysis. *Phys. Rev. E* **2001**, *64* (1), 011114. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.64.011114>.
- (42) Sevink, G. J. A.; Zvelindovsky, A. V. Self-Assembly of Complex Vesicles. *Macromolecules* **2005**, *38* (17), 7502–7513. <https://doi.org/10.1021/ma0506740>.
- (43) Marrink, S. J.; Risselada, H. J.; Yefimov, S.; Tieleman, D. P.; de Vries, A. H. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (27), 7812–7824. <https://doi.org/10.1021/jp071097f>.



- (44) Bond, P. J.; Sansom, M. S. P. Insertion and Assembly of Membrane Proteins via Simulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (8), 2697–2704. <https://doi.org/10.1021/ja0569104>.
- (45) Shih, A. Y.; Arkhipov, A.; Freddolino, P. L.; Schulten, K. Coarse Grained Protein-Lipid Model with Application to Lipoprotein Particles. *J Phys Chem B* **2006**, *110* (8), 3674–3684. <https://doi.org/10.1021/jp0550816>.
- (46) Y, J.; Jt, K. Simulations of Edge Behavior in a Mixed-Lipid Bilayer: Fluctuation Analysis. *J Chem Phys* **2007**, *126* (4), 045105–045105. <https://doi.org/10.1063/1.2430714>.
- (47) Marrink, S. J.; Tieleman, D. P. Perspective on the Martini Model. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (16), 6801–6822. <https://doi.org/10.1039/C3CS60093A>.
- (48) Fainerman, V. B.; Vollhardt, D. Equations of State for Langmuir Monolayers with Two-Dimensional Phase Transitions. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (1), 145–150. <https://doi.org/10.1021/jp983109q>.
- (49) Feller, S. E.; Pastor, R. W. Constant Surface Tension Simulations of Lipid Bilayers: The Sensitivity of Surface Areas and Compressibilities. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111* (3), 1281–1287. <https://doi.org/10.1063/1.479313>.
- (50) Hu, M. (胡明暘); Diggins, P.; Deserno, M. Determining the Bending Modulus of a Lipid Membrane by Simulating Buckling. *J. Chem. Phys.* **2013**, *138* (21), 214110. <https://doi.org/10.1063/1.4808077>.

# Deuxième Partie

Cette partie est consacrée aux résultats que nous avons obtenus au cours de cette thèse. Il s'agit de quatre publications, rédigées en anglais, distribuées sur quatre chapitres, les chapitres 3, 4, 5 et 6. Au début de chaque chapitre, un résumé du contenu de chaque article a été introduit en langue française.

Le chapitre 3, discutant le problème principal de cette thèse, comporte un article en état de révision dans le journal « Chemistry and physics of Lipids ». Son lien électronique est : <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105011>.

Dans le chapitre 4, nous présentons un article publié dans le journal « Journal of Chemistry and Physics B ». Cet article, qui discute la simulation du module de flexion pour différentes membranes lipidiques, a été disponible en ligne depuis 29 juin 2020. Son lien électronique est : <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.0c04253>.

Le chapitre 5 résume les résultats qui montrent l'effet de la quercétine sur une membrane lipidique, sous forme d'un article rédigé. Ce dernier sera soumis à un journal approprié, dans la période de soumission de la thèse.

Le chapitre 6 met en évidence le comportement des structures à base de lipides E80, au sein de quatre DESs. Les résultats sont publiés dans le journal « Journal of Molecular Liquids » depuis le 15 mai 2020, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112851>.

# Chapitre 3 : Interprétation des écarts enregistrés dans le module d'élasticité des membranes lipidiques, mesuré par plusieurs méthodes et dans différentes conditions

La question qui a été posée récemment par plusieurs auteurs est la suivante : pourquoi le module d'Young ou celui de flexion ou d'élasticité, qui est un paramètre intrinsèque et ne doit pas dépendre que des propriétés de la membrane, registre des valeurs différentes, lorsqu'il est mesuré par différentes méthodes, ou sous différentes conditions par la même méthode.

Dans la même période de rédaction de cette thèse, deux études ont été publiées, essayant de répondre à la même question. Oscar Saavedra et al. ont mis en évidence, en Mai 2020, l'effet des mêmes paramètres AFM que nous avons discutés dans ce chapitre, sans aborder l'effet du modèle de contact pointe-échantillon<sup>1</sup>. Leur statistique relativement énorme est basé sur un code numérique appliqué pour toutes les courbes de forces collectées au cours de l'indentation d'une membrane lipidique linéaire, ayant une hauteur constante lorsqu'elle est adsorbée sur un substrat. Notre étude a été performée pour des liposomes dont l'adsorption sur le mica peut varier leur hauteur, et ainsi une statistique manuelle a été recordée, en mesurant le module d'Young manuellement pour chaque liposome à part. L'indentation des vésicules sphériques adsorbées séparément sur un substrat, est pratiquement beaucoup plus compliquée que l'indentation de bicouches linéaires adsorbées sur le même substrat. En plus, notre étude a montré l'impact évidente du choix du modèle de contact sur la valeur du module d'Young. Chiodini et al. ont démontré, en Août 2020, que pour obtenir la même valeur du module d'Young pour une même membrane, mesuré différemment, il faut introduire une correction qu'ils ont appelé « Garcia's bottom-effect artifact correction »<sup>2</sup>. Les auteurs ont mis en évidence l'effet du substrat sur lequel sont déposées des bicouches lipidiques ayant la même composition chimique mais d'épaisseurs différentes. Néanmoins ils n'ont pas parlé d'autres facteurs.

Le présent travail discute l'effet de la forme de l'apex d'une pointe AFM, l'effet de la constante de force du levier AFM, l'effet du modèle mathématique de contact pointe-échantillon adapté pour ajuster les courbes de force dans la région d'indentation AFM, sur la valeur du module d'Young de vésicules sphériques EggPC stables adsorbées sur une surface mica. Quatre apex, quatre constantes de forces et deux modèles mathématiques ont été sélectionnés, pour tracer les courbes de force des liposomes EggPC. Ainsi huit configurations expérimentales ont été étudiées. Pour chacune, 120 courbes ont été collectées et interprétées à partir de l'indentation de 120 liposomes de même taille. La mesure du module d'Young a été accomplie manuellement, en utilisant les deux modèles d'ajustement de Hertz et de Coque, d'une manière adéquate à l'adsorption de chaque liposome.

Les résultats de cette étude ont montré que chacun parmi les paramètres variés influe la valeur du module d'Young avec un accent particulier repéré pour le modèle mathématique de contact.

La configuration expérimentale AFM qui peut refléter la valeur réelle du module d'Young des liposomes EggPC a été sélectionnée. Ceci a été réalisé en comparant nos mesures, d'une part à des mesures préalables disponibles dans la littérature pour des membranes de composition lipidique similaire, et d'autre part à des calculs de simulation que nous avons lancé pour une membrane lipidique ayant la même constitution que les liposomes EggPC. La comparaison aboutit à une optimisation des conditions de mesure AFM ou de simulation MD pour les lipides en question.

# Elastic moduli of lipid membranes: reproducibility of AFM measures

Jad Eid <sup>a,b</sup>, Hélène Greige-Gerges<sup>a</sup> , Luca Monticelli <sup>b</sup>, Alia Jraij <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Bioactive Molecules Research Laboratory, Doctoral School of Sciences and Technologies, Faculty of Sciences, Lebanese University*

<sup>b</sup> *Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB), UMR 5086 CNRS / University Claude Bernard Lyon1, Lyon, France*

\*Corresponding author: [ajraij@ul.edu.lb](mailto:ajraij@ul.edu.lb); [aliajraij@hotmail.com](mailto:aliajraij@hotmail.com)

Department of Physics, Faculty of Sciences, Lebanese University, P.O.Box: 14-6573, Hadath, Lebanon

## Abstract

Membrane elastic properties play a major role in membrane remodeling events, such as vesicle fusion and fission. They are also crucial in drug delivery by liposomes. Different experimental techniques are available to measure elastic properties. Among them, atomic force microscopy (AFM) presents the unique advantage of being directly applicable to nano-sized liposomes. Unfortunately, different AFM measures reported in the literature show little agreement among each other and are difficult to compare with measures of bending modulus obtained by other experimental techniques or by molecular simulations. In this work we determine the bending rigidity of Egg PC liposomes in terms of Young modulus via AFM measurements, using two different tip shapes and different cantilever force constants. We interpret the measures using the Hertz and Shell models, and observe a clear dependency of the Young modulus values on the tip properties and on the interpretative theory. The effect of the AFM tip shape is less important than the effect of the cantilever force constant, and the mathematical model has a major effect on the interpretation of the data. The Shell theory provides the closest agreement between AFM data and other experimental data for the membrane bending modulus. Finally, we compare the results to calculations of bending modulus from molecular dynamics simulations of membrane

buckles. Simulations provide values of bending modulus consistent with literature data, but the agreement with AFM experiments is reasonable only for some specific experimental conditions.

**Keywords:** Bending modulus, Young Modulus, liposomes, lipid membrane, atomic force microscopy, molecular dynamics simulations.

**List of abbreviations:**

AFM: atomic force microscopy, Bending modulus:  $k_c$ , Young modulus: E, PNP-TR: pyrex-nitride probes triangular cantilevers, Uniqprobes: uniform quality probe, PC : Phosphatidylcholine, MPa: Mega Pascal, F : applied force , N: Newton, Z : the position of the piezo scanner, d: the deflection of the tip at any time,  $\delta$ : the deformation,  $\nu$  :the Poisson's ratio,  $Z_0$ : zero separation point,  $d_0$ : initial cantilever deflection,  $k$ : the slope of the force-indentation curve,  $R$ : the radius of curvature of liposomes, h: the membrane thickness, C: correction factor, L: x dimension of the membrane without any force applied,  $l$ : x dimension of the buckled membrane, POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, SPC: Sphingosylphosphorylcholines, DOPC: 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, MD: molecular dynamics, m: meter, nm: nanometer, T: temperature,  $k_B$ : Boltzmann constant, s: strain.

## 1. Introduction

Liposomes are important drug delivery systems in pharmaceutical research<sup>1</sup>. They can be used as membrane models to study the properties of biological membranes and to investigate the effect of active agents on membrane properties<sup>2</sup>. They are generally composed of phospholipids, and have spherical structure consisting of a bilayer and/or a concentric series of multiple bilayers separated by aqueous compartments<sup>3</sup>. Liposomes can be obtained by various methods and are able to encapsulate hydrophobic, hydrophilic, and amphiphilic compounds, increasing their stability and controlling their release<sup>4-6</sup>. Lipid E80 liposomes formulations (also called Egg PC liposomes) are among the most commonly used liposomes in drug delivery, and can encapsulate a wide variety of compounds of various physico-chemical properties<sup>7-9</sup>.

Bending rigidity of liposomal membranes is a crucial elastic property, and affects the formation, stability, size, shape, aggregation, permeability, and loading efficiency of drugs in liposomes<sup>7,10–12</sup>. It has been shown that the effectiveness of drug delivery, the release profile of encapsulated drug from liposomes, and the circulation time of liposomes in the blood, are all related to their rigidity<sup>12,13</sup>. Unfortunately, quantifying this intrinsic property is still a challenge: a number of techniques have been devised, such as micropipette aspiration, shape fluctuation analysis, and X-ray scattering, and they provide different values for the bending modulus of liposomes with the same lipid composition, with differences up to a factor of 2 (see <sup>14</sup> for a review). Most importantly, all the above techniques are normally applied to giant unilamellar vesicles, with micrometer size, or require additives that may affect membrane rigidity<sup>14</sup>. Atomic force microscopy (AFM) has emerged as a technique to estimate membrane rigidity<sup>15</sup>. The main advantage of AFM is the possibility to perform measures on native nano-sized liposomes<sup>16</sup>. In addition, AFM can be used to scan the topography of liposome suspensions<sup>16</sup> and determine their size distribution<sup>17</sup>, to determine cell adhesion<sup>18</sup> and cell viscoelasticity<sup>19</sup>. AFM allows determining membrane rigidity in terms of Young modulus ( $E$ )<sup>20</sup>, which can be related to the bending modulus using different theories. Unfortunately, the values of Young modulus reported in the literature for membranes having the same lipid composition are even more scattered than the values of bending moduli obtained with other experimental techniques. For DPPC liposomes in the gel phase (at room temperature), Park *et al.* reported a value of 81 MPa<sup>21</sup>, over 25% lower than values reported by Delorme *et al.* ( $110 \pm 15$  MPa) and over 60% lower than the value reported by Takechi-Haraya *et al.* (227 MPa)<sup>15</sup>. Even larger discrepancies have been reported for Egg PC liposomes in the fluid phase: Liang *et al.* 2004 reported a value of  $1.97 \pm 0.75$  MPa, one order of magnitude less compared to the value reported by Takechi-Haraya *et al.* (19.68 MPa)<sup>15,22</sup>. Such large discrepancies make it impossible to compare values for different experimental conditions and different lipid compositions. The dependence of Young modulus on experimental parameters (tip apex<sup>23,24</sup>, the speed of indentation<sup>25</sup>, the bottom effect of the substrate<sup>26</sup>, and the calibration of the deflection sensitivity<sup>27</sup>) has been investigated before. It is clear that several factors affect the bending modulus values obtained by AFM, and it is paramount to understand the origins of the differences, and establish criteria to obtain reproducible measures.

In addition to the problem of reproducibility, it is also unclear how to compare values obtained from AFM for the Young modulus with values of the bending modulus obtained with other experimental techniques. Two theories are commonly used to convert the Young modulus to a bending modulus: The Hertz and Shell model<sup>28,29</sup>. Starting from the same Young modulus, the two theories yield different values of the bending modulus. The origin of the discrepancy is obviously the difference between the theories, but the question remains: which theory can better estimate the bending modulus?

In this work, we first describe how to achieve reproducible measures of the Young modulus using a common AFM apparatus. We repeated the measures on liposomes of approximately the same size, using four different kinds of AFM probes differing by the shape of the tip and the force constant of the cantilever. We determined which parameters affect the measure, and established a set of conditions allowing reproducible measures of the Young modulus.

In the second part of the work, we compare two common theoretical treatments used to calculate the bilayer bending modulus from the Young modulus. We also compare the two theories with experimental results obtained by other techniques and by molecular simulations. Our analysis shows that only one of the two theories provides a value of bending modulus compatible with literature data and with simulations.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Preparation of liposomes**

Lipoid E80, purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) is constituted of 80-86% egg phosphatidylcholine (PC), 7-9.5% phosphatidylethanolamine (PE), 3% lyso PC, 0.5% lyso PE, 1-2% sphingomyelin, 2% water, 0.2% ethanol, iodine value 65-69. Ethanol is furnished by Sigma Aldrich, France. Mica sheets (9 mm diameter and 0.1 mm thickness) from Nano and More, France, were used as a substrate. Two pyrex-nitride probes triangular cantilevers PNP-TR, (NanoWord



Innovative Technologies, Nano And More, Paris, France) integrating two oxide sharpened pyramidal tips with a radius  $< 10$  nm, macroscopic half cone angle  $35^\circ$  and two force constants, 0.08 N/m that corresponds to a cantilever (length of 200  $\mu\text{m}$  and width of 56  $\mu\text{m}$ ), and 0.32 N/m that corresponds to a cantilever (length of 100  $\mu\text{m}$  and width of 27  $\mu\text{m}$ ) were used for imaging and indenting liposomes. Two uniform quality probe Uniqprobes BioT with triangular cantilevers qp-BioT (NanoSensors TM, Nano And More, Paris, France) integrating a circular symmetric tips with a hyperbolic profile, a radius about 10 nm at the apex, half cone angle about  $15^\circ$  and two force constants of 0.08 and 0.32 N/m obtained using the cantilevers described above.

The ethanol injection method was applied to prepare the blank lipid E80 liposomes according to the protocol described by Azzi *et al.*<sup>7</sup>. Briefly, the required amounts of phospholipids (500 mg) were dissolved in absolute ethanol (10 ml). The obtained organic solution was then injected, using a syringe pump into ultra-pure water (20 ml) under magnetic stirring (400 rpm). The ethanol was removed by rotary evaporation at  $40^\circ\text{C}$  under reduced pressure and the liposome suspension was stored at  $4^\circ\text{C}$ . The AFM measurements was realized during the three months after the preparation of liposomes.

## 2.2. AFM measurements

AFM imaging and force measurements were performed at room temperature using an Agilent 5420 microscope (Key sight, California, USA) using the four AFM probes described before. In this work, the effect of the indenter on the membrane rigidity using AFM spectroscopy mode was studied. First, the impact of the tip shape (conical or pyramidal) using the same cantilever force constant ( $k = 0.08$  or  $0.32$  N/m) on the bending rigidity value was investigated. Second, the rigidity values were determined by changing the cantilever force constant and keeping the same tip shape.

The liposomal suspension was diluted 10 times in ultrapure water before deposition on the mica surface and left for 10 to 15 min in air drying medium for adsorption. Then we rinsed the surface by ultrapure water to remove the non-adsorbed vesicles and directly scanned the surface. With

this procedure, the effective concentration of liposomes on the mica support is reduced and adsorbed liposomes remain hydrated.

The sample was then imaged in contact mode, similar to El-Thakafy et al.<sup>30</sup>, with a typical scan rate of 1 Hz, resolution of 512 x 512 pixels per image, 2x2  $\mu\text{m}^2$  image size, scanning angle of  $0^\circ$ , and a set point typically below 0.1 nN. At least 120 force curves were recorded for 120 different liposomes (one curve per liposome) for each AFM probe in force spectroscopy mode. Each curve was obtained by indenting centrally an adsorbed vesicle with a maximum force of 1.5 nN and a rate of 0.145  $\mu\text{m/s}$ . Before the indentation measurement, the deflection sensitivity (deflection/voltage ratio) was calibrated on a clean mica surface. Notice that, in all pictures of force curves reported in the present work, we show only the approach curve and only the portion of the curve with force lower than 450 pN. Multiple force curves were registered on and around the vesicles to confirm that the tip interacts with the vesicles. The force calibration plot was converted into force versus deformation by determining the point of zero force and the point of zero separation ( $Z_0$ ). Zero force was determined where the separation tip-sample is large enough and the cantilever deflection attains its constant initial value  $d_0$ .  $Z_0$  was identified where the deflection of the cantilever was linear with the expansion of the piezo scanner.

### **2.3. AFM data analysis: extraction of the Young modulus and bending modulus**

The Young modulus can be extracted from AFM measures using known relationships between force and liposome deformation, known as the Hertz<sup>28</sup> and Shell<sup>29</sup> models. Both models are valid in the elastic regime, which corresponds to small indentations. In this case, the penetration of the AFM tip into the liposome should not exceed 10% of its diameter<sup>31</sup>.

The Hertz model provides relationships linking the measured force with the measured deformation, taking into account the shape of the AFM tip. For a blunted four-sided rigid regular pyramid with half angle  $\theta$ , the Young modulus ( $E$ ) of the sample can be determined using the equation by Rico *et al.*<sup>24</sup> :

$$F = \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{E \tan \theta}{(1-\nu^2)} \delta^2 = \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{E \tan \theta}{(1-\nu^2)} (|Z - Z_0| - (d - d_0))^2 \quad (\text{Equation 53})$$

where  $F$  is the applied force (N),  $Z$  is the position of the piezo scanner,  $d$  is the deflection of the tip at any time; the deformation  $\delta$  (nm) is defined as the distance between the piezo scanner ( $Z - Z_0$ ) and cantilever deflection ( $d - d_0$ );  $\nu$  is the Poisson's ratio (approximately equal to 0.5 for biological system). The Young modulus is calculated by measuring  $F$  as a function of  $\delta$ , and performing a linear fit in the elastic region of the curve, assuming that the tip is much stiffer than the liposomes.

For a conical tip with half cone angle  $\alpha$ , the force-deformation relationship according to the Hertz model is: <sup>32</sup>

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E \tan \alpha}{(1-\nu^2)} \delta^2 = \frac{2}{\pi} \frac{E \tan \alpha}{(1-\nu^2)} (|Z - Z_0| - (d - d_0))^2 \quad (\text{Equation 54})$$

It has been reported that the use of the Hertz model to analyze AFM force-deformation curves on vesicles may lead to an underestimation of the bending rigidity. The Shell model takes into account the radius of curvature of the liposome and the membrane thickness<sup>29</sup>, but not the size of the AFM tip. The modified Shell also takes into account the size of the AFM tip:

$$F = \frac{E4h^2 C}{R\sqrt{3(1-\nu^2)}} \delta \quad (\text{Equation 55})$$

where  $R$  is the radius of curvature of the indented liposomes, and  $h$  is the membrane thickness;  $C$  is a correction factor introduced by Berry *et al.*<sup>33</sup> to compensate for the fact that the measured indentation is the sum of indentations caused by both the indenter and the substrate; the Poisson's ratio ( $\nu$ ) is typically assumed to be 0.5 and the membrane thickness 4 nm. Again, force-deformation curves were fitted in the elastic region (more details in Results).

Once the Young modulus ( $E$ ) was obtained using either the Hertz or the Shell relationship, the bending modulus  $k_c$  can be estimated from the following relation<sup>20</sup>:

$$k_c = \frac{Eh^3}{12(1-\nu^2)} \quad (\text{Equation 56})$$

This mathematical relation results from the integration of membrane stresses, assuming that they vary linearly through the shell thickness.

## 2.4. Calculation of bending modulus $k_c$ by molecular dynamics simulations

We calculated the bending modulus  $k_c$  using the buckling method by Noguchi<sup>34</sup>, revised by Deserno<sup>35</sup>. This is a ground state method, as it does not require sampling of fluctuations, which typically require long simulation times<sup>14</sup>. It is based on the calculation of the stress-strain relation in a buckled membrane<sup>35</sup>, relying on the Helfrich Hamiltonian, a continuum theory considering the bilayer membrane as a homogeneous elastic sheet<sup>36</sup>. The method requires applying pressure laterally on a bilayer membrane, for example along the  $x$  axis ( $x$ - $y$  being the membrane plane, and  $z$  the bilayer normal) until it buckles; once a buckle is produced, the compression is stopped, and a long simulation is carried out with fixed  $x$  and  $y$  dimensions. The force exerted by the membrane on the lateral walls can be easily calculated in the simulations, and the relationship between the force and the strain provides directly the bending modulus. The strain is defined as:  $s = \frac{L-l}{L}$ , where  $L$  is the  $x$  dimension of the membrane without any force applied, and  $l$  is the  $x$  dimension of the buckled membrane. The equation connecting the force with the strain is<sup>35</sup>:

$$F_x(s) = 4\pi^2 k_c \frac{L_y}{L^2} \sum_{i=0}^{\infty} b_i s^i \quad (\text{Equation 57})$$

where the  $b_i$  are numeric coefficients derived analytically by minimizing the energy of the system as expressed by the Helfrich Hamiltonian<sup>35</sup>.

We carried out simulations of three lipid bilayers that differ by the lipid compositions. The three simulation boxes were of similar size ( $L_x = 40$ ,  $L_y = 10$ ,  $L_z = 40$  nm). Based on our recently work, such size is beyond the minimum threshold for reliable estimates with this method<sup>37</sup>. The first box contained POPC and water (1352 lipid molecules and 124496 water molecules), the second one was composed of POPC, POPE, and water, with POPC:POPE molar ratio 90:10 (1344 lipid molecules and 124600 water molecules), and the third one was a mixture of POPC, POPE, and SPC, with a POPC:POPE:SPC ratio of 86:10:4 (1344 lipid molecules with 150708 water molecules). All simulations were carried out with the MARTINI coarse-grained force field<sup>38,39</sup>, version 2.0. In general, a four-to-one mapping is used in MARTINI, *i.e.* on average four heavy atoms are

represented by a single interaction center, with an exception for ring-like molecules. This representation was chosen as an optimum between the computational efficiency and chemical representability. Such model is easy to use and allows systems to be studied on longer time and length scale than more detailed atomistic models.

The following protocol was applied for all the simulations performed in this study. The three simulation boxes were equilibrated in the isothermic-isobaric ensemble. Once the systems were equilibrated, production runs were carried out for  $2 \mu s$  with fixed  $y$  dimensions, using the anisotropic pressure coupling with zero compressibility along the  $y$  dimension (and non-zero compressibility along the  $x$  and  $z$  dimensions). The pressure was set to 1 bar along the  $x$  and  $z$  dimensions, which allows to calculate the box length along the  $x$  dimension ( $L_x$ ) at zero surface tension.

Then we carried out buckling simulations. The membrane was buckled by applying a stress in the  $x$  direction for 600 ns to attain a strain of 20% of the initial length. Once the desired strain was achieved, a production simulation was performed (for  $8 \mu s$ ) with fixed box sizes in the  $x$  and  $y$  directions (through anisotropic pressure coupling with zero compressibility in the  $x$  and  $y$  directions), in order to calculate the pressure and hence the force exerted by the membrane in the  $x$  direction (deduced from the  $xx$  component of the stress tensor, averaged during the production run, and the  $L_y$  and  $L_z$  dimensions).

In all simulations we used the leap-frog algorithm for the integration of the equation of motion, with an integration time step of 20 fs. The Lennard-Jones and Coulomb interactions were cut off at 1.2 nm, with the potentials shifted to zero at the cut off. The Lennard-Jones potential is shifted from  $r_{shift} = 0.9 \text{ nm}$  to  $r_{cut}$ , while the electrostatic potential is shifted from 0 nm to  $r_{cut}$ . Generation of the neighbor list was performed using the Verlet scheme. The temperature was fixed at 298 K using the Bussi-Donadio-Parrinello algorithm (v-rescale in Gromacs)<sup>40</sup>, with a time constant of 1 ps. For equilibration runs, we used the Berendsen pressure coupling algorithm<sup>40</sup>, with coupling time constant of 10 ps and a reference pressure of 1 bar. For production runs, we used the Parinello-Rahman barostat<sup>41</sup>.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Imaging and size distribution of liposomes

Egg PC liposomal suspensions, prepared by ethanol injection method as described before, were diluted 10 times in ultrapure before deposition on mica substrate, and left for 10 to 15 min for adsorption. We used AFM in contact mode, similar to El-Thakafy et al.<sup>30</sup>, for the visualization of the adsorbed liposomes on the mica substrate by applying small setpoint force during the scan in order to avoid vesicles damage. We noticed that all AFM probes, independently of their shape or cantilever force constant, allow the observation of well adsorbed vesicles on mica surface, in accordance with the literature<sup>42</sup>. Figure 1 shows nano-sized spherical-cap structures on the substrate. We obtained a broad range of liposomes sizes, ranging from 40 to 350 nm, with a peak around 120 nm, as assessed by laser granulometry (see Figure 1). The distribution matches the one obtained by AFM (data not shown). We then select liposomes between 55 and 85 nm for our study on bending rigidity, due to the higher pharmaceutical interest of smaller liposomes<sup>2,4,7</sup>. For each probe, around 120 liposomes were included in the statistical analysis. The mean value of the size was calculated by averaging the diameter and the height of all the liposomes imaged by sectional analysis, which yielded values of the diameter  $D = 74 \pm 10 \text{ nm}$  and height  $H = 15 \pm 2 \text{ nm}$ , independently of the kind of the probe.

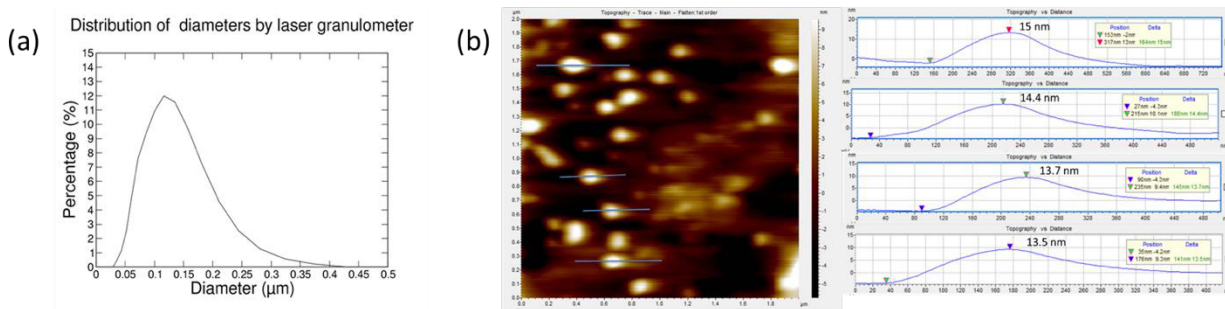


Figure 31: (a) Distribution of liposomes diameter by laser granulometry, and (b) EggPC vesicles on mica substrate, imaged by AFM in contact mode; some cross-section profiles are shown in the insets.

### 3.2. Bending rigidity of Egg PC liposomes: AFM measurements

We measured the elastic deformation of liposomes adsorbed on mica substrate upon application of force by the AFM tip. Figure 2 shows a few force-deformation curves, one for each of the four used probes (conical and pyramidal, with 2 different force constants for each shape).

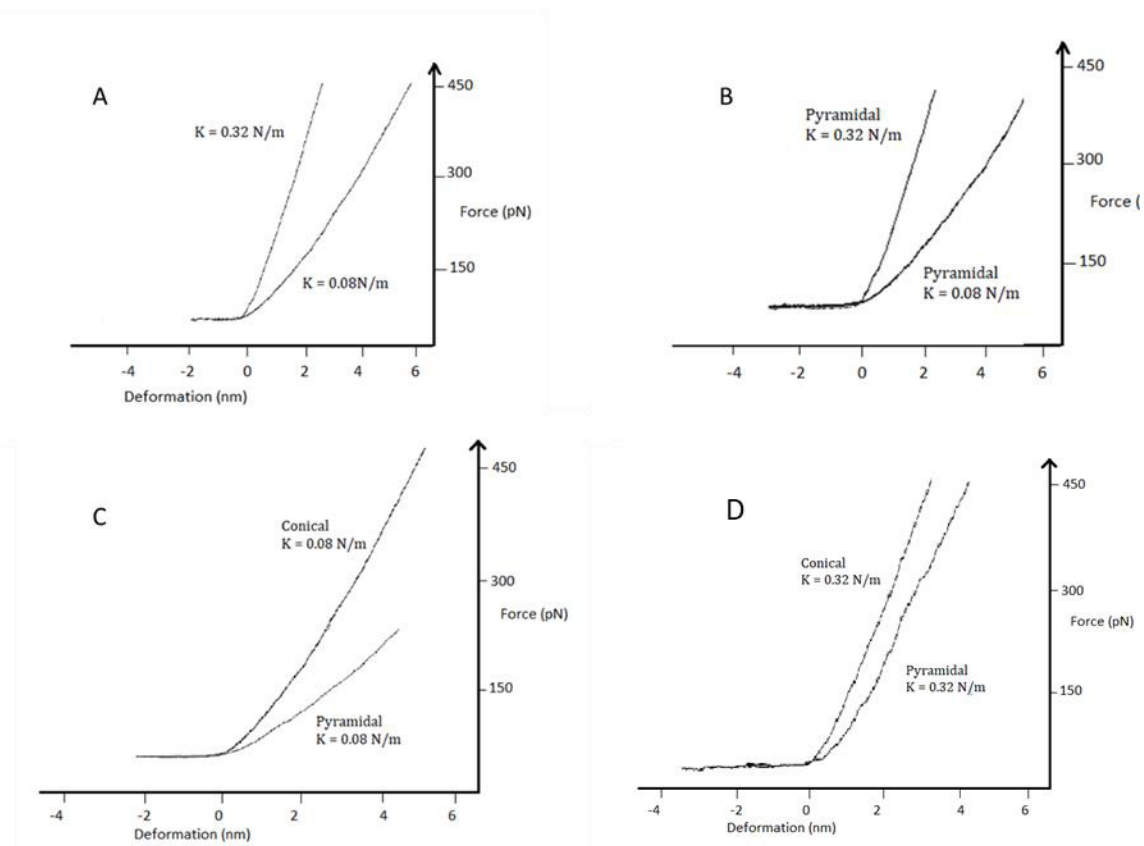


Figure 32: Examples of the approach force-deformation curves, obtained from EggPC liposomes by different AFM probes: (A) Same conical shape and two different force constants, 0.08 and 0.32 N/m , (B) Same pyramidal shape and two different force constants, 0.08 and 0.32 N/m, (C) Same force constant  $k = 0.08$  N/m and two different shapes (conical and pyramidal), and (D) Same force constant  $k = 0.32$  N/m and two different shapes (conical and pyramidal). The curves selected here present a bending modulus close to the average values.

The Young Modulus and bending modulus were extracted from force-deformation curves as detailed in Section 2.4. Fitting only 10% of the curve (i.e., 1.5 nm on average), as per standard procedure, does not provide sufficient sampling for high quality fits. Hence, we increased the fitting zone up to 5 nm; this way, the indentation corresponds to a force  $\leq 450$  pN, as shown in Figure 2. No breakthrough event occurred at  $\sim 450$  pN, and the shape of the curves in the indentation zone was approximately linear. Because we expanded the fitting zone to 5 nm, we needed to take into account the so-called “bottom effect correction”, developed by Berry *et al.*<sup>33</sup>, as mentioned in Methods (equation 3). Table 1 reports the values of both Young and bending modulus, averaged over 120 liposomes for each probe (480 measures in total; 120 liposomes per AFM condition).

*Table 1: Young Modulus  $E$  (MPa) and bending modulus  $k_c(k_B T)$  of Egg PC liposomes determined by AFM using both the Hertz and Shell models. For pyramidal tips, the force constants were  $k = 0.08$  and  $0.32$  N/m. For conical tips, the force constants were  $k = 0.08$  and  $0.32$  N/m.*

AFM probes	Pyramidal K = 0.08 N/m	Pyramidal K = 0.32 N/m	Conical K = 0.08N/m	Conical K = 0.32 N/m
Young Modulus (MPa)	$0.026 \pm 0.005$	$0.082 \pm 0.02$	$0.036 \pm 0.01$	$0.48 \pm 0.03$
Hertz model				
Bending Modulus ( $k_B T$ )	0.05	0.14	0.05	0.75
Young Modulus (MPa)	$17.7 \pm 5.6$	$41.9 \pm 13$	$22 \pm 5.3$	$51.7 \pm 15$
Shell model				
Bending Modulus ( $k_B T$ )	$30.5 \pm 9.6$	$72.5 \pm 22.5$	$38 \pm 9.1$	$89.4 \pm 26$

Table 1 shows that the values of elastic moduli depend very strongly on the theory used to interpret the data, with differences of 2 to 3 orders of magnitude in both moduli. The values also



depend strongly on the type of tip (shape and force constant) used in the experiments, but in this case the discrepancies are of about 1 order of magnitude for the Young modulus. The difference between Shell (data not shown) and modified Shell model (data in Table 1) is 20% (for AFM apexes of the size used here), comparable to the statistical uncertainty of the AFM measurements (about 30%). For example, for the pyramidal tip with 0.08 N/m cantilever force constant, we found with the modified Shell model a value of  $30.4 \pm 9.6 k_B T$  (Table 1) while standard Shell model yields  $38.2 \pm 9.8 k_B T$  (data not shown).

Variations of the Young modulus with the tip shape, force constant, and theory have previously been reported in the literature. Table 2 summarizes the available AFM measurements of Young modulus published in the literature for different membranes where the tip characteristics, cantilevers force constant, mathematical model, and lipid compositions are presented.

Table 2. Comparison of Young modulus of liposomes of different compositions reported in the literature; lipid composition, the tip shape, tip radius, cantilever force constant, lipid type, Temperature, and the mathematical model are presented.

Tip shape	Sphere	Sphere	Pyramid	Triangular		Spherical	Pyramidal
Tip radius (nm)	20	10	20	20		$33.2 \pm 6.6$	20
Force constant (N/m)	0.2	0.02	0.15	0.03		0.17 N/m	0.15
Mathematical Model	Hertz	Shell	Shell	Modified Shell		Hertz	Shell
Temperature (°C)	20	Room temperature*	Room temperature*	25		22	Room temperature*
Lipid compositions	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC	DOPC	Egg PC	Egg PC
Young-Modulus E (MPa)	81 [21]	$110 \pm 15$ [43]	227 [28]	$116 \pm 45$ [30]	$13 \pm 9$ [30]	$1.97 \pm 0.75$ [22]	19.68 [15]
Bending Modulus ( $k_B T$ )	142.4	190.2	392.5	200.6	22.5	3.4	34

\* We use 25°C for room temperature to calculate  $k_c$  in  $k_B T$ .

Our data (Table 1) show that the estimated Young modulus increases with cantilever stiffness, independently of AFM tip shape. This result is also independent of the theory used to analyze the data, hence it appears to stem from differences in the interaction of the AFM tip with the sample. As indicated in Table 1, at the higher force constant, the interaction force between the liposome and the AFM tip is higher, reflecting a steeper slope in the force-deformation curves. Indenting a vesicle with a stiffer cantilever induces a larger deformation in the liposome, hence higher resistance from the vesicle against the tip, that generates a stronger interaction and steeper curves.

Results reported in the literature (Table 2) follow the same trend. For DPPC lipid membrane, the Young modulus obtained by Takechi-Haraya *et al.* (227 MPa) using a stiff cantilever of 0.15 N/m is higher than the one obtained by Delorme *et al.* (110 MPa) using a relatively soft cantilever (force constant of 0.03 N/m<sup>15,43</sup>). Results by El-Thakafy *et al.*, are in line with those by Delorme, although using softer cantilever force (0.02 N/m), possibly due to the compensating effect of divalent calcium ions<sup>30</sup>. We notice that divalent cations have a real effect on structural, dynamic, and elastic properties of membranes, hence discrepancies in elastic moduli due to the presence of divalent ions have nothing to do with reproducibility issues in AFM measures.

The relevance of cantilever force constant has been recognized before. Schiller *et al.* addressed the reproducibility problem by devising a novel, superior procedure for the calibration of the deflection sensitivity and cantilever force constant<sup>27</sup>, named Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP). Using SNAP method for the calibration yields more accurate measures of cantilever force constants, which in turn produce more accurate measures of the force. Based on our results, the cantilever force constant has a strong effect on the apparent rigidity; hence, the SNAP method should represent a major step towards improving the reproducibility of AFM measures.

The difference in the Young modulus values obtained with different tip shapes is not as large as the difference due to the cantilever stiffness. In our experiments, this may be due to the similarity in the size of the apex (10 and 8 nm radius for the conical and pyramidal shapes, respectively). Other authors reported before that the liposome's apparent rigidity depends on the way of penetration of the AFM tip in the vesicles during the indentation process. Rico *et al.*<sup>24</sup> measured the rigidity of agarose gel with pyramidal and spherical tips, and found apparently larger values of Young modulus with the former. Daan *et al.*<sup>44</sup> showed that the larger the apex, the stronger the interaction forces with liposomes. This was ascribed to the energy cost of liposome deformation: the larger the apex, the stronger the deformation of the liposome. Similar findings were reported by Saavedra *et al.* on supported lipid bilayers (SLBs), showing strong dependence of the mechanical response on the size of the AFM tip<sup>23</sup>. In our case, the radii of the two tips are similar, leading to similar energy cost for membrane deformation, which is consistent with the small difference between our measured values.

As shown in Table 2, only two studies were conducted on Egg PC liposomes<sup>15,22</sup>. The Young modulus values determined in our study for Egg PC liposomes are in agreement with Takechi-Haraya *et al.* (19.68 MPa) for both conical and pyramidal tip shapes with a cantilever force constant of 0.08 N/m ( $17.6 \pm 5.6$  and  $22 \pm 5.3$  MPa, respectively), using the modified Shell model, but quite different from that obtained by Liang *et al.* (1.97 MPa, obtained with a cantilever force constant of 0.17 N/m). Such discrepancies can be due to the large difference in size between the apex tips (10 and 8 nm in our study vs. 33 nm in Liang *et al.*<sup>15</sup>).

While cantilever force constant, tip shape, and tip size affect the measure of Young modulus, our data shows that the most prominent effect is linked to the choice of the theory used to extract elastic moduli from force-deformation data. Considering the same tip shape and cantilever force constant, Hertz and Shell theories yield values that differ by 2 to 3 orders of magnitude, with the Shell model giving the higher values. In the Hertz model, the Young modulus depends directly on the contact area between the tip and the liposome surface, but not on the liposome radius. The

Shell theory, instead, assumes a point contact between the liposome and the AFM tip, and assumes a dependence of the Young modulus on the vesicle radius (see equation 3). Higher estimates of membrane rigidity with the Shell model were also reported by other authors (see Table 2), but the differences were not as large as the ones obtained here; for example, the difference between Liang *et al.* (Hertz model, 1.97 MPa) and Takechi-Haraya *et al.* (Shell model, 19.8 MPa) for Egg PC liposomes is only 1 order of magnitude. Similarly, for gel-phase DPPC, the difference between values reported by Jin-Won Park (Hertz model, 81 MPa) and Takechi-Haraya *et al.* (Shell model, 227 MPa) is only a factor of 3. However, we notice that the comparison among previous studies is problematic: as shown above, many factors (tip shape, cantilever force constant, size of liposomes) affect the interpretation of the data, and those could explain the reduced discrepancy between the two theories found in previous studies. For Egg PC liposomes, the apex of the tip used by Liang *et al.* is around 33 nm, larger than that used by Takechi-Haraya (~20 nm), and the force constant is higher (0.17 N/m vs. 0.15 N/m). The size of liposomes may also play a role in reducing the difference: Liang *et al.* used smaller liposomes (around 60 nm vs.  $100 \pm 33$  nm), but we have not assessed in detail the effect of liposome size on the measured elastic constant. In the present study, instead, we compare bending rigidities obtained from exactly the same measures, on the same liposomes, hence discrepancies are exclusively due to the interpretative model.

### 3.3. Comparing AFM measures with other techniques

The differences between the results obtained with the two theories are major, but which one provides the more realistic estimates? A direct comparison with other experimental techniques and with simulation is problematic, as such techniques only provide estimates for the bending modulus, not the Young modulus. To make such comparison, we need to convert the values of Young modulus into bending modulus, using yet another theory, that is independent of the Hertz and Shell theories (equation 4, from ref.<sup>20</sup>). Table 3 reports bending modulus values for POPC and

DOPC lipid membranes in the fluid phase, reported in the literature and determined using different experimental and simulation techniques.

*Table 3: Comparison of bending modulus of POPC and DOPC lipid membranes reported in the literature; lipid type, temperature, and the techniques are presented. [39] [40] [41] [42] [43] [44]*

	POPC				
	Experiments			Simulation	
Techniques	Micropipette Aspiration	Electro-deformation	X-ray scattering	Coupled Undulatory	
Temperature (°C)	25	24	30	47	
$k_c(k_B T)$	36.5 [45]	14.15 [46]	20.3 [47]	19.7 [48]	
	DOPC				
	Experiments				Simulation
Techniques	Micropipette Aspiration	flicker spectroscopy	X-ray scattering	Electro-deformation	Lipid orientation fluctuation
Temperature (°C)	Room	23	18	23	25
$k_c(k_B T)$	23.1 [49]	26.4 [50]	21.16 [51]	22.6 [50]	27.72 [52]

Based on data in the literature, and assuming the validity of the theory to convert the Young modulus into bending modulus, it is evident that the Hertz theory (applied to the small liposomes used here) severely underestimates the membrane bending modulus. The discrepancy between the values found in this work using the Hertz theory and the values obtained by most other experimental techniques is about 3 orders of magnitude when considering soft cantilevers, and 2 orders of magnitude when considering stiff cantilevers. On the other hand, the values obtained here using the Shell model match quite closely the experimental values obtained with other techniques, particularly when weaker cantilever force constants are considered. This finding is in agreement with a previous study based on finite element modeling<sup>52</sup>. We speculate that, in the

Hertz model, neglecting the dependency of liposome stiffness on its diameter, and considering liposomes as homogeneous, isometric and semi-infinite body structure, are the main cause of such discrepancy. In our case, the tip radius is around 10 nm for both conical or pyramidal shapes and the diameter of the liposomes is 55~85 nm, then considering liposomes as semi-infinite body is problematic. The modified Shell model, instead, considers the effect of the external force on whole liposome and takes into account the thickness of the bilayer.

### 3.4. Bending modulus from buckling simulations

We used the buckling method to calculate the bending modulus for three membranes with different composition. We obtained values of  $28.7 \pm 2.1 k_B T$  for a pure POPC membrane,  $26.9 \pm 1.9 k_B T$  for a bilayer containing 90% POPC and 10% POPE, and  $29 \pm 2.1 k_B T$  for a bilayer consisting of 86% POPC, 10%POPE, and 4% of SPC. The composition in the latter simulation mimics the EggPC liposomes used in the experimental AFM measurements. The results for the three different compositions are within the statistical uncertainty, so it is difficult to assess the effect of the different lipids on the bending rigidity of the membrane. More extensive sampling would probably solve this problem, but this is beyond the scope of the current work, since the statistical uncertainty obtained from AFM measures is substantially larger than the statistical uncertainty from simulations. The similarity in the values obtained for different compositions is expected, as the percentage of POPE and SPC in the bilayers is low, and the bending modulus is mostly determined by POPC. As we showed previously, the value of bending modulus in bilayer mixtures can be approximated as a linear combination of the values for the individual components, as long as the system is close to ideal mixing<sup>37</sup>; the values of bending modulus of pure POPC and pure POPE systems at 298K are similar<sup>37</sup>, and the two lipids mix nearly ideally<sup>37</sup>, hence the elastic moduli of their mixtures should also be similar.

We then compared experimental results with the results of our simulations. First of all, we notice that the agreement between simulations and the experimental data obtained is reasonable, except when considering AFM data interpreted with the Hertz theory. Second, the best

agreement is observed when comparing simulations of pure POPC membrane ( $k_c = 28.7 k_B T$ ) with data from micropipette aspiration ( $36.5 k_B T$  in Table 3) and AFM obtained for Egg PC liposomes with weak cantilever force constant ( $28.3$  and  $34.8 k_B T$  for pyramidal and conical tip shape, respectively; see Table 1). Simulation results for the Egg PC-mimicking composition (POPC:POPE:SPC molar ratio of 86:10:4) are very close to the values obtained by micropipette aspiration for both DOPC and POPC lipids<sup>46,49</sup>, and also similar to the value obtained in our experiments using a pyramidal tip, a weak cantilever force constant, and the Shell theory to interpret the data. Third, as expected based on the experimental data above, the shape of the tip seems to be not very critical for the agreement between AFM data and simulations: when using the same cantilever force constant, the values of bending moduli extracted from the measures are within 20% of the simulation value for the conical tip and within 2% for the pyramidal tip, but in both cases the statistical uncertainty of the AFM measure is substantially larger than the deviation from the simulation results.

## 4. Conclusions

The present work tackles the issue of reproducibility and interpretation of AFM measurements in terms of membrane bending rigidity. Most of the previous works reporting the bending rigidity obtained by AFM used only one type of probe and one interpretative model. Here we have assessed the bending rigidity of Egg PC liposomes using different AFM tips, and we interpreted the data using both the Hertz and (modified) Shell theory. We found that the tip shape of the AFM probe, its cantilever force constant, and the mathematical model all affect the bending modulus values, and that the choice of the theory makes the largest differences in the interpretation of the data. The Shell theory provides the closest agreement between our AFM data and other experimental data for the membrane bending modulus. Overall, literature results are in line with our findings, and confirm that the measured Young moduli increase with increasing cantilever force constant.



Finally, we compared experimental results with molecular dynamics simulations, and found reasonable agreement of the calculations with one particular experimental setup (pyramidal or conical tips, cantilever force constant of 0.08 N/m) and by applying the modified Shell model. The work highlights the dependence of estimated membrane rigidity on the precise conditions and materials used in the AFM measures and, even more, on the interpretative model.

## 5. References

- (1) Zylberberg, C.; Matosevic, S. Pharmaceutical Liposomal Drug Delivery: A Review of New Delivery Systems and a Look at the Regulatory Landscape. *Drug Delivery* **2016**, *23* (9), 3319–3329. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>.
- (2) Habib, L.; Jraij, A.; Khreich, N.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Effect of Erythrodiol, A Natural Pentacyclic Triterpene from Olive Oil, on the Lipid Membrane Properties. *J. Membr. Biol.* **2015**, *248* (6), 1079–1087. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9821-x>.
- (3) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13* (1), 238-IN27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- (4) Sebaaly, C.; Jraij, A.; Fessi, H.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Preparation and Characterization of Clove Essential Oil-Loaded Liposomes. *Food Chem* **2015**, *178*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.067>.
- (5) Hammoud, Z.; Gharib, R.; Fourmentin, S.; Elaissari, A.; Greige-Gerges, H. New Findings on the Incorporation of Essential Oil Components into Liposomes Composed of Lipoid S100 and Cholesterol. *International Journal of Pharmaceutics* **2019**, *561*, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.022>.
- (6) Ephrem, E.; Najjar, A.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Encapsulation of Natural Active Compounds, Enzymes, and Probiotics for Fruit Juice Fortification, Preservation, and Processing: An Overview. *Journal of Functional Foods* **2018**, *48*, 65–84. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.021>.
- (7) Azzi, J.; Jraij, A.; Auezova, L.; Fourmentin, S.; Greige-Gerges, H. Novel Findings for Quercetin Encapsulation and Preservation with Cyclodextrins, Liposomes, and Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposomes. *Food Hydrocolloids* **2018**, *81*, 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.006>.
- (8) Laouini, A.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Holdich, R. G.; Vladisavljević, G. T. Preparation of Liposomes: A Novel Application of Microengineered Membranes - Investigation of the Process Parameters and Application to the Encapsulation of Vitamin E. *RSC Adv.* **2013**, *3* (15), 4985–4994. <https://doi.org/10.1039/C3RA23411H>.
- (9) Fathi-Azarbayjani, A.; Ng, K. X.; Chan, Y. W.; Chan, S. Y. Lipid Vesicles for the Skin Delivery of Diclofenac: Cerosomes vs. Other Lipid Suspensions. *Adv Pharm Bull* **2015**, *5* (1), 25–33. <https://doi.org/10.5681/apb.2015.004>.

- (10) Briuglia, M.-L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D. A. Influence of Cholesterol on Liposome Stability and on in Vitro Drug Release. *Drug Deliv Transl Res* **2015**, *5* (3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>.
- (11) Takechi-Haraya, Y.; Sakai-Kato, K.; Goda, Y. Membrane Rigidity Determined by Atomic Force Microscopy Is a Parameter of the Permeability of Liposomal Membranes to the Hydrophilic Compound Calcein. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (5), 1887–1893. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0624-x>.
- (12) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Impact of Particle Elasticity on Particle-Based Drug Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *108*, 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.007>.
- (13) Kloxin, A. M.; Benton, J. A.; Anseth, K. S. In Situ Elasticity Modulation with Dynamic Substrates to Direct Cell Phenotype. *Biomaterials* **2010**, *31* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.025>.
- (14) Bochicchio, D.; Monticelli, L. Chapter Five - The Membrane Bending Modulus in Experiments and Simulations: A Puzzling Picture. In *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*; Iglič, A., Kulkarni, C. V., Rappolt, M., Eds.; Academic Press, 2016; Vol. 23, pp 117–143. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2016.01.003>.
- (15) Takechi-Haraya, Y.; Sakai-Kato, K.; Abe, Y.; Kawanishi, T.; Okuda, H.; Goda, Y. Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. *Langmuir* **2016**, *32* (24), 6074–6082. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741>.
- (16) Habib, L.; Jraij, A.; Khreich, N.; Fessi, H.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Morphological and Physicochemical Characterization of Liposomes Loading Cucurbitacin E, an Anti-Proliferative Natural Tetracyclic Triterpene. *Chemistry and Physics of Lipids* **2014**, *177*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.006>.
- (17) Allison, D. P.; Mortensen, N. P.; Sullivan, C. J.; Doktycz, M. J. Atomic Force Microscopy of Biological Samples. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2010**, *2* (6), 618–634. <https://doi.org/10.1002/wnan.104>.
- (18) Puech, P.-H.; Poole, K.; Knebel, D.; Muller, D. J. A New Technical Approach to Quantify Cell-Cell Adhesion Forces by AFM. *Ultramicroscopy* **2006**, *106* (8–9), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2005.08.003>.
- (19) Tripathy, S.; Berger, E. J. Measuring Viscoelasticity of Soft Samples Using Atomic Force Microscopy. *J Biomech Eng* **2009**, *131* (9), 094507. <https://doi.org/10.1115/1.3194752>.
- (20) Evans, E. A. Bending Resistance and Chemically Induced Moments in Membrane Bilayers. *Biophys J* **1974**, *14* (12), 923–931.
- (21) Park, J.-W. Effect of Aminoglycoside on Mechanical Properties of Zwitterionic Phospholipid Vesicles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2011**, *88*, 517–520. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.046>.
- (22) 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* (1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.042>.
- (23) Saavedra V., O.; Fernandes, T. F. D.; Milhiet, P.-E.; Costa, L. Compression, Rupture, and Puncture of Model Membranes at the Molecular Scale. *Langmuir* **2020**, *36* (21), 5709–5716. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00247>.

- (24) Rico, F.; Roca-Cusachs, P.; Gavara, N.; Farré, R.; Rotger, M.; Navajas, D. Probing Mechanical Properties of Living Cells by Atomic Force Microscopy with Blunted Pyramidal Cantilever Tips. *Phys. Rev. E* **2005**, *72* (2), 021914. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.72.021914>.
- (25) Lamour, G.; Allard, A.; Pelta, J.; Labdi, S.; Lenz, M.; Campillo, C. Mapping and Modeling the Nanomechanics of Bare and Protein-Coated Lipid Nanotubes. *Phys. Rev. X* **2020**, *10* (1), 011031. <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.10.011031>.
- (26) Chiodini, S.; Ruiz-Rincón, S.; Garcia, P. D.; Martin, S.; Kettelhoit, K.; Armenia, I.; Werz, D. B.; Cea, P. Bottom Effect in Atomic Force Microscopy Nanomechanics. *Small* **2020**, *16* (35), 2000269. <https://doi.org/10.1002/sml.202000269>.
- (27) Schillers, H.; Rianna, C.; Schäpe, J.; Luque, T.; Doschke, H.; Wälte, M.; Uriarte, J. J.; Campillo, N.; Michanetzis, G. P. A.; Bobrowska, J.; Dumitru, A.; Herruzo, E. T.; Bovio, S.; Parot, P.; Galluzzi, M.; Podestà, A.; Puricelli, L.; Scheuring, S.; Missirlis, Y.; Garcia, R.; Odorico, M.; Teulon, J.-M.; Lafont, F.; Lekka, M.; Rico, F.; Rigato, A.; Pellequer, J.-L.; Oberleithner, H.; Navajas, D.; Radmacher, M. Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 5117. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05383-0>.
- (28) Greenwood, J.; Tripp, J. The Elastic Contact of Rough Spheres. *Journal of Applied Mechanics* **1967**, *34*. <https://doi.org/10.1115/1.3607616>.
- (29) Reissner, E. Stresses and Small Displacements of Shallow Spherical Shells. II. *Journal of Mathematics and Physics* **1946**, *25* (1–4), 279–300. <https://doi.org/10.1002/sapm1946251279>.
- (30) Et-Thakafy, O.; Delorme, N.; Gaillard, C.; Mériadec, C.; Artzner, F.; Lopez, C.; Guyomarc'h, F. Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy. *Langmuir* **2017**, *33* (21), 5117–5126. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00363>.
- (31) Monclus, M. A.; Young, T. J.; Di Maio, D. AFM Indentation Method Used for Elastic Modulus Characterization of Interfaces and Thin Layers. *Journal of Materials Science* **2010**, *45* (12), 3190–3197. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4326-6>.
- (32) Lin, D. C.; Dimitriadis, E. K.; Horkay, F. Robust Strategies for Automated AFM Force Curve Analysis--I. Non-Adhesive Indentation of Soft, Inhomogeneous Materials. *J Biomech Eng* **2007**, *129* (3), 430–440. <https://doi.org/10.1115/1.2720924>.
- (33) Berry, J. D.; Mettu, S.; Dagastine, R. R. Precise Measurements of Capsule Mechanical Properties Using Indentation. *Soft Matter* **2017**, *13* (10), 1943–1947. <https://doi.org/10.1039/C6SM02841A>.
- (34) Noguchi, H. Anisotropic Surface Tension of Buckled Fluid Membranes. *Phys. Rev. E* **2011**, *83* (6), 061919. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.83.061919>.
- (35) Hu, M. (胡明陽); Diggins, P.; Deserno, M. Determining the Bending Modulus of a Lipid Membrane by Simulating Buckling. *J. Chem. Phys.* **2013**, *138* (21), 214110. <https://doi.org/10.1063/1.4808077>.
- (36) Helfrich, W. Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments. *Z Naturforsch C* **1973**, *28* (11), 693–703. <https://doi.org/10.1515/znc-1973-11-1209>.

- (37) Eid, J.; Razmazma, H.; Jraij, A.; Ebrahimi, A.; Monticelli, L. On Calculating the Bending Modulus of Lipid Bilayer Membranes from Buckling Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124* (29), 6299–6311. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.0c04253>.
- (38) Marrink, S. J.; Risselada, H. J.; Yefimov, S.; Tieleman, D. P.; de Vries, A. H. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (27), 7812–7824. <https://doi.org/10.1021/jp071097f>.
- (39) Monticelli, L.; Kandasamy, S. K.; Periole, X.; Larson, R. G.; Tieleman, D. P.; Marrink, S.-J. The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *J Chem Theory Comput* **2008**, *4* (5), 819–834. <https://doi.org/10.1021/ct700324x>.
- (40) Gunsteren, W. F. V.; Berendsen, H. J. C. A Leap-Frog Algorithm for Stochastic Dynamics. *Molecular Simulation* **1988**, *1* (3), 173–185. <https://doi.org/10.1080/08927028808080941>.
- (41) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52* (12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- (42) Liang, X.; Mao, G.; Simon Ng, K. Y. Probing Small Unilamellar EggPC Vesicles on Mica Surface by Atomic Force Microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2004**, *34* (1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.017>.
- (43) Delorme, N.; Fery, A. Direct Method to Study Membrane Rigidity of Small Vesicles Based on Atomic Force Microscope Force Spectroscopy. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **2006**, *74* (3 Pt 1), 030901. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.030901>.
- (44) Vorselen, D.; MacKintosh, F. C.; Roos, W. H.; Wuite, G. J. L. Competition between Bending and Internal Pressure Governs the Mechanics of Fluid Nanovesicles. *ACS Nano* **2017**, *11* (3), 2628–2636. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b07302>.
- (45) Henriksen, J.; Rowat, A. C.; Ipsen, J. H. Vesicle Fluctuation Analysis of the Effects of Sterols on Membrane Bending Rigidity. *Eur. Biophys. J.* **2004**, *33* (8), 732–741. <https://doi.org/10.1007/s00249-004-0420-5>.
- (46) Niggemann, G.; Kummrow, M.; Helfrich, W. The Bending Rigidity of Phosphatidylcholine Bilayers: Dependences on Experimental Method, Sample Cell Sealing and Temperature. *Journal de Physique II* **1995**, *5* (3), 413–425. <https://doi.org/10.1051/jp2:1995141>.
- (47) Kucerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains. *J. Membr. Biol.* **2005**, *208* (3), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-7006-8>.
- (48) Tarazona, P.; Chacón, E.; Bresme, F. Thermal Fluctuations and Bending Rigidity of Bilayer Membranes. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139* (9), 094902. <https://doi.org/10.1063/1.4818421>.
- (49) Gracià, R. S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R. L.; Lipowsky, R.; Dimova, R. Effect of Cholesterol on the Rigidity of Saturated and Unsaturated Membranes: Fluctuation and Electrodeformation Analysis of Giant Vesicles. *Soft Matter* **2010**, *6* (7), 1472–1482. <https://doi.org/10.1039/B920629A>.
- (50) Rawicz, W.; Olbrich, K. C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophys J* **2000**, *79* (1), 328–339.
- (51) Pan, J.; Tristram-Nagle, S.; Kučerka, N.; Nagle, J. F. Temperature Dependence of Structure, Bending Rigidity, and Bilayer Interactions of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers. *Biophys J* **2008**, *94* (1), 117–124. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.115691>.

- (52) Delorme, N.; Dubois, M.; Garnier, S.; Laschewsky, A.; Weinkamer, R.; Zemb, T.; Fery, A. Surface Immobilization and Mechanical Properties of Catanionic Hollow Faceted Polyhedrons. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (4), 1752–1758.  
<https://doi.org/10.1021/jp054473+>.

# Chapitre 4 : Calcul du module de flexion des membranes lipidiques à partir des méthodes de simulation basées sur la Dynamique Moléculaire MD

Dans ce chapitre, nous essayons de construire, à l'aide des outils de calcul MD, une géométrie optimisée de la boîte de simulation, qui permet de décrire avec une exactitude les propriétés mécaniques d'une membrane lipidique. A cet effet, la taille de la boîte qui fournit des valeurs reproductibles du module de flexion d'une membrane (DOPC) a été optimisée, dans les trois dimensions. Une boîte de dimensions ( $L_x = 32$ ,  $L_y = 8$  et  $L_z = 20$  nm) a été définie. Les simulations pour des systèmes plus petits fournissent des résultats moins reproductibles, celles pour des systèmes plus grands éprouvent des durées de calcul élevées, sans aucun avantage.

Ayant optimisé la taille d'une boîte de simulation qui peut représenter une membrane lipidique, nous avons calculé dans cette boîte, le module de flexion d'une série de bicouches lipidiques, d'abord mono-composantes. Les résultats du calcul semblent être en bon accord avec les mesures expérimentales trouvées dans la littérature ; le module de flexion diminue fortement avec le nombre d'insaturations (cas des membranes DOPC et DLiPC), alors qu'il est moins sensible à la longueur de chaîne acyle (DNPC et PUPC).

Ensuite, l'effet du cholestérol sur la valeur du module de flexion et du module de compressibilité des bicouches DPPC et DOPC, a été discuté. Notre calcul, conduit selon les méthodes de flambement et de fluctuations de la surface, suppose une augmentation monotone des deux modules élastiques des lipides PC saturés (DPPC) et insaturés (DOPC) avec l'augmentation de la concentration de cholestérol, une tendance non confirmée par les études expérimentales mais en bon accord avec d'autres calculs numériques disponibles dans la littérature.

Les modules élastiques de flexion  $k_c$  et de compressibilité  $K_A$  pour un nombre de mélanges binaires et ternaires de lipides ont été pareillement déterminés avec la méthode de flambement

et la méthode de fluctuations de la surface, respectivement. Ces mélanges se caractérisent par des longueurs de chaîne et des niveaux d'insaturation différents. Nous avons constaté que les deux modules d'élasticité des mélanges homogènes ou de celles qui présentent une séparation de phase, se déduisent à partir des modules de leurs composants, mais de deux manières différentes. Le composant mou registre une prédominance dans le cas des mélanges présentant des phases séparées. Notre déduction publiée en Juillet 2020, a été vérifiée ultérieurement en Septembre 2020, par d'autres chercheurs utilisant la diffraction des rayons X ; G. Kelley et al. ont montré que la rigidité du mélange formé par DMPC et DLPC, est dominée par celle du lipide le plus mou.

Dans la littérature, on repère des calculs du module de flexion, se basant sur la détermination du module de compressibilité  $K_A$  par la méthode de fluctuations de la surface d'une membrane lipidique. Ainsi, nous avons calculé le module de flexion en se basant sur le module de compressibilité pour tous les systèmes étudiés. En comparant les résultats entre les deux modules de flexion obtenus, nous avons constaté que les prédictions du module de flexion basées sur le module de compressibilité de surface ne sont pas fiables, tant pour les bicouches mono-composantes que pour les mélanges de lipides. La méthode de simulation de flambement semble être plus efficace, pour le calcul du module de flexion des membranes lipidiques, celle de fluctuations de la surface est conseillée pour le calcul du module de compressibilité exclusivement.

# On calculating the bending modulus of lipid bilayer membranes from buckling simulations

*Jad Eid<sup>1,2</sup>, Hafez Razmazma<sup>1,3</sup>, Alia Jraij<sup>2</sup>, Ali Ebrahimi<sup>3</sup>, Luca Monticelli<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> University of Lyon, CNRS, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB, UMR 5086), F-69007, Lyon, France

<sup>2</sup> Bioactive Molecules Research Laboratory, Doctoral School of Sciences and Technologies, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon

<sup>3</sup> Laboratory of Computational Quantum Chemistry and Drug Design, Department of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

## KEYWORDS

Lipid bilayer, buckling method, bending modulus, area compressibility modulus, coarse grained, molecular dynamics.

## ABSTRACT

The bending modulus ( $k_c$ ) is an important physical constants characterizing lipid membranes. Different methods have been devised for calculating the bending modulus from simulations, and one of them, named the buckling method, is nowadays widely used due to its simplicity and numerical stability. While being widely used, some questions remain open on reproducibility, finite size effects, as well as on the interpretation of results on mixtures, and the relationship with the area compressibility modulus. Here we assess the origins of discrepancies among data reported in the literature by exploring the dependence of simulation results on the system size and the strain. We find that the dimensions of the box have a negligible impact on the calculated elastic constant when the system size is beyond a certain threshold, well defined in all three dimension. We then calculate the bending rigidity for of a series of common single-component



lipid bilayers (PC, PS, PE, PG and SM), providing a systematic view on the effect of chain length, unsaturation, and head group. Finally, we report the predictions for bending moduli of some common binary lipid mixtures, including bilayers with ideal and non-ideal mixing. We find that bending moduli of lipid mixtures can be predicted from the weighted average of the moduli of the individual components, as long as the mixture is homogeneous. For phase separated mixtures, the apparent elastic moduli are closer to the value of the softer component. Predictions of the bending modulus based on the area compressibility modulus are found to be generally unreliable.

## 1. Introduction

Lipid bilayers are the primary structural component of cellular membranes, playing crucial roles in both prokaryotic and eukaryotic cells as barriers between the cytosol and extracellular environment<sup>1-2</sup>. The general picture of biological membrane structure established in the 1970s, the so-called fluid mosaic model<sup>3</sup>, has been challenged from the 1990s with the recognition of the major role of compositional heterogeneities and structural patchiness<sup>4</sup>, and even more with the emergence of lipidomics techniques<sup>5</sup>, which have revealed an enormous richness in chemical composition. At the same time, molecular simulation techniques have become a powerful tool for the interpretation of experiments on membranes, thanks to the fast pace of innovation in computer hardware and simulation software<sup>6</sup>. Among the different lipid bilayer properties predicted by simulations, particularly important is the bending rigidity, quantified by the bending modulus, an intrinsic macroscopic mechanical constant defining the amount of energy required to deform a membrane out of plane. Membrane bending rigidity is crucial for membrane reshaping in many biological phenomena, including exocytosis, endocytosis, and vesicular trafficking<sup>6</sup>. Several experimental and simulation techniques are available to measure and calculate bending moduli, but different methods provide different results for the same chemical composition, and in some cases the results are not fully consistent even when the same technique is used<sup>7</sup>. For instance, for DPPC bilayers in the fluid phase, Marrink *et al.* found a bending modulus of  $9.7 k_B T$  based on thermal undulation spectrum of a coarse-grained

simulation model<sup>8</sup>, while May *et al.* found  $4.8 k_B T$  using the same model and method<sup>9</sup>, and den Otter *et al.* found  $18 k_B T$  using a different coarse-grained model<sup>10</sup>. Not only measuring and calculating the bending modulus of fluid membranes is challenging, but also the interpretation of the results is not straightforward, particularly in the case of lipid mixtures. Indeed, simulation methods are generally based on the assumption that the lipid membrane can be represented as a homogeneous elastic slab, but lipid mixtures are not always homogeneous – even more so in the case of biological membranes, consisting of thousands of different lipid species<sup>5</sup>. While a number of different simulation techniques are available to estimate the bending modulus of lipid bilayers, only one study has been published so far on a systematic exploration of bending rigidity in bilayers consisting of lipid mixtures (ref. <sup>11-12</sup>), to the best of our knowledge. How does bending rigidity vary with lipid composition in mixtures? Does the result depend on the degree of mixing among the different lipids?

To address these questions, we set out to determine the bending rigidity of lipid bilayers consisting of a wide range of different lipids, using consistent methodology and a consistent force field – the Martini coarse-grained force field. We started by determining the bending modulus of single component lipid bilayers and then moved on to simple binary mixtures. Before venturing into the predictions, we verified the range of validity of our calculation method of choice, the membrane buckling method by Noguchi<sup>13</sup>. This method has become very popular thanks to its simplicity and numerical stability<sup>7,13</sup>, and is based on the calculation of the stress-strain relation of a buckled membrane, based on the well-known Helfrich Hamiltonian.<sup>14</sup> Based on the available literature, the method provides rather consistent results, for a given force field, lipid type, and temperature. For instance, for DOPC bilayers, Boicchio *et al.*<sup>7</sup> found a value of  $22 \pm 1.1 k_B T$  about 25% smaller than the value of  $28.4 k_B T$  reported by Hu *et al.*<sup>15</sup>. Differences between the values calculated by the same authors on DMPC bilayers were also rather small ( $24.8 k_B T$ <sup>7</sup> and  $30 k_B T$ <sup>15</sup>). Yet, the discrepancies reported are well beyond statistical uncertainties, and their source is unclear. Before starting calculations on lipid mixtures, we explored some potential sources of discrepancies, and determined optimal simulation parameters for the calculation of the bending modulus with the buckling method, combining good reproducibility and the lowest possible computational cost.

The cost of bending modulus calculations is affordable on standard computer hardware when using coarse-grained molecular models, but it remains very high if an all-atom description of the system is used. Such drawback can in principle be tackled by exploiting the well-known, simple relationship between area compressibility modulus and bending modulus:<sup>16</sup>

$$k_c = \frac{K_A}{24} (h - h_0)^2 \text{ (Equation 1)}$$

where  $k_c$  is the bending modulus,  $K_A$  is the area compressibility modulus,  $h$  is the thickness of the bilayer, and  $h_0 = 1$  nm denotes a non-deformable length. Since the area compressibility modulus is much simpler and computationally inexpensive to calculate, exploring the range of validity of Equation 1 has a practical interest for the practitioners in simulations of biomembranes. However, this relationship, derived from polymer brush theory and in principle valid only for single-component lipid bilayers<sup>16</sup>, is rarely used in practice, due to well-known limitations<sup>17</sup>. Yet, the validity of the simple relationship above has rarely been verified in practice on a large and consistent set of data, to the best of our knowledge<sup>17</sup>. Hence some open questions remain: can such method replace much more expensive bending modulus calculations? If so, can it also be used in the case of lipid mixtures, for which equilibration times are generally much longer than single-component bilayer membranes? What are the limitations of the relationship, in the case of lipid mixtures?

The manuscript is organized as follows. First, we describe the performance of the buckling technique for calculating the bending rigidity of lipid bilayer membranes as a function of system size and strain. We study finite size effects by changing systematically the length of the simulation cell in all dimensions, for different values of strain, and determine the minimum box size required for a good reproducibility of the calculation. This also allows us to define an optimal system size, allowing good accuracy and minimal computational cost. Second, we study the variation of bending rigidity as a function of bilayer composition, considering some of the most common phospholipids (including DPPC, DLPC, DLiPC, DOPC, DNPC, POPC, PUPC, POPG, POPS, POPE, DPSM). This allows us to verify trends in bending rigidity with the nature of the head group, acyl chain unsaturation, and lipid backbone. Third, we explore the dependence of elastic moduli on the composition of lipids mixtures, and notably a series of mixtures containing different phosphatidylcholines as well as phosphatidylcholines and cholesterol. We chose cholesterol-

phospholipid mixtures because of their relevance to biological membranes. Fourth, we calculate the area compressibility modulus for the same membranes used in the calculations of bending moduli, and verified the relationship between the two elastic moduli. We find that the bending modulus of mixtures can be predicted from the bending moduli of the individual components and their abundance in the mixture, as long as the different components mix ideally.

## 2. Methods

### 2.1. System setup

The buckling method requires calculating forces exerted by a buckled membrane. Bilayers initially lied in the  $xy$  plane, and we generated buckles by compressing them in the  $x$  dimension, until reaching the desired strain, defined as:

$$\gamma = \frac{L-l}{L} = \frac{\Delta L}{L} \text{ (Equation 2)}$$

where  $L$  is the length of the dimension that is compressed ( $x$  dimension, in our case, expressed in nm), and  $l$  is extent of the compression (expressed in nm). In order to test the effect of the size and strain on the value of bending modulus, first we run a set of simulations of DOPC lipid bilayers with 17 different system sizes ( $L_x$  (nm),  $L_y$  (nm),  $L_z$  (nm)). In the buckles, the cell size was varied between 16 nm and 74 nm in the  $x$  dimension; between 8 nm and 24 nm in the  $y$  dimension; and between 15 and 64 nm in the  $z$  dimension (normal to the membrane plane). The strain was varied between 0.1 and 0.3. A complete list of simulations is reported in Table 1.

**Table 1.** List of simulations of buckled DOPC bilayers to probe the effect of system size and strain.

$L_x, L_y, L_z$ (nm)	Number of lipids	Number of water particles
33.1, 8.2, 32	800	58636

33, 16.5, 32.3	1600	117272
33, 24.7, 32.4	3200	234544
57.8, 8.2, 32.6	1600	58636
57.8, 16.5, 32.4	3200	117272
57.8, 24.7, 32.4	4800	175908
28, 8, 32	720	51732
24, 8, 30	800	47454
22, 8, 30	540	38802
16, 8, 30	400	31636
32, 8, 60	800	128164
32, 8, 25	800	47096
32, 8, 20	800	35516
32, 8, 18	800	30664
32, 8, 15	800	23776

For each system we ran 2 simulations: one to calculate the box size at equilibrium for the flat, tensionless bilayer ( $L$ ), referred to as *size* simulation in  $x$  direction; and one to calculate the force exerted by the same bilayer, after buckling, on the walls of the box ( $yz$  plane), referred to as *force* simulation. The buckle was generated by applying a stress in the  $x$  dimension for at least 600 ns, until the desired strain is obtained. We equilibrated every system in the isothermic-isobaric (NPT) ensemble. Production runs for flat, tensionless bilayers (*size* simulations) were carried out for 2  $\mu$ s with fixed size in the  $y$  direction (but variable size in the  $x$  and  $z$  dimensions); we used these simulations to calculate the average box length  $L$  at zero tension in  $x$  direction. Production runs for buckled bilayers (*force* simulations) were carried out for 8  $\mu$ s, with fixed  $x$  and  $y$  dimensions and pressure coupling acting only in the  $z$  dimension; we used these simulations to calculate the pressure (and hence the force exerted by the membrane) on the  $yz$  plane. The force exerted by the membrane on the  $yz$  planes can be deduced from the  $xx$  component of the stress tensor,

averaged during the production run. From the force we can calculate the bending modulus by applying the equation developed by Noguchi:

$$F_x(\gamma) = 4\pi^2 k_c \frac{L_y}{L^2} \sum_{i=0}^{\infty} b_i \gamma^i \quad (\text{Equation 3})$$

where  $F_x(\gamma)$  is the force exerted by the buckled membrane with strain  $\delta$ ,  $k_c$  is the bending modulus,  $L_y$  is the size of the system in the  $y$  dimension,  $L$  is the size of the system in the  $x$  dimension, the  $b_i$  are numeric coefficients given in the original paper by Noguchi<sup>13</sup> (derived from the analytical solution of the stress-strain relation), and  $\delta$  is the strain as defined in equation 2.

In the second part of the work we calculated the bending rigidity of a number of different lipid bilayers, using the system setup optimized in the first part of the work. For all systems we used the same systems size (32, 8, 20 nm) and the same simulation parameters. The list of single-component lipid bilayers includes: 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC, 14:0-14:0), 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, 16:0-16:0), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC, 16:0-18:1), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC, 18:1-18:1), 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (PUPC, 16:0-22:6), 1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLiPC, 18:2-18:2), 1,2-nisinoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DNPC, 24:6-24:6), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (POPG, 16:0-18:1), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylserine (POPS, 16:0-18:1), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE, 16:0-18:1), and 1,2-dipalmitoylsphingomyelin (DPSM, 16:0-16:0).

In the third part of the work we calculated the bending modulus for some binary and ternary lipid mixtures. We considered different mixtures of DOPC:CHOL, DPPC:CHOL, POPC:POPE, DPPC:DLPC, POPC:PUPC, DNPC:DLPC, and DPPC:DLiPC:CHOL, with different molar ratios (Table 2).

**Table 2.** Lipid composition (with molar ratio) and temperature used in all simulations.

Bilayer	Molar ratio	Temperature (K)
DPPC (C16:0-C18:0)	100:0	323
DLPC (C12:0-C14:0)	100:0	298 and 323

DLiPC (C18:2-C18:2)	100:0	298 and 323
DNPC (C24:6-C24:6)	100:0	298 and 323
DOPC (C18:1-C18:1)	100:0	310 and 323
POPC (C16:0-C18:1)	100:0	298 and 323
PUPC (C16:0-C22:6)	100:0	298 and 323
POPG (C16:0-C18:1)	100:0	298
POPS (C16:0-C18:1)	100:0	298
POPE (C16:0-C18:1)	100:0	298
DPSM (d18:1/d18:0)	100:0	298 and 323
a. DPPC b. CHOL	90:10	323
a. DPPC b. CHOL	70:30	323
a. DPPC b. CHOL	80:20	323
a. DPPC b. CHOL	90:10	323
a. DOPC b. CHOL	80:20	323
a. DOPC b. CHOL	60:40	323
a. DPPC b. DLPC	80:20	323
a. DPPC b. DLPC	60:40	323
a. DPPC b. DLPC	40:60	323
a. POPC b. POPE	80:20	298
a. POPC b. POPE	60:40	298
a. POPC b. POPE	40:60	298
a. POPC b. POPE	20:80	298
a. DLPC b. DRPC	20:80	323
a. DLPC b. DRPC	40:60	323
a. DLPC b. DRPC	60:40	323
a. DLPC b. DRPC	80:20	323
a. POPC b. PUPC	20:80	323
a. POPC b. PUPC	60:40	323
a. POPC b. PUPC	40:60	323
a. POPC b. PUPC	80:20	323
a. DPSM b. DLiPC	20:80	298 and 323
a. DPSM b. DLiPC	40:60	298 and 323
a. DPSM b. DLiPC	60:40	298 and 323
a. DPSM b. DLiPC	80:20	298 and 323
a. DPPC b. DLiPC c. CHOL	62:1:37	295
a. DPPC b. DLiPC c. CHOL	42:28:30	295

In the last part of the work we carried out simulations for DOPC:CHOL, DPPC:CHOL, POPC:POPE, DLPC:DRPC, and POPC:PUPC, using the same molar ratios as in the calculation of the bending modulus but smaller bilayers, to minimize contributions of bending modes. All simulation boxes contained 200 lipids, and their size was about 8x8x14 nm. Simulation boxes were equilibrated for 1  $\mu$ s in the NPT ensemble, followed by production runs of 4  $\mu$ s.

## 2.2. Simulation parameters

We performed all molecular dynamics (MD) simulations using the GROMACS software (v. 2016.4)<sup>18</sup> and the MARTINI coarse-grained (CG) force field (v. 2.2),<sup>19</sup> using standard simulation parameters as detailed below. In the Martini force field every four heavy atoms are represented by one effective bead, with an exception made for ring structures which are mapped up to two-to-one. Details of the model are described extensively in previous publications.<sup>20-22</sup> We used a relative dielectric constant  $\epsilon = 15$  for explicit screening of electrostatic interactions. Coulomb and Lennard-Jones interactions were cut off at 1.2 nm. The Lennard-Jones potential was smoothly switched off between  $r_{\text{shift}} = 0.9$  nm and  $r_{\text{cut}}$ , while the electrostatic potential was shifted from 0 nm to  $r_{\text{cut}}$ . These values are standard and are considered to be a part of the force field parameterization.

In all simulations we used the leap-frog algorithm for the integration of the Newton's equation of motion, with an integration time step of 20 fs. We used the v-rescale temperature coupling method,<sup>23</sup> with a time constant of 1 ps. The reference temperature for each simulation was chosen to obtain fluid phases for all bilayers (see Table 1). For equilibration runs, we used the Berendsen pressure coupling algorithm,<sup>24</sup> with semi-isotropic pressure coupling, a time constant of 10 ps, a reference pressure of 1 bar, and compressibility of  $4.5 \times 10^{-5}$ . For buckling simulations, we used the deform option in the GROMACS mdp file, with anisotropic pressure coupling, compressibility of 0 in the x and y dimensions and  $4.5 \times 10^{-5}$  in the z dimension. For all production runs (calculation of equilibrium box length in x direction,  $L_x$ , and the force), we used the



Parrinello-Rahman barostat.<sup>25</sup> For the calculation of  $L$  in  $x$  direction ( $L_x$ ), we used anisotropic pressure coupling type with a compressibility of 0 in  $y$  dimension. For the force calculations, we used semi-isotropic pressure coupling, with a compressibility of 0 in both the  $x$  and  $y$  dimensions.

### 2.3. Analysis of the simulation and error calculation

From the pressure exerted in the  $x$  direction ( $P_{xx}$ ), we can deduce the force applied on the walls of the box:

$$F_x = P_{xx} \times (L_y \times L_z) \quad (\text{Equation 4})$$

We apply error propagation rules to determine the statistical uncertainty (statistical error) on the average value of the force,  $F_x$ :

$$\Delta F_x = F_x \sqrt{\left(\frac{\Delta P_x}{P_x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta L_z}{L_z}\right)^2} \quad (\text{Equation 5})$$

$\Delta F_x$ ,  $\Delta P_x$ , and  $\Delta L_z$  are statistical uncertainties on the force, the pressure, and the box size in the  $z$  dimension, respectively, and are calculated from *force* simulations using *gmx analyze* tool.

When calculating the force exerted by the membrane, we include the effect of thermal undulations,<sup>15</sup> corresponding to:

$$\delta F_x = -k_B T \frac{3}{2L} \sum_{i=0}^{\infty} d_i \gamma^i \quad (\text{Equation 6})$$

where  $\delta F_x$  is the contribution of thermal undulations to the force,  $k_B$  is Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $L$  is the box size in the direction of compression ( $x$  direction),  $d_i$  are numeric coefficients given in the original paper by Noguchi<sup>13</sup> (derived from the analytical solution of the stress-strain relation), and  $\gamma$  is the strain. Hence, the force used to calculate the bending modulus is:  $F_x + \delta F_x$ .

To interpret the bending modulus values obtained in bilayer mixtures, we analyzed mixing in all binary mixtures by monitoring the number of contacts between the two lipid species, defined as:

$$f_{mix} = 100 \frac{C_{A-B}}{C_{A-B} + C_{A-A}}, \quad (\text{Equation 7})$$

where  $C_{A-B}$  is the number of contacts between molecules of type A and B. The contact fraction is defined as the number of contacts between lipid A and lipid B in the mixtures, divided by the total number of contacts between lipids with all other molecules in the bilayer. Lipids were considered to be in contact when the distance between their head groups (phosphate (PO4), or hydroxyl (ROH)) was shorter than 1.1 nm.<sup>26</sup> The contact analysis was performed on the last 1.4 microseconds of the production run for calculation the exact  $Lx$  value. To estimate statistical uncertainties, we split the production run in two equal blocks; the difference between average values in each block were used as estimates of uncertainties.

The area compressibility modulus was calculated from the bilayer's thermally excited area fluctuations:

$$K_A = 2k_B T \frac{\langle A_l \rangle}{n_{lipids} \sigma_A^2}, \text{ (Equation 8)}$$

where  $k_B$  is Boltzmann's constant,  $T$  is the absolute temperature,  $\langle A_l \rangle$  is the mean area per lipid (projected on the  $xy$  plane), and  $\sigma_A^2$  is the variance of the area per lipid.

$$A_l = \frac{2 L_x L_y}{n_{lipids}}, \text{ (Equation 9)}$$

where  $L_x$  and  $L_y$  are the  $x$  and  $y$  dimensions of the simulation box, and  $n_{lipids}$  is the number of lipids in the system.

To estimate statistical uncertainties, we split the production run in two equal blocks; the difference between average values in each block were used as estimates of uncertainties.

The lateral diffusion coefficient,  $D$ , of the lipids was calculated from the long time mean square displacement (MSD) of the lipids versus time. GROMACS provides a module called `msd` to measure the lateral diffusion coefficients by using Einstein relation. It is calculated by least squares fitting a straight line ( $Dt + c$ ). For lipid molecules, we calculated the diffusion coefficient for the Phosphate (PO4) group selected in the index file. The calculation was performed on the last 1.4 microseconds of the production run for calculation the exact  $Lx$  value. To estimate statistical uncertainties, we split the production run in two equal blocks; the difference between average values in each block were used as estimates of uncertainties.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Bending modulus from buckling simulations: optimizing box size and strain

Our first objective is to explore the robustness of the bending modulus calculations carried out with the buckling method. In particular, we set out to determine the dependence of the calculated values on the dimensions of the system and on the strain. In principle, membrane elasticity theory breaks down at very small box sizes, when the thickness of the bilayer membrane approaches the size of the system. In practice, dependence of the results on system size has never been explored, to the best of our knowledge. This issue has a practical interest: in fact, the smaller the system, the cheaper the calculation; so it is interesting to use the smallest system size that still provides reliable estimates.

To this end, we set up a series of simulations on identical systems in identical conditions, in which we only changed the size of the simulation box (and hence the number of lipids and water molecules). All simulations were carried out on pure DOPC bilayers, with the same force field, identical strain of 0.2, temperature of 310 K, and identical simulation parameters. The list of simulations performed is reported in Table 3.

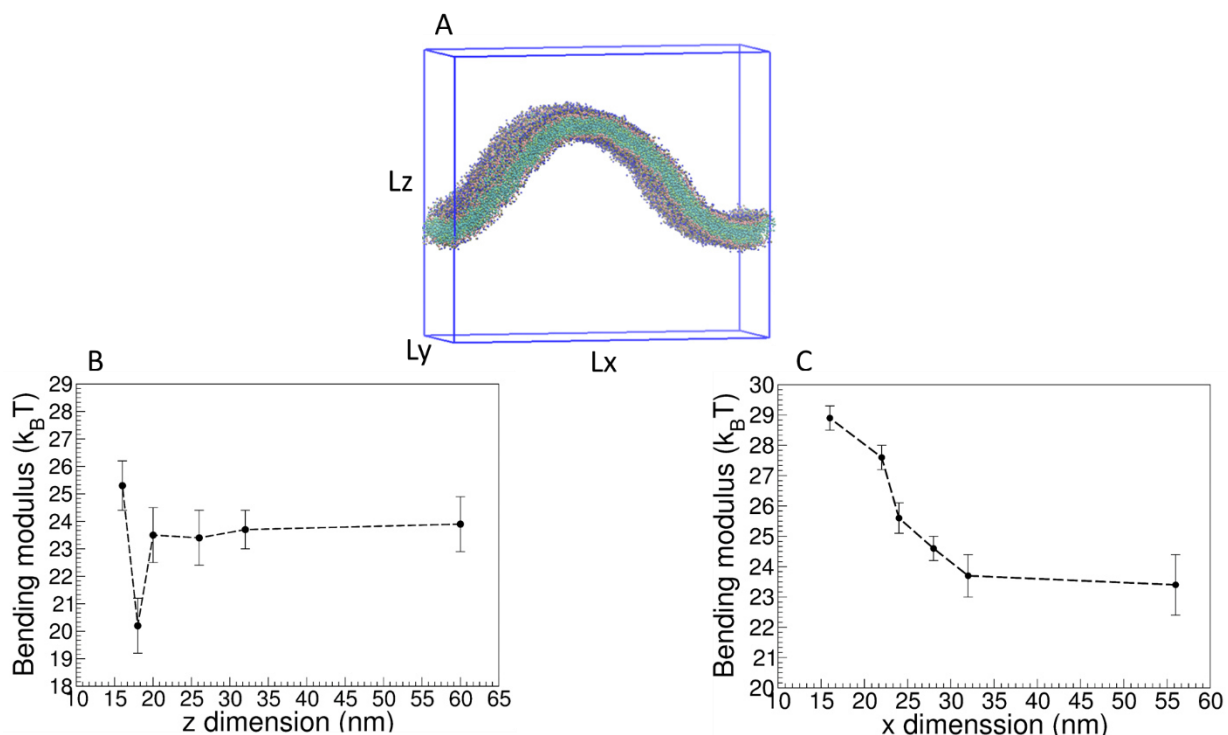
**Table 3.** List of simulations performed to verify the dependence of the bending rigidity calculations on system size.

<b>Lx (nm)</b>	<b>33.1</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>57.8</b>	<b>57.7</b>	<b>57.8</b>
<b>Ly (nm)</b>	8.2	16.5	24.8	8.2	16.5	24.8
<b>Lz (nm)</b>	32	32	32	32	32	32
<b><math>k_c(k_B T)</math></b>	$23.3 \pm 0.7$	$23.9 \pm 1.0$	$23.9 \pm 0.4$	$22.9 \pm 1.6$	$23.6 \pm 1.1$	$23.0 \pm 0.9$

First, we varied the  $y$  dimension using 2 different sizes in the  $x$  direction (i.e., the direction of the buckle), leaving the  $z$  dimension unchanged. All values of bending modulus of DOPC lipid membrane are within the statistical uncertainty, and no trend of  $k_c$  versus system size was

identified. Hence, a box width of about 8 nm appears to be sufficient for reliable calculations of the bending modulus.

Second, we varied the  $x$  dimension of the box, maintaining a box with of 8 nm in the  $y$  dimension, and using the same strain of 0.2 and the same box height (32 nm in the  $z$  dimension, orthogonal to the membrane plane). The  $x$  dimension of the box was varied between 16 nm and 74 nm. Results are summarized in Figure 1-B. In this case, the calculated values of bending modulus increased with decreasing system size, i.e., smaller systems appeared more rigid; the increase in bending rigidity was beyond the statistical uncertainty for sizes below 28 nm. Increasing the box size beyond 32 nm had no detectable effect on the results. We conclude that a box size of 32 nm in the  $x$  dimension is sufficient for a reliable estimate of the bending rigidity.



**Figure 1.** (A) Membrane buckle in a rectangular simulation box, with side lengths  $L_x$ ,  $L_y$ , and  $L_z$ , (B) Bending modulus of DOPC lipid membrane calculated from simulations with different size in the  $x$  dimension, (C) Bending modulus of DOPC lipid membrane calculated from simulations with different size in the  $z$  dimension.

Third, we tested the effect of changing the box size in the  $z$  dimension, normal to the membrane plane; obviously this changes the number of water molecules in the system. Tests

was performed using a box size of 32 nm in the x dimension, and 8 or 16 nm in the y dimension, while the z dimension was varied between 15 nm and 60 nm. Results are summarized in Figure 1-C. The estimates of bending modulus are consistent for sizes of 20 nm and above, while for smaller systems ( $L_z = 18$  nm and 15 nm) significant deviations are observed. Such deviations can probably be ascribed to the close proximity between the buckle in the simulation cell and its periodic images, affecting inter-bilayer forces.

Finally, we tested the effect of the membrane strain. We used two different box sizes (33.1 x 8.2 x 32.2 nm and 57.8 x 8.2 x 32.2 nm) and three different values of strain (0.1, 0.2, and 0.3) (Table 4). Consistent values of bending modulus were obtained for strains of 0.2 and 0.3, while the deviations in the case of low strain (0.1) are significant. The origin of the inconsistency is not entirely clear, although it is apparent that, at low strain, the shape of the membrane is not very dissimilar from the unperturbed shape. Moreover, the estimates obtained with low strain are not consistent with each other. For these reasons, it is likely that calculations performed at low strain are less reliable in the determination of the bending rigidity.

**Table 4.** Bending modulus of DOPC lipid membrane using different strains (0.1, 0.2, and 0.3) for two different membrane sizes, smaller (33 x 8 x 32 nm) and larger (56 x 8 x 32 nm).

Strain	Bending modulus ( $k_B T$ )	Bending modulus ( $k_B T$ )
	for the smaller membrane	for the larger membrane
0.1	26.3 ± 2.0	19.9 ± 4.7
0.2	23.3 ± 0.7	22.9 ± 1.6
0.3	23.6 ± 2.0	23.1 ± 1.3

In conclusion, bending modulus calculations using the buckling method are indeed sensitive to system size, but appear to converge to a well-defined value for sizes of (32x8x20 nm) in the x, y, and z dimensions, respectively (where x is the direction of compression, and z is the direction of the normal to the flat membrane). Using larger system sizes has negligible effects on the results, but increases significantly the computational cost.

### 3.2. Bending modulus of single-component lipid bilayers

Having determined the most convenient and reliable conditions for the determination of the bending rigidity in simple model systems, we set out to analyze systematically the rigidity of lipid bilayers as predicted by the MARTINI force field.<sup>19</sup> We investigated the effect of chain length, unsaturation, head group, and lipid backbone on the values of bending modulus. All simulations were carried out under identical conditions with the exception of temperature, as noted in Table 5. In the same table we also report a comparison with values found in the literature.

**Table 5.** Bending modulus from simulations and experimental results in literature, and in our work. Values calculated in the present work are in bold. Experimental results are shaded in gray.

Bilayer	$K_c$ ( $k_B T$ )	Temp. (K)	Methods	Ref.
DLPC (simulations)	<b>30.3 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	<b>23.7 ± 1</b>	<b>323</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	30.4 ± 0.8	300	Buckling (MARTINI)	7
	25.8 ± 1.1	303	Real space fluctuations (CHARMM36)	11
DLPC (experiments)	12.5	300	X-ray scattering	27
	17.1 ± 2.2	297	Flicker spectroscopy	28
DPPC (simulations)	<b>29.8 ± 1.1</b>	<b>323</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	32.8 ± 0.9	323	Buckling (MARTINI)	7
	30 ± 1.4	323	Thermal undulation spectrum (MARTINI)	29
	34.1 ± 1.6	323	Real space fluctuations (CHARMM36)	11
	35 ± 1.1	323	Lipid orientation fluctuations (CHARMM36)	30
	35.4 ± 0.9	323	Lipid orientation fluctuations (CHARMM36)	31
	33.6	323	Lipid orientation fluctuations (MARTINI)	32
	36.4	325	Lipid orientation fluctuations (MARTINI)	33
DPPC (experiments)	28	323	Neutron spin echo	34
	28.8 ± 4.5	323	X-ray scattering	35
	33.6	323	Neutron spin	36
POPC (simulations)	<b>30.3 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	

	<b>24.6 ± 1.1</b>	<b>323</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	19.7 ± 0.11	320	Thermal undulations (MARTINI)	37
	31.7 ± 1	303	Lipid orientation fluctuations (CHARMM36)	31
	25.3 ± 1.1	298	Real space fluctuations (CHARMM36)	11
POPC (experiments)	24.6 ± 2.6	303	X-Ray scattering	35
	38.5 ± 0.8	298	Micropipette aspiration	38
	20.9	323	Flicker spectroscopy (Neutron spin echo)	36
DOPC (simulations)	<b>23.4 ± 0.7</b>	<b>310</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	<b>21.2 ± 1.0</b>	<b>323</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	37.4 ± 0.97	300	Buckling (MARTINI)	7
	21.6 ± 0.45	323	Buckling (MARTINI)	7
	28.8 ± 0.92	298	Lipid orientations fluctuations (CHARMM36)	31
	27.8 ± 0.73	298	Lipid orientations fluctuations (CHARMM36)	30
	18.3 ± 0.4	298	Real space fluctuations (CHARMM36)	11
DOPC (experiments)	19.8 ± 1.4	303	X-Ray scattering	a
	19.4 ± 0.7	303	X-Ray scattering	35
	20.9 ± 0.2	294	Micropipette aspiration	16
DLiPC (simulations)	<b>16.2 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	<b>12.9 ± 1</b>	<b>323</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	16.3 ± 0.4	298	Real space fluctuations (CHARMM36)	11
DLiPC (experiments)	10.7 ± 0.17	294	Micropipette aspiration	16
PUPC (simulations)	<b>11.8 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	<b>9.4 ± 1.1</b>	<b>323</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
DNPC (simulations)	<b>9 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	<b>6.8 ± 1.2</b>	<b>323</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
POPG (simulations)	<b>22.5 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
POPE (simulations)	<b>28.9 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	31.2 ± 1.4	310	Lipid orientation fluctuations CHARMM36	31
	29.4 ± 1.0	328	Real space fluctuations (CHARMM36)	11
POPS (simulations)	<b>23.7 ± 1.1</b>	<b>298</b>	<b>Buckling (MARTINI)</b>	

PSM (simulations)	62.7 ± 1	321	Lipid orientation fluctuations (CHARMM36)	31
DPSM (simulations)	35.4 ± 1	298	<b>Buckling (MARTINI)</b>	
	29.5 ± 1.1	323	<b>Buckling (MARTINI)</b>	

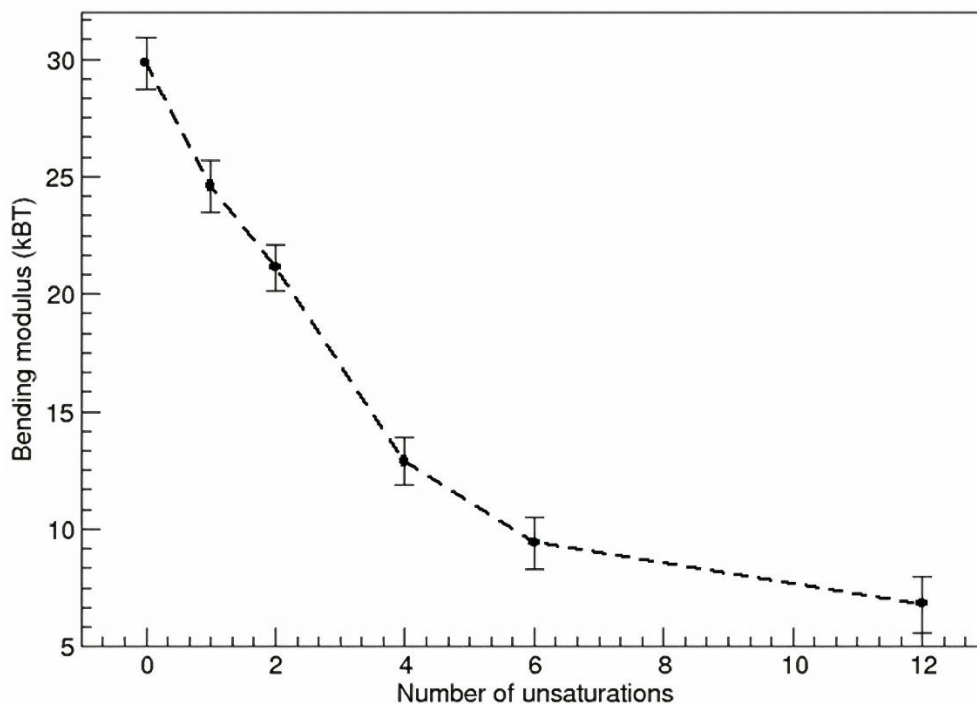
<sup>a</sup>: M. Jablin, Tilt-Dependent Analysis of Diffuse X-ray Scattering from Oriented Stacks of Fluid Phase Lipid Bilayers. PhD Thesis, 2015, Carnegie Mellon University.

Before commenting on the relationship between the bending rigidity values obtained here and chemical structure, we compare our results with those reported in the literature for both simulations and experiments (Table 5). As for experimental methods we consider X-ray scattering, micropipette aspiration, neutron spin echo, and flicker spectroscopy; as for simulation methods, we consider buckling, thermal undulations, lipid orientation fluctuation, and real space fluctuations.

For DPPC, the value obtained here matches the values previously obtained in simulations using the buckling method within MARTINI, and also matches within 5% the values obtained from experiments (including thermal undulations, neutron spin echo, and X-ray scattering). The agreement is reasonable also when comparing our results with those obtained from other simulation methods (namely real space fluctuations and lipid orientation fluctuations) and with neutron spin echo; the largest deviation is 15%. For DLPC, the value obtained here at 298 K is in reasonable agreement with previously reported simulation results<sup>7,11</sup>; however, the agreement with experimental estimates (from X-ray scattering<sup>27</sup> and flicker spectroscopy<sup>28</sup>) is poor, with the experimental values at about half compared to our simulations; this might be ascribed to limitations of the coarse-grained force field. MARTINI appears to overestimate also the bending rigidity of DLiPC and DOPC, compared to experiments, but the discrepancies are less than for DLPC. For POPC, the discrepancies among experimental values are larger than the differences among simulation values, so it is difficult to judge the quality of the force field. For other types of lipids, we could not find experimental values to compare. Overall, our results compare well with previous results and particularly with experimental estimates found in the literature, with few exceptions. Therefore, calculation results can be interpreted in terms of chain length, level of unsaturation, lipid head group and backbone structure.



We now consider the relationship between rigidity and the chemical structure of the lipids. We start by comparing the variation of bending modulus in terms of lipid chains characteristics. Figure 2 shows the variation of bending modulus in terms of number of unsaturation in lipid tail.



**Figure 2.** Bending modulus versus number of unsaturation in PC lipids, from our simulations, with error estimates. The dashed line is only a guide for the eye.

For saturated lipid membranes DPPC and DLPC, it is obvious that the rigidity decreases with the decrease of chain length (see Table 5). For the same chain length, the rigidity of the bilayer decreases with increasing the number of unsaturation (Figure 2). Moreover, lipids with non-saturated lipid chains have lower bending rigidity compared to lipids with saturated chains, independently of the chain length. DNPC (24:6-24:6) and PUPC (16:0-22:6) bilayers have lower bending moduli compared to all other PC bilayers in our data, indicating that the effect of unsaturation is more prominent than the effect of chain length. Also, we notice that adding 6 more unsaturations to PUPC has a small effect, compared to the effect of the first 6 unsaturations.

We then explored the effect of the head groups on bending rigidity. We compared the bending modulus of POPC, POPE, POPG, and POPS lipids, featuring the same acyl chains (16:0-18:1). These lipids all form lamellar phases at room temperature at full hydration. Our force field predicts that POPC and POPE bilayers have similar rigidity, while POPS and POPG are significantly softer. We can hypothesize that repulsion among charged head groups is responsible for this effect, although the molecular mechanism remains unclear, and difficult to explore with a coarse-grained model, and particularly with the Martini model, featuring a very simplified description of ions and electrostatics.

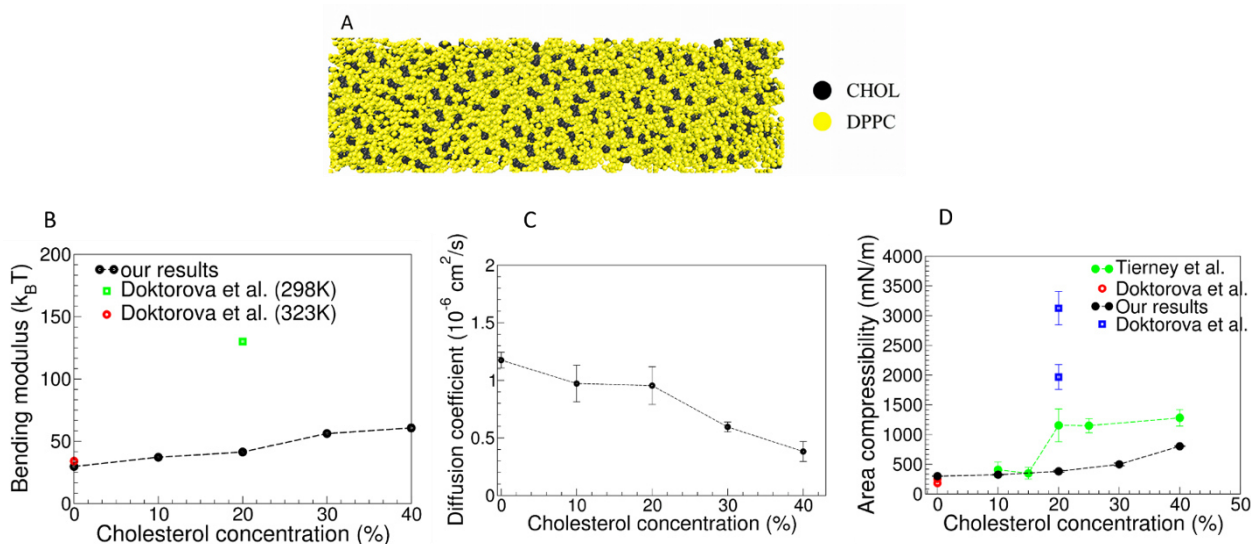
### 3.3. Bending modulus of lipid mixtures: the effect of cholesterol

We carried out multiple simulations in order to investigate the effect of cholesterol on the bending modulus of DOPC and DPPC bilayers. All simulations were carried out at the same temperature, 323K, with cholesterol concentrations up to 40% (molar fraction). In all cases, we verified that the distribution of lipids was homogeneous, with relatively small deviations from ideal mixing, as shown by the fraction of phospholipid-cholesterol contacts (Table 6). In the case of ideal mixing, the fraction of mixed contacts corresponds to the fraction of one of the components of the mixture (see Methods). Deviations from ideal mixing were more important at higher concentration of cholesterol, both for DPPC and for DOPC. Yet, visual inspection shows that in no case domains were formed.

**Table 6.** Values of contact fraction, bending modulus ( $k_c$ ), and area compressibility modulus ( $k_A$ ) for DPPC:CHOL and DOPC:CHOL lipid bilayers, at different molar ratios.

Bilayer	Phospholipid : Cholesterol	Contact Fraction	$k_c (k_B T)$	$K_A$ (mN/m)
DPPC : CHOL	100 : 0	-	$29.8 \pm 1.1$	$301 \pm 3$
	90 : 10	$8.4 \pm 0.6$	$37.2 \pm 1.2$	$324 \pm 11$
	80 : 20	$14.5 \pm 0.8$	$41.4 \pm 1.0$	$381 \pm 16$
	70 : 30	$27.1 \pm 0.7$	$56.2 \pm 1.1$	$499 \pm 22$
	60 : 40	$25.7 \pm 1.4$	$60.7 \pm 0.9$	$803 \pm 5$

	100 : 0	-	$21.2 \pm 1.0$	$320 \pm 8$
DOPC : CHOL	80 : 20	$14.0 \pm 0.7$	$26.8 \pm 1.1$	$348 \pm 12$
	60 : 40	$25.0 \pm 1.2$	$31.6 \pm 0.9$	$412 \pm 9$



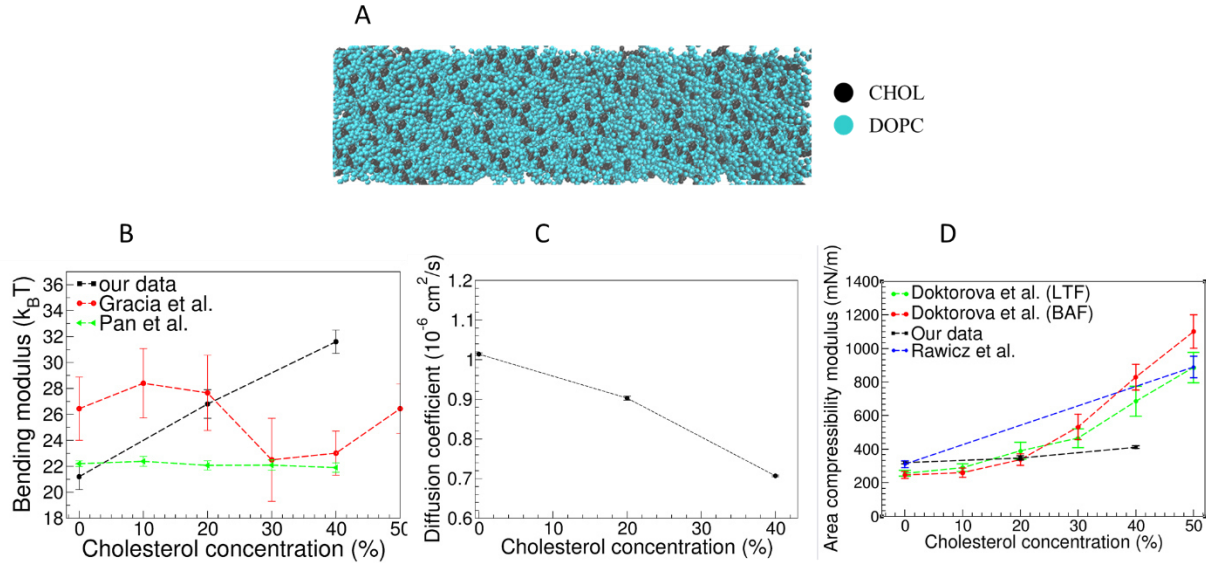
**Figure 3.** (A) Top view of DPPC:CHOL (60:40) lipid bilayer, flat geometry, showing no demixing. (B) Bending modulus of DPPC bilayer membranes containing cholesterol as a function of cholesterol concentration (at  $T = 323 \text{ K}$ ), compared with data by Doktorova *et al.*<sup>11</sup> (at  $298 \text{ K}$ ). (C) Diffusion coefficients of DPPC molecules as a function of cholesterol concentration. (D) Area compressibility modulus as a function of cholesterol concentration, compared with data of Tierney *et al.*<sup>39</sup> using the micropipette aspiration, and Doktorova *et al.* using both local thickness fluctuations and box area fluctuations methods<sup>12</sup>.

We start by examining the effect of cholesterol on the elasticity of DPPC bilayers. First of all, we observe that the bending modulus increases upon addition of cholesterol, and the increase is very significant, approximately a factor of 2 (from about  $30 k_B T$  to about  $60 k_B T$ ) when cholesterol molar concentration reaches 40%. The increase is approximately linear with cholesterol concentration (Figure 3B). As rigidity increases, the dynamics in the bilayer is slowed down, as shown by diffusion coefficients (Figure 3C), but the bilayer remains in the fluid phase. The increase in bending modulus is paralleled by a similar increase in the area compressibility

modulus (Figure 3D), indicating a monotonous increase in elastic moduli with increasing cholesterol concentration.

Our results are in qualitative agreement with the experimental data by Tierney *et al.* on area compressibility modulus (obtained with the micropipette aspiration technique).<sup>39</sup> However, in the experiments, the increment in  $K_A$  was not linear with cholesterol concentration, and reached a plateau at 25% concentration. Also, the deviation between our simulation data and experiments is large at cholesterol concentrations of 20% and higher (380 vs 1160 mN/m), even if our data was calculated at higher temperature (323 K vs 297 K). We could not find any quantitative experimental data on the effect of cholesterol on the bending modulus of DPPC.

We now compare our simulation results with simulation results by Doktorova *et al.*<sup>11</sup>, calculated using real-space fluctuation analysis (for bending<sup>11</sup>) and local thickness fluctuations (for compressibility<sup>12</sup>) on all-atom simulations of pure DPPC and DPPC:CHOL mixtures, using the CHARMM36 force field. The agreement is excellent for the pure DPPC membrane in the fluid phase, at 323 K (Figure 3B and 3D), but the deviation is very large at 20% cholesterol concentration, for both elastic moduli (380 vs 3126 mN/m for  $K_A$ , 60 vs 130  $k_B T$  for  $k_c$ ). We notice that our simulations, predicting a much softer membrane, were carried out at higher temperature (323 K vs 298 K). Moreover, force field and methodology were substantially different from the ones used in the calculations by Doktorova, and the sampling was over one order of magnitude longer. Overall, both our CG simulations at 323 K and the all-atom simulations from Doktorova at 298 K predict  $K_A$  values far from the reported experimental data<sup>39</sup> measured at 297 K, and the reasons for the discrepancies remain unclear.



**Figure 4.** (A) Top view of DOPC:CHOL (60:40) lipid bilayer, flat geometry, showing no demixing. (B) Bending modulus of DOPC:CHOL bilayers as a function of cholesterol concentration, compared with data from Pan *et al.*<sup>40</sup> (using X-ray diffraction, at 303 K) and Gracia *et al.*<sup>41</sup> (using flicker spectroscopy, at 296 K). (C) Diffusion coefficients of DOPC molecules as a function of cholesterol concentration. (D) Area compressibility modulus of DOPC:CHOL bilayers as a function of cholesterol concentration, compared with simulation data from Doktorova *et al.*<sup>12</sup> using two different methods, local thickness fluctuations (LTF) and box area fluctuations (BAF), and experimental data from Rawicz *et al.*<sup>42</sup> (using micropipette aspiration, at 288 K).

We now examine the effect of cholesterol on the elastic properties of DOPC bilayers. As in the case of DPPC, we observe a linear increase in bending modulus with cholesterol concentration (Figure 4B), with corresponding slower dynamics (Figure 4C). The effect of 40% cholesterol on the bending modulus of the DOPC bilayer is weaker than the effect on the DPPC bilayer, but it is still significant (the increase being about 50%, as opposed to 100% in the case of DPPC). The increase in area compressibility modulus is moderate (23%). We notice that, in our model, both DOPC:CHOL and DPPC:CHOL are not ideal mixtures, particularly at 40% cholesterol concentration, as indicated by contact fraction analysis (Table 6). Yet, visual inspection does not

show any phase separation in the system, nor the presence of persistent domains, but only very transient, nanometer-scale compositional heterogeneities.

Experimental results reported in the literature show a different picture. Nagle and co-workers used X-ray diffraction methods to measure the bending modulus of DOPC with different cholesterol concentrations. They found that cholesterol does increase the thickness of both saturated and unsaturated PC lipid bilayers, including DOPC bilayers, but its effect on the bending rigidity of DOPC bilayers is negligible<sup>40</sup>, in stark contrast with our simulation results. Gracia *et al.* also observed a minor effect of cholesterol on the bending rigidity of DOPC<sup>41</sup>. On the other hand, a study by Rawicz *et al.* showed that the effect of cholesterol on the area compressibility modulus of DOPC lipid bilayers is very strong (from 300 mN/m for pure DOPC to 890 mN/m for DOPC:CHOL 1:1)<sup>42</sup> – an effect much stronger than observed in our simulations. Results from the latter experiments are well reproduced in all-atom simulations by Doktorova *et al.*<sup>12</sup>. We are not aware of other simulation data on DOPC-cholesterol mixtures. From the results above, it appears likely that the Martini force field underestimates the effect of cholesterol on  $K_A$ , and overestimates its effect on  $k_c$ .

### 3.4. Bending Modulus in other lipid mixtures

We calculated the bending modulus and area compressibility modulus of several phospholipid binary mixtures, including DLPC:DNPC, DPSM:DLiPC, POPC:PUPC, POPC:POPE, and DPPC:DLPC at different molar ratios, as well as three ternary mixtures DPPC:DLiPC:CHOL at different molar ratios. For the same mixtures we also calculated the fraction of mixed contacts, to verify if the mixtures are homogeneous. The list of studied systems and the main results are summarized in Table 7.

**Table 7.** Values of contact fraction ( $f_{mix}$ ), bending modulus ( $k_c$ ), and area compressibility modulus ( $K_A$ ) for lipid binary and ternary mixtures.

Bilayer	Temperature (K)	Lipid mixtures	Contact Fraction (f) <sup>a</sup>	$k_c (k_B T)$	$K_A$ (mN/m)
DLPC : DNPC	323	100 : 0	-	23.7 ± 1.0	287 ± 1
		80 : 20	4.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	16.4 ± 1.2	248 ± 1
		60 : 40	7.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	15.9 ± 1.3	220 ± 4
		40 : 60	9.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	9.1 ± 2.4	209 ± 5
		20 : 80	16.1 ± 5.0 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.8	195 ± 6
		0 : 100	-	9.0 ± 1.1	179 ± 4
POPC : PUPC	323	100 : 0	-	24.6 ± 1.1	308 ± 2
		80 : 20	18.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	17.2 ± 1.1	283 ± 4
		60 : 40	35.3 ± 0.4 <sup>b</sup>	16.6 ± 1.1	268 ± 9
		40 : 60	53.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	13.6 ± 1.1	252 ± 4
		20 : 80	73.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	10.8 ± 1.1	234 ± 2
		0 : 100	-	9.4 ± 1.1	223 ± 5
POPC : POPE	323	100 : 0	-	30.3 ± 1.0	386 ± 2
		80 : 20	20.9 ± 0.4 <sup>c</sup>	28.8 ± 1.1	385 ± 5
		60 : 40	41.5 ± 0.3 <sup>c</sup>	26.7 ± 0.9	411 ± 2
		40 : 60	59.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	28.9 ± 1.1	421 ± 11
		20 : 80	79.1 ± 0.6 <sup>c</sup>	27.2 ± 1.1	441 ± 1
		0 : 100	-	28.9 ± 1.0	463 ± 11
DPPC : DLPC	323	100 : 0	-	29.8 ± 1.1	291 ± 1
		80 : 20	20.1 ± 0.4 <sup>d</sup>	27.6 ± 1.0	281 ± 2
		60 : 40	39.5 ± 0.5 <sup>d</sup>	25.8 ± 1.0	283.5 ± 4.5
		40 : 60	59.7 ± 0.5 <sup>d</sup>	22.3 ± 1.1	288.7 ± 0.1
		20 : 80	80.2 ± 0.6 <sup>d</sup>	23.8 ± 1.0	289.3 ± 0.7
		0 : 100	-	23.7 ± 1.0	292.0 ± 4.8
DPSM:DLiPC	298	100 : 0	-	35.4 ± 1	317.0 ± 5
		80 : 20	15.3 ± 1.9 <sup>e</sup>	25.7 ± 1.2	300.7 ± 12
		60 : 40	31.4 ± 1.1 <sup>e</sup>	19.5 ± 1.2	295 ± 8.1
		40 : 60	48.3 ± 0.1 <sup>e</sup>	18.6 ± 1.2	282.4 ± 1.7
		20 : 80	70.5 ± 0.1 <sup>e</sup>	17.6 ± 1.1	268.6 ± 12
		0 : 100	-	16.2 ± 1.0	255.7 ± 15
DPSM:DLiPC	323	100 : 0	-	29.5 ± 1.1	383.4 ± 6.7
		80 : 20	17 ± 0.7 <sup>e</sup>	22.2 ± 1.2	370.2 ± 6.5
		60 : 40	33 ± 0.5 <sup>e</sup>	15.1 ± 1.1	281.6 ± 5.6
		40 : 60	51 ± 0.4 <sup>e</sup>	13 ± 1.1	265.8 ± 7.1
		20 : 80	73 ± 0.2 <sup>e</sup>	13.7 ± 1.1	262.8 ± 1.2
		0 : 100	-	12.9 ± 1	256.1 ± 1.7
DPPC:DLiPC:CHOL	295	61:2:37	2.6 ± 0.1 <sup>f</sup>	98.8 ± 1.1	1066.4 ± 7.1
		42:28:30	17 ± 0.3 <sup>f</sup>	41.7 ± 1.2	413.9 ± 1.3
		8:75:17	78 ± 0.1 <sup>f</sup>	23.1 ± 1.2	282.7 ± 0.9

<sup>a</sup>  $f_{DLPC-DNPC}$

<sup>b</sup>  $f_{POPC-PUPC}$

<sup>c</sup>  $f_{POPC-POPE}$

<sup>d</sup>  $f_{DPPC-DLPC}$

<sup>e</sup>  $f_{\text{DPSM-DLiPC}}$

<sup>f</sup>  $f_{\text{DPPC-DLiPC}}$

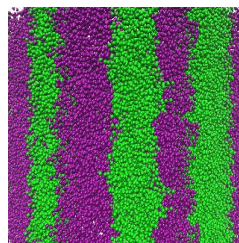
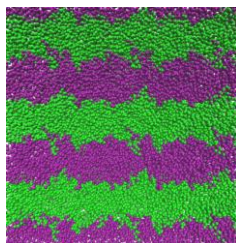
Lipid mixture

Flat shape

Buckle

Legend

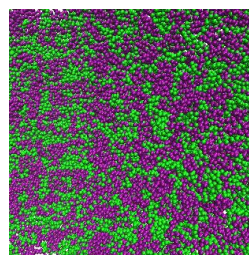
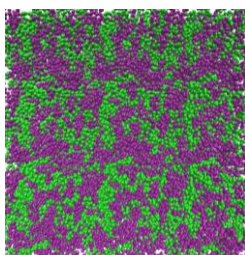
DNPC:DLPC



● DNPC

● DLPC

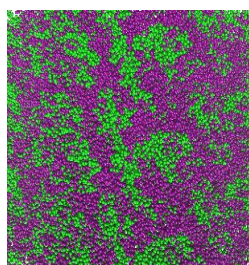
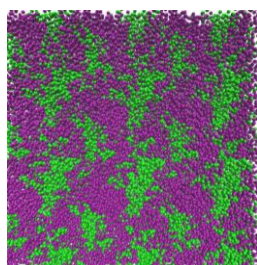
DPPC:DLPC



● DPPC

● DLPC

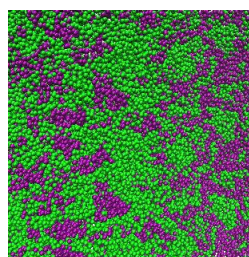
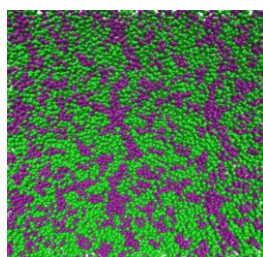
POPC:PUPC



● POPC

● PUPC

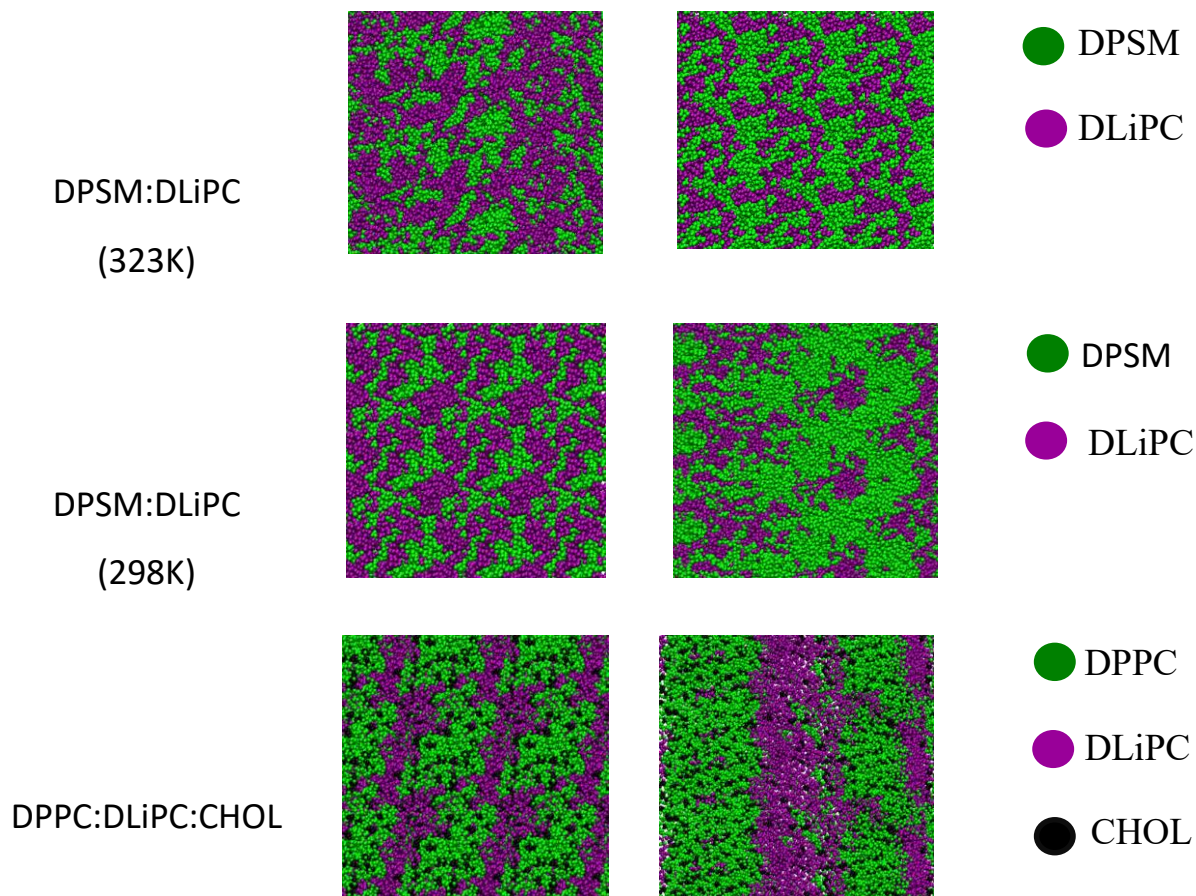
POPC:POPE



● POPC

● POPE



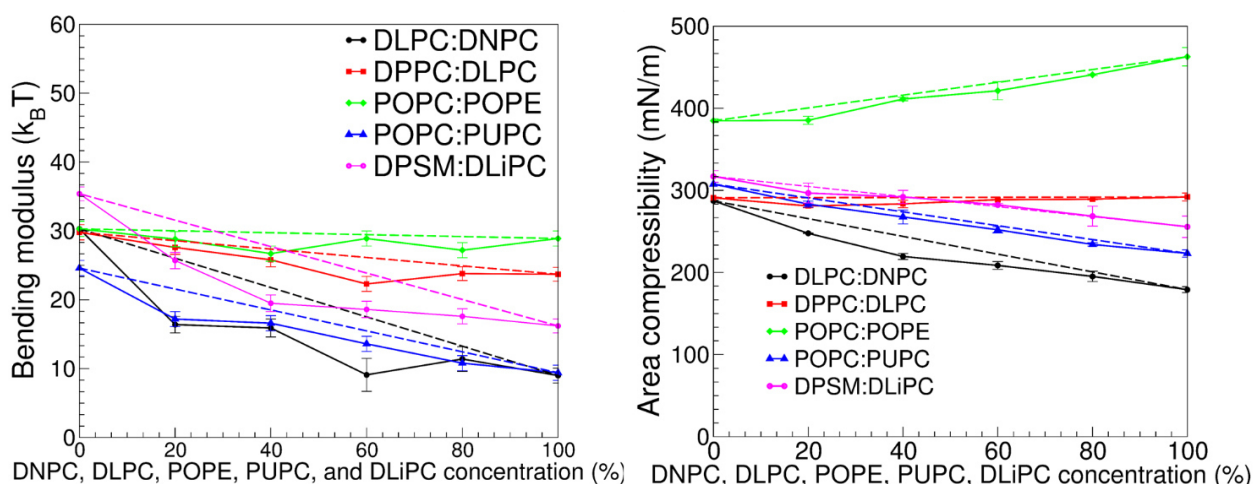


**Figure 5.** Snapshots from selected simulations of lipid mixtures, top view of bilayers in the *size* simulations (flat geometry) and the *force* simulations (buckle geometry). (A) DLPC:DNPC; (B) DPPC:DLPC; (C) POPC:PUPC; (D) POPC:POPE; (E) DPSM:DLiPC at 323K; (F) DPSM:DLiPC at 298K; (G) DPPC:DLiPC:CHOL. For all binary mixture we only show a snapshot of the 60:40 mixture, while for the ternary mixture the molar ratio is 42:28:30.

Calculations of the fraction of mixed contacts indicate that most binary mixtures are rather homogeneous, with the exception of the DLPC:DNPC mixture. This is also immediately clear from visual inspection of the trajectories, showing that different lipid types segregate in different regions, giving rise to phase separation with formation of stripes (Figure 5A). Phase separation was not complete during the simulations, due to the limited sampling and the relative stability of the striped phases. The strong tendency towards phase separation appears to be due to the large

difference in the acyl chain composition of the two lipids, featuring no unsaturations (DLPC) and 12 unsaturations (DNPC).

In the case of nearly ideal mixtures, both elastic moduli were very close to the weighted averages of the moduli for the pure components. Deviations from the weighted average were generally lower than 10%. The largest deviations were observed for the DPPC:DLiPC mixture at 298 K, that also showed the largest deviations from ideal mixing. In the case of mixtures forming stable domains (i.e., in our case, the four DLPC:DNPC mixtures), both elastic moduli deviated significantly from weighted averages of the moduli of the individual components (Figure 6A, 6B). Interestingly, the apparent bending modulus of the mixture appears to be dominated by the softer component – the one that actually bends, and is therefore responsible for the mechanical force exerted on the box walls.



**Figure 6.** (A) Bending moduli for DLPC:DNPC, DPPC:DLPC, POPC:POPE, POPC:PUPC, and DPSM:DLiPC as a function of DNPC, DLPC, POPE, PUPC, and DLiPC concentrations (0, 20, 40, 60, 80, and 100%, respectively). (B) Area compressibility moduli for the same mixtures.

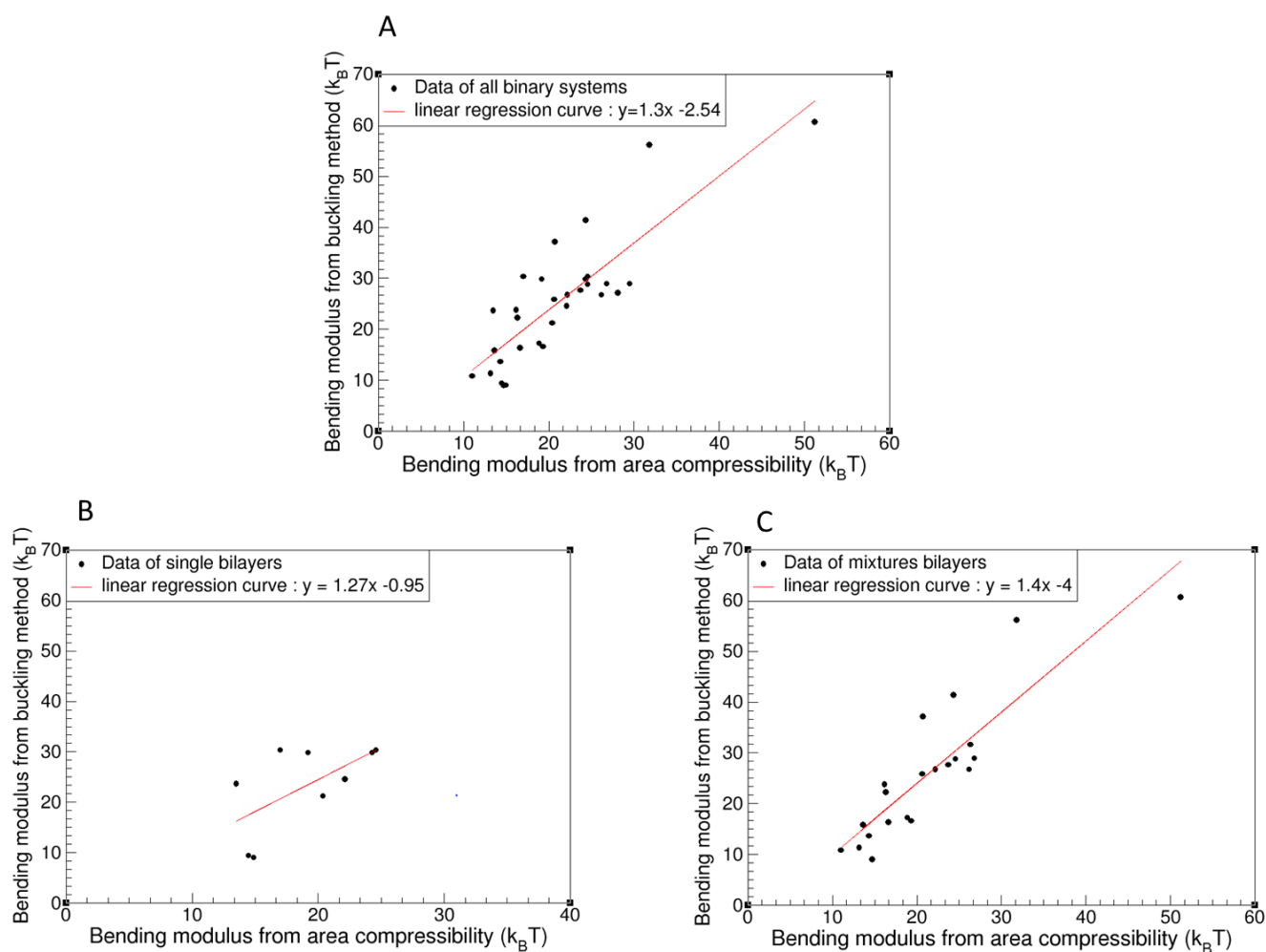
In light of the interesting results obtained for ideally mixed and non-ideally mixed binary mixtures, we wondered if ternary mixtures also show similar behavior. The DPPC:DLiPC:CHOL mixture with molar ratio 42:28:30 was previously shown to demix into a liquid ordered ( $L_o$ ) phase and a liquid disordered ( $L_d$ ) phase<sup>43-44</sup>; the composition of the  $L_o$  phase is 61:2:37, and that of the

L<sub>d</sub> phase is 8:75:17. We simulated all three mixtures at 295 K, and confirmed (by visual inspection and calculations of contact fraction) that the first one gives phase separation while the other two are rather homogeneous. It can be shown easily that the first mixture is approximately 65% L<sub>o</sub> and 35% L<sub>d</sub>. As expected, the values of bending and area compressibility modulus for the L<sub>o</sub> phase are much higher than for the L<sub>d</sub> phase (99  $k_B T$  vs 23.1  $k_B T$  for the bending modulus, and 1066 mN/m vs 283 mN/m for the area compressibility modulus). Remarkably, the values of the elastic moduli for the phase separated mixture are closer to the values for the softer membrane, as already observed for binary mixtures. The phase separated mixture consists of approximately 65% L<sub>o</sub> phase and 35% L<sub>d</sub> phase; the elastic moduli calculated for the phase separated mixture are significantly lower than the weighted averages of the moduli of the two phases: 42  $k_B T$  vs 72  $k_B T$  for  $k_c$  and 414 mN/m vs 792 mN/m for  $K_A$ , both much closer to the value for the L<sub>d</sub> phase than the L<sub>o</sub> phase. The new results confirm our observation that the apparent elastic constants of non-homogeneous mixtures are dominated by the properties of the softer component. We remark here that, in the case of strong deviations from ideal mixing, the calculation of elastic moduli for the mixture is not warranted, as no single elastic constant can be ascribed to the material. Still, the information obtained here may be interesting for the interpretation of experimental data: domains are not always optically resolved, and it is possible that low values of bending rigidity measured experimentally for lipid mixtures actually reflect the rigidity of the softest component.

### 3.5. Relationship between bending modulus and area compressibility modulus

Having determined both the bending modulus  $k_c$  and the area compressibility modulus  $K_A$  of a number of lipid bilayers, we now set out to test the relationship between the two moduli. In principle, based on elasticity theory, a simple relationship holds between the two elastic moduli, expressed in equation 1<sup>16</sup>,  $k_c = \frac{K_A}{24}(h - h_0)^2$  (where  $h$  is the thickness of the bilayer and  $h_0 = 1$  nm denotes a non-deformable length). This relationship has been used by some authors<sup>45</sup> to predict the value of  $k_c$  (more expensive to calculate) from  $K_A$  (calculated rapidly). Here, we compared the data obtained from buckling simulations and those using the equation 1, and we

plotted the regression curves (Figure 7). Considering all bilayers, we obtain a correlation coefficient of 0.84 for the linear regression, indicating a mediocre correlation between the two methods. The slope of 1.3 indicates that equation 1 generally underestimates the bending modulus (Figure 7A). Considering separately single-component and mixed bilayers, the results are similar (the slope of the regression curves is 1.27 for single-component bilayers, and 1.4 for mixtures; see Figure 7B and 7C). Deviations between the results of buckling simulations and equation 1 can be as large as a factor of 2, indicating that predictions of  $k_c$  based on  $K_A$  are unreliable. Our findings corroborate experimental data reported by Evans and co-workers, questioning the validity of the simple relationship (eq. 1) even in the case of single component bilayers.<sup>17</sup>



**Figure 7.** Bending modulus obtained from buckling simulations (y axis) vs equation 1 (x axis), and linear regression curve for (A) all lipid bilayers, (B) single-component bilayers, and (C) lipid mixtures.

## 4. Conclusions

The present work tackles a few methodological aspects regarding the calculation and interpretation of bending modulus calculations based on simulations of buckled membranes. First, we assessed the reproducibility of the results with different system sizes and strain. Our data indicate that the method yields reproducible values of bending modulus when the system size is equal to or larger than a certain threshold, that is approximately  $L_x = 32$  nm,  $L_y = 8$  nm, and  $L_z = 20$  nm. Simulations of smaller systems provide unreliable results, while for larger systems the computational cost is increased with no clear benefit. Second, we calculated the bending modulus of a series of single-component lipid bilayers. Our results compare well with experimental estimates found in the literature. As expected, the bending rigidity decreases sharply with the number of unsaturations, while it is less sensitive to acyl chain length. Charged head groups also reduce bending rigidity, possibly due to head group repulsion. Third, we checked the effect of cholesterol on the elastic moduli of DPPC and DOPC bilayers. Comparison with the literature shows several discrepancies, with our method predicting a monotonic increase in both elastic moduli of saturated and unsaturated PC lipids with increasing cholesterol concentration – a trend not confirmed by experiments, matching only qualitatively all-atom simulations. The reasons for the discrepancies remain unclear, and we speculate that they might be related to limitations of the coarse-grained representation adopted in our simulations. Fourth, we determined the elastic moduli for a number of binary and ternary lipid mixtures, with different chain length and level of unsaturation, namely DLPC:DNPC, DPPC:DLPC, POPC:PUPC, POPC:POPE, DPSM:DLiPC, and DPPC:DLiPC:Chol. We found that, in the case of homogeneous mixtures, the values of the elastic moduli can be predicted from the weighted average of the moduli of the two components. Deviations from average appear to be related to deviations from ideal mixing. In the case of phase-separated mixtures, the apparent bending modulus is closer to

the value of the softer component – an observation that might be interesting for the interpretation of experimental results.

Finally, we verified the relationship between bending modulus and area compressibility modulus calculated directly from simulations, and compared it to theoretical predictions. We found that predictions of bending modulus based on the area compressibility modulus are unreliable, both for single-component bilayers and for lipids mixtures.

Corresponding Author:

luca.monticelli@inserm.fr

ORCID: 0000-0002-6352-4595

#### ACKNOWLEDGMENT

LM acknowledges funding from the *Institut National de la Sante et de la Recherche Medical* (INSERM). Calculations were performed in part at the French supercomputing center CINES (Grant A0060710138).

#### ABBREVIATIONS

**Table 9.** Names of lipids and their abbreviations used in this article.

lipid name	abbreviation	sn-1 chain	sn-2 chain
1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine <sup>a</sup>	DLPC	12:0	12:0
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DPPC	16:0	18:0
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	POPC	16:0	18:1

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DOPC	18:1	18:1
1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DLIPC	18:2	18:2
1,2-nisinoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DNPC	24:6(6c,9c,12c,15c,18c,21c)	24:6(6c,9c,12c,15c,18c,21c)
1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	PUPC	16:0	22:6
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	POPE	16:0	18:1
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol	POPG	16:0	18:1
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylserine	POPS	16:0	18:1
N-(hexadecanoyl)-hexadecasphing-4-enine-1-phosphocholine	DPSM	18:1	18:0

<sup>a</sup> sn-glycero-3-phosphocholine is also commonly written as phosphatidylcholine, and likewise for the other head groups.

## 5. References

1. van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W., Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, 9 (2), 112-124.
2. Edidin, M., THE STATE OF LIPID RAFTS: From Model Membranes to Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003, 32 (1), 257-283.
3. Singer, S. J.; Nicolson, G. L., The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 1972, 175 (4023), 720-731.
4. Engelman, D. M., Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 2005, 438 (7068), 578-580.
5. Wenk, M. R., The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4 (7), 594-610.

6. Marrink, S. J.; Corradi, V.; Souza, P. C. T.; Ingolfsson, H. I.; Tieleman, D. P.; Sansom, M. S. P., Computational Modeling of Realistic Cell Membranes. *Chemical Reviews* 2019, 119 (9), 6184-6226.
7. Boichichio, D.; Monticelli, L., Chapter Five-The Membrane Bending Modulus in Experiments and Simulations: A Puzzling Picture. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* 2016, 23, 117-143.
8. Marrink, S. J.; de Vries, A. H.; Mark, A. E., Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108 (2), 750-760.
9. May, E. R.; Narang, A.; Kopelevich, D. I., Role of molecular tilt in thermal fluctuations of lipid membranes. *Phys. Rev. E* 2007, 76 (2).
10. Denotter, W.; Shkulipa, S., Intermonolayer Friction and Surface Shear Viscosity of Lipid Bilayer Membranes☆. *Biophys. J.* 2007, 93 (2), 423-433.
11. Doktorova, M.; Harries, D.; Khelashvili, G., Determination of bending rigidity and tilt modulus of lipid membranes from real-space fluctuation analysis of molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2017, 19 (25), 16806-16818.
12. Doktorova, M.; LeVine, M. V.; Khelashvili, G.; Weinstein, H., A New Computational Method for Membrane Compressibility: Bilayer Mechanical Thickness Revisited. *Biophys. J.* 2019, 116 (3), 487-502.
13. Noguchi, H., Anisotropic surface tension of buckled fluid membranes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2011, 83 (6 Pt 1), 061919.
14. Helfrich, W., Elastic properties of lipid bilayers - Theory and possible experiments. *Zeitschrift Fur Naturforschung C - a Journal of Biosciences* 1973, C 28 (11-1), 693-703.
15. Hu, M.; Diggins, P.; Deserno, M., Determining the bending modulus of a lipid membrane by simulating buckling. *J. Chem. Phys.* 2013, 138 (21).
16. Rawicz, W.; Olbrich, K. C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E., Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* 2000, 79 (1), 328-339.
17. Evans, E.; Rawicz, W.; Smith, B. A., Back to the future: mechanics and thermodynamics of lipid biomembranes. *Faraday Discuss.* 2013, 161, 591-611.
18. Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E., GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015, 1-2, 19-25.



19. de Jong, D. H.; Singh, G.; Bennett, W. F.; Arnarez, C.; Wassenaar, T. A.; Schafer, L. V.; Periole, X.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J., Improved Parameters for the Martini Coarse-Grained Protein Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* 2013, 9 (1), 687-97.
20. Marrink, S. J.; Risselada, H. J.; Yefimov, S.; Tieleman, D. P.; de Vries, A. H., The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111 (27), 7812-7824.
21. Marrink, S. J.; Tieleman, D. P., Perspective on the Martini model. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42 (16), 6801-6822.
22. Monticelli, L.; Kandasamy, S. K.; Periole, X.; Larson, R. G.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J., The MARTINI coarse-grained force field: Extension to proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 2008, 4 (5), 819-834.
23. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M., Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007, 126 (1), 014101.
24. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; di Nola, A.; Haak, J. R., Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 1984, 81, 3684-3690.
25. Parrinello, M.; Rahman, A., Polymorphic Transitions in Single Crystals - a New Molecular Dynamics Method. *J. Appl. Phys.* 1981, 52 (12), 7182-7190.
26. Domanski, J.; Marrink, S. J.; Schafer, L. V., Transmembrane helices can induce domain formation in crowded model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 2012, 1818 (4), 984-994.
27. Kucerka, N.; Liu, Y.; Chu, N.; Petrache, H. I.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F., Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 2005, 88 (4), 2626-37.
28. Fernandez-Puente, L.; Bivas, I.; Mitov, M. D.; Méléard, P., Temperature and Chain Length Effects on Bending Elasticity of Phosphatidylcholine Bilayers. *Europhysics Letters (EPL)* 1994, 28 (3), 181-186.
29. Watson, M. C.; Penev, E. S.; Welch, P. M.; Brown, F. L. H., Thermal fluctuations in shape, thickness, and molecular orientation in lipid bilayers. *J. Chem. Phys.* 2011, 135 (24), 244701.
30. Levine, Z. A.; Venable, R. M.; Watson, M. C.; Lerner, M. G.; Shea, J.-E.; Pastor, R. W.; Brown, F. L. H., Determination of Biomembrane Bending Moduli in Fully Atomistic Simulations. *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136 (39), 13582-13585.

31. Venable, R. M.; Brown, F. L. H.; Pastor, R. W., Mechanical properties of lipid bilayers from molecular dynamics simulation. *Chem. Phys. Lipids* 2015, 192, 60-74.
32. Watson, M. C.; Brandt, E. G.; Welch, P. M.; Brown, F. L., Determining biomembrane bending rigidities from simulations of modest size. *Phys. Rev. Lett.* 2012, 109 (2), 028102.
33. Chaurasia, A. K.; Rukangu, A. M.; Philen, M. K.; Seidel, G. D.; Freeman, E. C., Evaluation of bending modulus of lipid bilayers using undulation and orientation analysis. *Physical Review E* 2018, 97 (3), 032421.
34. Seto, H.; Yamada, N. L.; Nagao, M.; Hishida, M.; Takeda, T., Bending modulus of lipid bilayers in a liquid-crystalline phase including an anomalous swelling regime estimated by neutron spin echo experiments. *The European Physical Journal E* 2008, 26 (1), 217.
35. Nagle, J. F., Experimentally determined tilt and bending moduli of single-component lipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 2017, 205, 18-24.
36. Mell, M.; Moleiro, L. H.; Hertle, Y.; Fouquet, P.; Schweins, R.; Lopez-Montero, I.; Hellweg, T.; Monroy, F., Bending stiffness of biological membranes: what can be measured by neutron spin echo? *Eur Phys J E Soft Matter* 2013, 36 (7), 75.
37. Tarazona, P.; Chacón, E.; Bresme, F., Thermal fluctuations and bending rigidity of bilayer membranes. *J. Chem. Phys.* 2013, 139 (9), 094902.
38. Henriksen, J.; Rowat, A. C.; Ipsen, J. H., Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *Eur. Biophys. J.* 2004, 33 (8), 732-41.
39. Tierney, K. J.; Block, D. E.; Longo, M. L., Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol. *Biophys. J.* 2005, 89 (4), 2481-2493.
40. Pan, J. J.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F., Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys. Rev. E* 2009, 80 (2).
41. Gracià, R. S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R. L.; Lipowsky, R.; Dimova, R., Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter* 2010, 6 (7), 1472-1482.
42. Rawicz, W.; Smith, B. A.; McIntosh, T. J.; Simon, S. A.; Evans, E., Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids. *Biophys. J.* 2008, 94 (12), 4725-4736.

43. Risselada, H. J.; Marrink, S. J., The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105 (45), 17367-17372.
44. Barnoud, J.; Rossi, G.; Marrink, S. J.; Monticelli, L., Hydrophobic compounds reshape membrane domains. *PLoS Comp. Biol.* 2014, 10 (10), e1003873.
45. Wang, Y.; Gkeka, P.; Fuchs, J. E.; Liedl, K. R.; Cournia, Z., DPPC-cholesterol phase diagram using coarse-grained Molecular Dynamics simulations. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2016, 1858 (11), 2846-2857.

# Chapitre 5: Effet de la quercétine sur l'élasticité du lipoïde E80, mesurée par AFM et calculée par la dynamique moléculaire MD

Dans ce chapitre, nous décrivons l'effet de la quercétine sur le module de flexion de la membrane des liposomes EggPC, en utilisant des mesures expérimentales AFM et des simulations numériques MD. Dans le cas de simulation, les liposomes sont remplacés par une membrane plane constituée de (POPC + POPE + Chol), qui ressemble autant mieux à la composition des liposomes blancs utilisés expérimentalement (lipoïde E80 + cholestérol). Les conditions de mesure et de calcul sont celles optimisées dans les chapitres 3 et 4. Il s'agit des indentations des liposomes, blancs (100:74) ou chargés de quercétine (100:55:15), avec une sonde portant une pointe d'apex pyramidale et ayant une constante de forces de 0,08 N/m, et des courbes de forces interprétées dans la zone d'indentation par le modèle de contact de Coque. Quant aux calculs numériques, ils sont lancés pour des petits systèmes tout atome, ce qui donne avantage à la méthode de fluctuations de la surface. De petites boîtes décrivant le mélange lipidique POPC:POPE:Chol (lipides:cholestérols 65:35) et respectivement ce même mélange contenant 4, 8, 12 ou 16% de quercétine ont été construites et simulées pour déterminer le module de compressibilité dans chaque cas

La quantité de quercétine ajoutée ne produit aucune variation dans les dimensions, la structure et la morphologie des liposomes durant les observations AFM. Par contre, le traitement des courbes de force en mode spectroscopie de force AFM, éprouve une diminution de la rigidité des vésicules contenant cette molécule. Le module d'Young des liposomes chargés de quercétine repère  $15 \pm 4$  MPa envers une valeur égale à  $22 \pm 5$  MPa mesurée dans le cas des EggPC blancs.

La diminution de la rigidité reflète une interaction de la molécule de quercétine avec la bicouche lipidique des liposomes E80, due à une pénétration dans celui-ci. Cette pénétration a été représentée en dynamique moléculaire, à l'aide de l'interface graphique VMD, ce qui n'était

pas évident dans les images AFM. Nous avons schématisé la localisation de la quercétine dans la membrane, à l'interface entre la partie hydrophobe et la surface polaire de la bicouche lipidique, due à la nature amphiphile de cette molécule. Ceci produit un changement dans les propriétés structurales et dynamiques de la membrane lipidique en présence de quercétine. Ce changement est d'autant plus grand que la concentration de la quercétine dans la membrane est plus grande. Par analogie avec les mesures AFM, les calculs du module de compressibilité par la dynamique moléculaire, confirment sa diminution relative au taux de quercétine présent dans la membrane.

# Quercetin effect on lipid membrane rigidity: assessment by atomic force microscopy and molecular dynamics simulations

Jad Eid <sup>a,b</sup>, Alia Jraij <sup>a,\*</sup>, Hélène Greige-Gerges<sup>a</sup>, Luca Monticelli <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Bioactive Molecules Research Laboratory, Doctoral School of Sciences and Technologies, Faculty of Sciences, Lebanese University

<sup>b</sup> University of Lyon, CNRS, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB, UMR 5086), F-69007, Lyon, France \*

Corresponding authors: ajraij@ul.edu.lb, luca.monticelli@inserm.fr

## Abstract

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyl-flavone) is a natural flavonoid with many valuable biological effects, but its solubility in water is low, posing major limitations in applications. Quercetin encapsulation in liposomes increases its bioavailability; the drug effect on liposome elastic properties is required for formulation development. Here, we quantify the effect of quercetin molecules on the rigidity of lipid E80 liposomes using atomic force microscopy (AFM) and molecular dynamics simulations. AFM images show no effect of quercetin molecules on liposomes morphology and structure. However, AFM force curves suggest that quercetin softens lipid membranes; the Young modulus value of liposomes encapsulating quercetin is smaller than that determined for blank liposomes. We used MD simulations to interpret the effect of quercetin on membrane rigidity. This quantitative decrease was confirmed by MD simulations which indicate that quercetin, decreases the membrane thickness, increases the acyl chains disorder, and increases the diffusion coefficient of lipid molecules. Such changes are due to the localization of quercetin in the membrane at the interface between the hydrophobic core and polar head groups of the lipids.

**Keywords:** Quercetin, lipoid E80, morphology, Young modulus, area compressibility modulus, structural properties, dynamic properties.

## 1. Introduction

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyl-flavone) is a common flavonoid occurring naturally in a variety of brightly colored plant-based foods (e.g., onion, apple, broccoli, tea, and red wine<sup>1</sup>). It has been increasingly investigated due to its many beneficial properties, including antioxidant<sup>2,3</sup>, antiviral<sup>4,5</sup>, anticancer<sup>6,7</sup>, antimicrobial<sup>8,9</sup>, anti-inflammatory<sup>10,11</sup>, and anti-obesity<sup>12</sup> properties. Currently there is growing interest for using quercetin as an ingredient in pharmaceutical preparations or food products. However, because of its low aqueous solubility (about 0.01 mg/mL at 25 °C)<sup>13</sup>, low bioavailability<sup>14</sup>, and reduced chemical stability<sup>15</sup>, the use of quercetin is still limited. The encapsulation of quercetin in liposomes could overcome the drawbacks related to the physico-chemical properties of this flavonoid<sup>16–18</sup>. Experimental works reported the encapsulation of quercetin liposomes<sup>18,19</sup>. The encapsulating drugs or other small molecules, it is important that liposome mechanical stability and elastic properties are of great importance in formulation development, since they may impacts size, shape, membrane permeability, and drug loading efficiency<sup>20–23</sup>, and tissue targeting<sup>23,24</sup>. These aspects have been investigated by several research teams<sup>4,20,25–27</sup>. Liposome elasticity may be affected by the incorporation of quercetin, but the effect of quercetin on liposome's elasticity is still not known.

Our study aims to characterize the elastic properties of liposomes encapsulating quercetin. In our previous study, we demonstrated that quercetin-loaded lipoid E80 liposomes exhibited better encapsulation efficiency compared to Phospholipon 90H and Lipoid S100 liposomes formulations<sup>20</sup>. Taking into consideration the yield of the process, Lipoid E80 was proved to be the best formulation available for Quercetin encapsulation. In order to characterize the elastic response of liposome upon incorporation of quercetin, we use both experimental and computational methods. We aim at studying the elasticity of nano-sized liposomes, below 100 nm, because nano-sized liposomes are the most useful in drug delivery. Considering the small size, Atomic force microscopy (AFM) is a good choice for experimental measures of elasticity, as

it can be used directly on nano-sized liposomes without additives. AFM can provide high-resolution images of a surface at nanometer scales, and it has been often used in the study of lipid vesicles<sup>28–30</sup>. Recently, we optimized the AFM experimental conditions for measuring the Young modulus of E80 vesicles<sup>31</sup>. The optimized conditions are applied in the present study, and the AFM data were interpreted with molecular dynamics (MD) simulations. Previous MD investigations have probed the position and orientation of quercetin in lipid membranes, and showed that quercetin is found about half way between the hydrophobic core and the polar head groups<sup>32–34</sup>. Here, we use MD simulations to predict the effect of quercetin on membrane elastic properties, and particularly the area compressibility modulus<sup>35</sup>. Finally, we use simulations to provide a detailed view of the structure and dynamics of bilayers incorporating quercetin, allowing for an interpretation of the experimental findings in terms of interactions at the atomic level.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Experimental materials**

Lipoid E80, purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) is constituted of 80-86% egg phosphatidylcholine (PC), 7-9.5% phosphatidylethanolamine (PE), 3% lyso-PC, 0.5% lyso-PE, 1-2% sphingomyelin, 2% water, 0.2% ethanol. Ethanol, quercetin (>95%), and cholesterol (95%) (Chol) were purchased from Sigma Aldrich (France).

Pyrex-nitride probes triangular cantilevers PNP-TR (NanoWord Innovative Technologies, Nano and More, Paris, France) integrating a sharpened pyramidal tip with a radius < 10 nm and a macroscopic half cone 35° angle, were used for imaging and indenting liposomes. Mica sheets (9 mm diameter and 0.1 mm thickness) were purchased from Nano and More (France).

### **2.2. Experimental setup: preparation of liposomes**

The ethanol injection method was used to prepare liposomes according to the protocol described by Azzi *et al.*<sup>20</sup> Two batches were prepared: 1, lipoid E80:Chol liposomes; 2, quercetin loaded



lipoid E80:Chol liposomes. Briefly, the appropriate amounts of phospholipids, Chol, and quercetin, were dissolved in ethanol (10 ml) at concentrations of 40, 20, and 3.02 mg/ml, respectively. The lipoid E80:Chol molar ratio was of 100:98 and that of lipoid E80:Chol:quercetin was of 100:98:20. The organic solution was then injected, using a syringe pump into ultra-pure water (20 ml) under magnetic stirring (400 rpm). Ethanol was removed by rotary evaporation at 40°C under reduced pressure and the liposome suspensions were stored at 4°C. AFM measurements were realized during three months after the preparation of liposomes. The final composition was 100:74 (phospholipids:Chol) for blank liposomes and 100:55:15 (phospholipids:Chol:quercetin) for quercetin-loaded liposomes.

### **2.3. AFM measurements**

AFM imaging and force measurements were performed at room temperature using an Agilent 5420 microscope (Key sight, California, USA) equipped with the AFM probe described before. An aliquot of the liposomal suspension was diluted 10 times in ultrapure water. Then, 10 µl of the diluted formulation was deposited on freshly cleaved mica surface and left for 15 min in air at room temperature, for adsorption. The mica sheet was rinsed with ultrapure water to remove the non-adsorbed vesicles. The sample was then imaged in contact mode with a typical scan rate of 1 Hz, resolution of 512 x 512 pixels per image, 5x5, and 2x2 µm<sup>2</sup> images sizes, scanning angle of 0°, and a set point typically below 0.1 nN. For each sample, adsorbed vesicles were observed, and 200 force curves were recorded for 200 different liposomes (one curve per liposome), in force spectroscopy mode. Each curve was obtained by indenting centrally an adsorbed vesicle with a maximum force of 1.5 nN and a rate of 0.145 µm/s. Before the indentation measurement, the deflection sensitivity (deflection/voltage ratio) was calibrated on a clean mica surface. The force calibration plot was converted into force versus liposome deformation. This is possible by determining the zero force point, and the zero separation point  $Z_0$  between the tip and the sample. Zero force was determined where the separation tip-sample is large enough and the cantilever deflection attains its constant initial value  $d_0$ .  $Z_0$  was identified where the deflection of the cantilever was linear with the expansion of the piezo scanner.

In our previous work, we demonstrated that Shell model provides the closest agreement between our AFM data and other experimental data for the membrane bending modulus comparing to Hertz model<sup>31</sup>. Hence, we fitted the force versus liposome deformation curves with Shell model to extract the Young modulus  $E$ . The model was applied in the elastic region, when the indentation of the vesicle did not exceed 10% of its diameter. The Young modulus was then determined using the following mathematical relationship linking the measured force with the measured deformation<sup>36</sup>:

$$F = \frac{E4h^2 C}{R\sqrt{3(1-\nu^2)}} \delta \quad (\text{Equation 58})$$

where  $R$  is the radius of curvature of the indented liposomes, and  $h$  is the membrane thickness.  $C$  is a correction factor introduced by Berry *et al.* for adsorbed vesicles on a rigid substrate. The authors suggest that the measured indentation is the sum of indentions caused by both the indenter and the substrate<sup>37</sup>. The Poisson's ratio ( $\nu$ ) is assumed to be 0.5 and the membrane thickness 4 nm.

The bending modulus  $k_c$  can be derived from the following relation<sup>38</sup>:

$$k_c = \frac{Eh^3}{12(1-\nu^2)} \quad (\text{Equation 59})$$

## 2.4. Molecular simulations

We built the topology for quercetin using an automatic server, the LigParGen web-based service<sup>39-41</sup>, providing a complete topology for the OPLS-AA force field<sup>42</sup>, compatible with the GROMACS software<sup>43</sup> that we used for all simulations. We used only the neutral form of the molecule, because the  $pK_a$  of quercetin is close to neutral pH<sup>44</sup>; also, we are mostly interested in studying the molecule in a membrane environment, where the  $pK_a$  will be higher, i.e., it will be more difficult to deprotonate the weak acid and the neutral form is more likely<sup>44</sup>. The LigParGen server produces partial charges based on the precise geometry of the submitted

molecule, so we used 2 conformations for quercetin, differing by the rotation of the main dihedral angle, corresponding to conformations (a) with the rings in the same plane and (b) rotated by 180 degrees. The partial charges produced by the server were similar but not identical, and we used the average value of the partial charge for each atom. The complete topology is provided in Supporting Information. Figure 1, show the geometry of quercetin molecule.

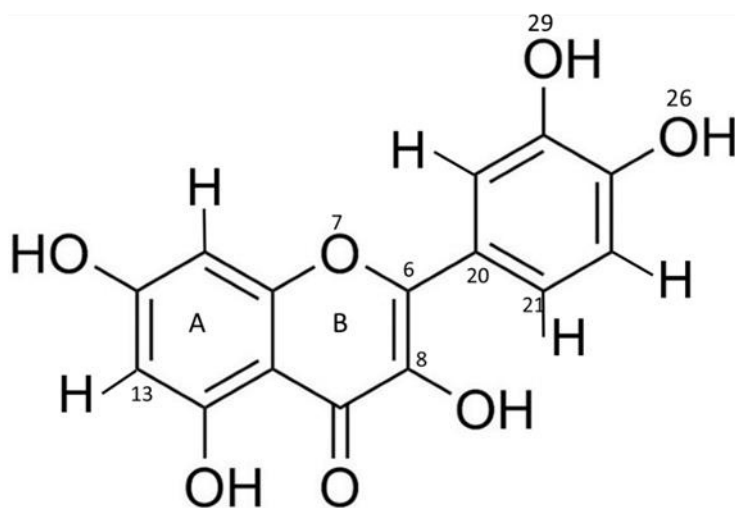


Figure 1. Geometry and atom numbering of quercetin.

We then set up a simulation of one quercetin molecule in a box full of SPC (single point charge) water<sup>45</sup> of size (4x4x4 nm). We first performed energy minimization (steepest descent, 10000 steps), then equilibration for 20 ns in the NPT ensemble (298K and 1 bar), and finally a production run for 200 ns.

We used model membranes similar to the ones used in the AFM experiments, at the same temperature, to provide a molecular-level interpretation of AFM results. We used MemGen<sup>46</sup> software to generate starting structures for lipid bilayers, containing 138 lipid molecules (80 POPC, 10 POPE, and 48 Chol molecules) in a box full of water (4373 water molecules) with initial dimension of  $x = 5.9 \text{ nm}$ ,  $y = 5.9 \text{ nm}$ , and  $z = 8 \text{ nm}$ . We first energy minimized the system (steepest descent method, 10000 steps), then equilibrated for 20 ns in the isothermic-isobaric ensemble (NPT), with the temperature set to 298 K and the pressure (P) to 1 bar.

After equilibration, we generated five different systems differing by the concentration of quercetin, containing 0, 4, 8, 12, and 16 quercetin molecules. Quercetin molecules were inserted in the membrane in a symmetric fashion, with the same number of molecules in both leaflets. The initial orientation of quercetin was with the aromatic rings parallel to the membrane normal, and the phenyl group closer to the water region. Then, we minimized the energy and we equilibrated each system in the isothermal-isobaric (*NPT*) ensemble for 20 *ns*, with the temperature  $T = 298\text{ K}$  and  $P = 1\text{ bar}$ . Production runs were carried out for 900 *ns*. The last 800 *ns* were used for analysis.

We performed all molecular dynamics simulations using the GROMACS software (v. 2016.4)<sup>43</sup>. We used the force field by Berger for phospholipids<sup>47</sup>, compatible with OPLSAA (used for quercetin molecules and cholesterol).

The Lennard-Jones and Coulomb interactions were cut off at 1.2 nm ( $r_{cut}$ ), with the potentials shifted to zero at the cut off. The Lennard–Jones potential type is cut-off and it is shifted from  $r_{shift} = 1\text{ nm}$  to  $r_{cut}$ , while electrostatic interactions were calculated with the Particle-Mesh Ewald (*PME*) algorithm, and shifted from  $r_{shift} = 1\text{ nm}$  to  $r_{cut}$  with a relative dielectric constant for the medium  $\epsilon = 1$  for explicit screening. For electrostatic potential, Grid dimensions are controlled in gromacs by the Fourier spacing parameter of 0.12 and the interpolation order with pme-order.

In all simulations we used the leap-frog algorithm for the integration of the equation of motion, with an integration time step of 2 *fs* in conjunction with the *LINCS* algorithm<sup>48</sup> to constrain the covalent bonds involving hydrogen atoms. To maintain the temperature constant, we used the Bussi-Donadio-Parrinello algorithm (*v-rescale* in Gromacs<sup>49</sup>), with a time constant of 1 *ps* and a reference temperature of 298K. For pressure coupling, we used Berendsen<sup>50</sup> and Parinello-Rahman<sup>51</sup> method in equilibration and production run, respectively, with semi-isotropic coupling type, time constant of 10 *ps*, and a compressibility of  $4.5 \times 10^{-5}$ .

We estimated the area per lipid ( $A_l$ ) in the simulations from the total number of lipids per leaflet and from the area of the membrane projected in the *xy* plane (obtained from the box dimensions), over the last 800 *ns* of simulation, using the following equation:

$$A_l = \frac{2 \times L_x \times L_y}{n_{lipids}} \quad (\text{Equation 3})$$

$L_x$ ,  $L_y$  are respectively the  $x$  and  $y$  dimensions of the simulation box, and  $n_{lipids}$  represents the number of lipids in the system. The statistical uncertainty was calculated using the GROMACS tool “gmx analysis”.

We calculated the membrane thickness as the difference between the average position (along the bilayer normal, i.e., the  $z$  axis) of the phosphorous atoms in the lipids head groups. The latter was calculated using the GROMACS tool “gmx density”. The statistical uncertainty was estimated using block averaging by dividing the simulation into 10 equal blocks and computed the difference between the highest and lowest values.

We calculated the angular distribution defined by the bilayer normal ( $z$  – axis) and the normal vector of the plane defined by the atoms 6, 8 and 13 of quercetin molecule using the Gromacs tool “gmx gangle”.

We calculated the order parameter of C-D bonds in lipid bilayers using the GROMACS tool “gmx order”:

$$S_{CH} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle \quad (\text{Equation 4})$$

where  $\theta$  is the angle between the C–H bond vector and the bilayer normal, and angular brackets indicate ensemble and time averages.

The lateral diffusion coefficient,  $D$ , of POPC lipids was calculated from the long time mean square displacement (MSD) of the lipids versus time. GROMACS provides a module called “gmx msd” to measure the lateral diffusion coefficients by using Einstein relation. It is calculated by least squares fitting a straight line ( $Dt + c$ ), where  $t$  is time from the reference positions, and  $c$  is a fitting constant. We used the phosphorus atoms for the calculation of diffusion coefficients. The calculation was performed on the last 800 ns microseconds of the production run. We split the production run in two equal blocks; the difference between average values of  $D$  in each block were used to estimate the statistical uncertainties.

Isothermal compressibility modulus  $K_A$  was calculated from area fluctuations:

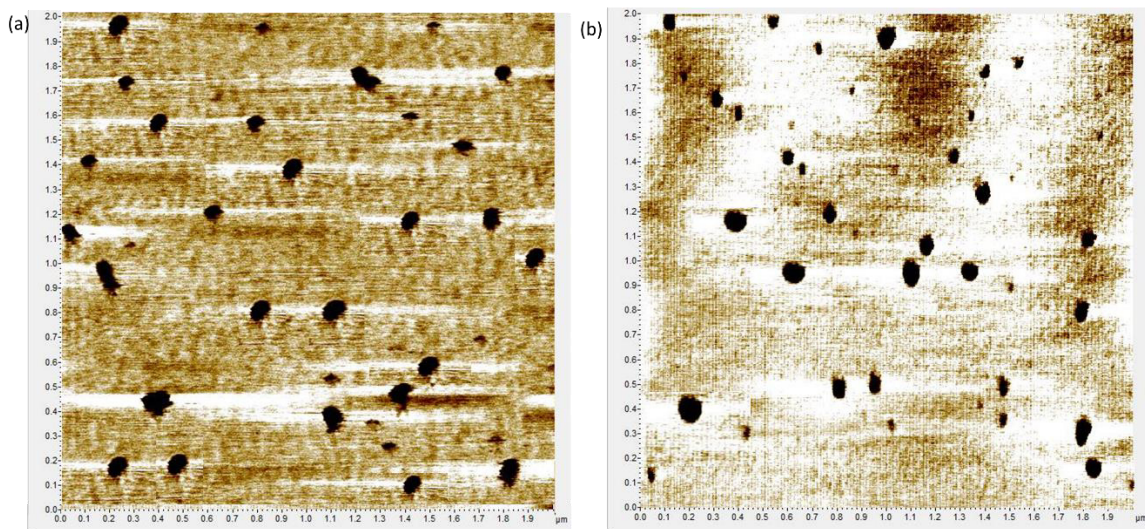
$$K_A = k_B T \frac{A_0}{(A - A_0)^2} \quad (\text{Equation 5})$$

where  $k_B$  is Boltzmann constant,  $T$  is the simulation temperature in Kelvin,  $A_0$  is the average in-plane area of the membrane and  $A$  is the instantaneous in-plane area. The values of  $K_A$  were calculated for all the simulated systems averaging over the last 800 ns. To estimate statistical uncertainties, we split the production run in two equal blocks; the difference between average values in each block were used as estimates of uncertainties.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. AFM imaging and measurements

Samples were prepared as detailed in Methods. We then used AFM in contact mode to visualize the adsorbed vesicles on the mica substrate. Figure 2 shows blank Lipoid E80 liposomes and Lipoid E80 liposomes loaded with quercetin, adsorbed on a clean mica sheets.

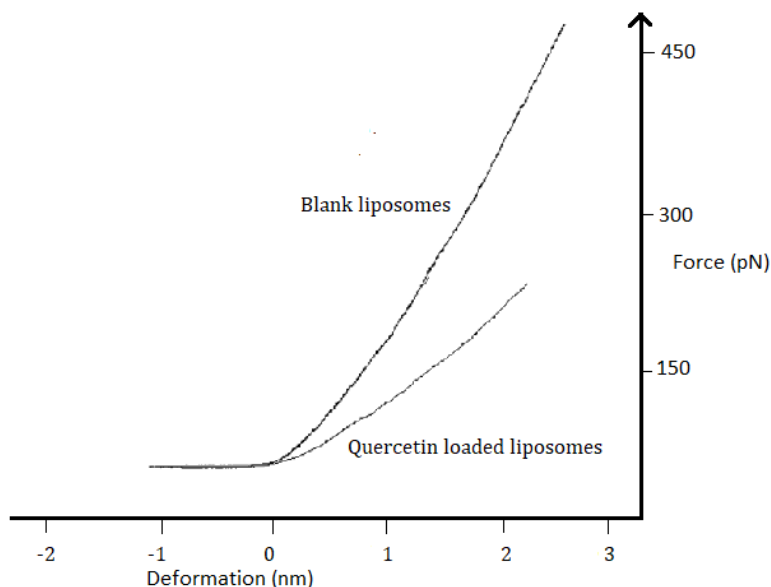


*Figure 2: AFM 2x2  $\mu\text{m}^2$  images of (a) blank Lipoid E80 liposomes and (b) quercetin-loaded Lipoid E80 liposomes, adsorbed on mica substrate*

It is obvious that the presence of quercetin did not affect the morphology and the structure of the liposomes. For both blank and quercetin-loaded liposomes, we found an heterogeneous

distribution of sizes, ranging from 50 to 200 nm, and the same mean height of  $22 \pm 3$  nm. Liposomes showed a mean size of  $98 \pm 15$  nm for blank liposomes and  $105 \pm 20$  nm for quercetin loaded liposomes. These distributions were confirmed by laser granulometry analysis (data not shown), and are in agreement with those obtained by Azzi et al. for Lipoid E80 liposomes containing cholesterol<sup>20</sup>.

We used AFM to reveal the effect of quercetin on the liposome rigidity. Adsorbed vesicles from both samples, were indented on a fix point on their upper surface, by a small force to avoid vesicles damage. As mentioned before, 200 liposomes from each sample were indented and force vs deformation curves were plotted. The Young modulus was determined, on each curve and for each vesicle, as the slope of the force vs deformation curves in the elastic region (from 0 to 2.2 nm on the Figure 3). We collected the data on the elastic behavior when the degree of deformation of liposomes was small, i.e., the maximum indentation was about 10% of the measured liposome height. In this region the force curves were fitted with respect to the modified Shell model.



*Figure 3: Force-deformation curves, in the elastic region, obtained for blank and quercetin loaded lipoid E80 liposomes, during the approach of the tip to the sample.*

As the example shows (Figure 3), steeper force-deformation curves were obtained for blank liposomes, indicating that quercetin softens lipid membranes. To quantify such finding, we analyzed force-deformation curves for 200 vesicles for each composition, and obtained a value of  $22 \pm 5 \text{ MPa}$  for the Young modulus of blank liposomes, and  $15 \pm 4 \text{ MPa}$  for quercetin-loaded liposomes. These correspond to bending moduli of  $38 \pm 7 k_B T$  and  $26 \pm 6 k_B T$  (obtained from equation 6). The bending modulus value of blank liposomes (lipid E80: Chol 100:74) is in reasonable agreement with previously reported value obtained by Takechi-Haraya et al. of EggPC liposomes containing cholesterol with molar ratio 50:50 ( $31.64 k_B T$ ) via AFM<sup>52</sup>. The variation between both rigidity values is around 16% and may be explained by the difference in cholesterol concentration (100:74 vs 50:50), the AFM probe characteristics (cantilever force constant  $0.08$  vs  $0.15 \text{ N/m}$ , and tip radius  $10$  vs  $20 \text{ nm}$ ), and the mathematical model (modified Shell vs Shell).

The reduction of both Young and bending modulus in the system containing quercetin may be due to the presence of quercetin, and also the difference in cholesterol concentration (42 vs 32% in blank and quercetin loaded liposomes, respectively). Notice that the initial concentration of cholesterol in both systems (blank and quercetin loaded liposomes) during the preparation of liposomes was the same ( $20 \text{ mg/ml}$  see paragraph 2.1), while the incorporation rate of cholesterol in liposomes, which is a random phenomenon, was different in the two systems<sup>20</sup>. To better understand the effect of quercetin on membrane rigidity, its penetration through the lipid E80 membrane and better interpret the AFM data, we used MD simulations.

### 3.2. MD simulations

We used MD simulations at the atomistic level to understand the effect of quercetin on the properties of ternary lipid mixtures consisting of POPC:POPE:Chol and different concentrations of quercetin (from 4 to 16 % molar fraction over phospholipids). In the simulations, we characterized the membrane elastic properties by calculating the area compressibility modulus ( $K_A$ ). This is linked to the other elastic moduli of bilayer membranes<sup>53</sup>, although not directly



comparable to the Young modulus measured experimentally by AFM. First, we calculate the value of  $K_A$  obtained in the absence of quercetin, and compared it with values reported in the literature for similar membranes (see Table 1).

*Table 1: Values of area compressibility modulus determined in literature and in the present work for membranes containing POPC and Chol.*

Bilayer	Molar ratio (lipid:Chol)	$K_A$ (mN/m)	Temperature (K)	Method	Reference
POPC:Chol	70:30	$562 \pm 87$	288	Box area fluctuation (CHARMM36)	[54]
		$757 \pm 87$	288	Local thickness fluctuations (LTF) (CHARMM36)	
POPC+POPE:Chol	70:30	$401 \pm 48$	310	Box area fluctuation (CHARMM36)	[55]
		$457 \pm 9$	310	Box area fluctuation (MARTINI v2.2)	
	65:35	$686 \pm 7$	298	Box area fluctuation (Berger lipids)	Present work
POPC:Chol	70:30	673	298	Micropipette aspiration	[56]

Our value of area compressibility modulus is in reasonable agreement with values previously obtained via simulations by Docktorova *et al.* for POPC:Chol (70:30) using both box area fluctuation methods and local thickness fluctuations (see Table 1), and those obtained by Evans *et al.* for the same composition using micropipette aspiration. Saedimazine *et al.* reported lower values, easily explained by the difference in temperatures (298K in our case vs 310 K by Saedimazine *et al.*). We then calculated the compressibility modulus in the presence of

increasing amounts of quercetin. We found that  $K_A$  decreases with increasing quercetin concentration, approximately in a linear fashion.

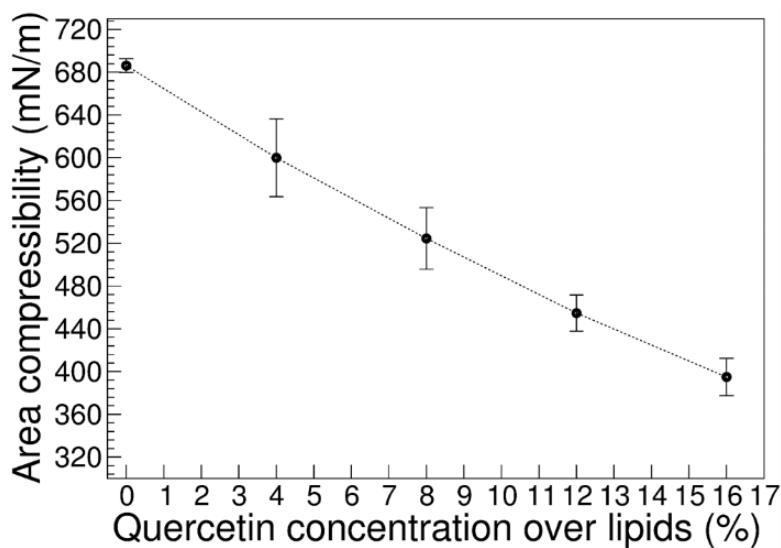
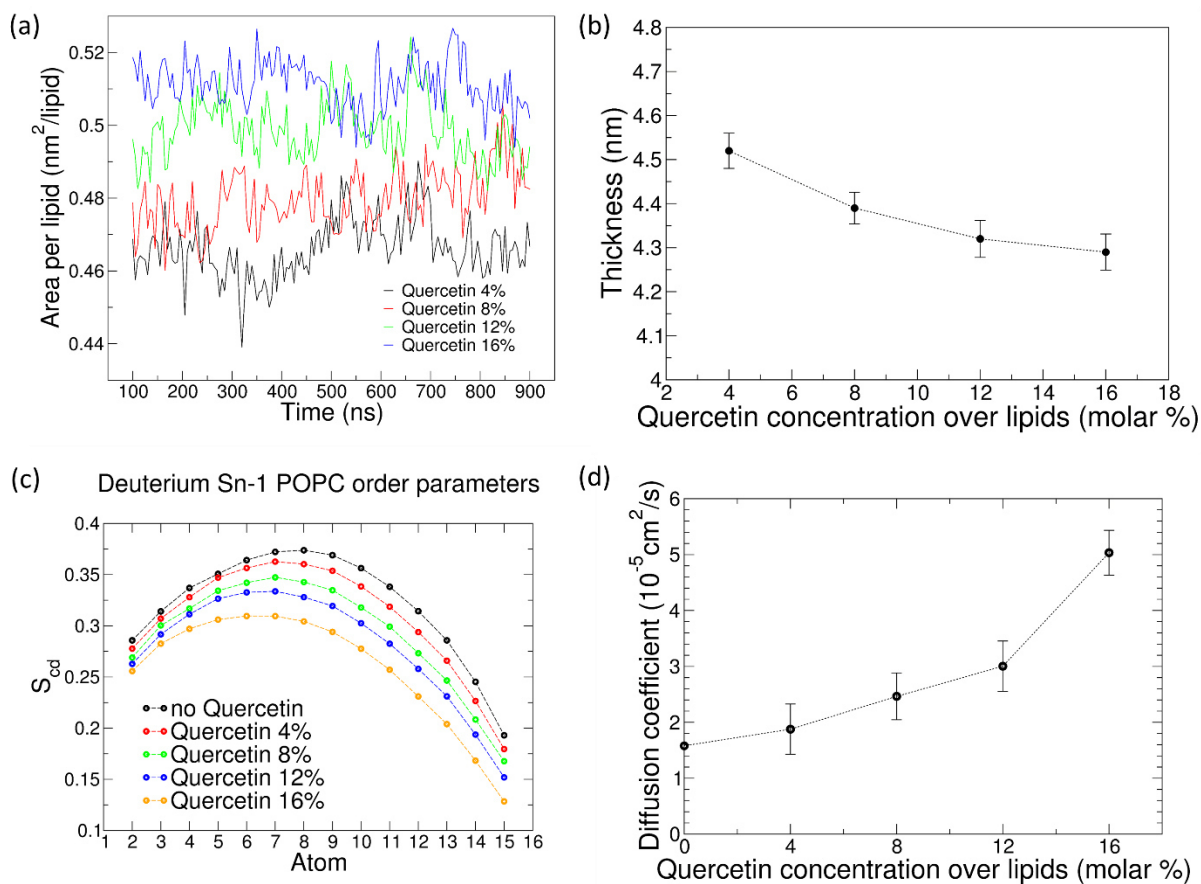


Figure 4. Area compressibility modulus of lipid membranes POPC+POPE:cholesterol:quercetin as a function of quercetin concentration (reported as molar fraction of quercetin over lipids).

The trend is in agreement with the experimental variation of Young modulus obtained by AFM (section 3.1), indicating that quercetin softens lipid bilayers. Such finding is relevant in the context of drug delivery. The precise effect of liposome rigidity on the drug delivery process is still debated, but data is available on different drug delivery vectors. For instance, in vitro experiments on SUM159 cancer cells showed that softer (TA/PVPON) spherical particles are internalized more efficiently than their more rigid counterparts<sup>57</sup>. Hartmann et al. also showed that softer (DextS/PLArg) and (PSS/PAH) colloidal particles were internalized and transported to lysosomes faster than more rigid particles in HeLa cells<sup>58</sup>. In the case of lipid vesicles, it is not clear whether their rigidity has an effect on internalization and intra-cellular transport. Sun et al. synthesized lipid-covered polymeric nanoparticles (NPs) and varied water content and rigidity but with the same chemical composition, size, and surface properties<sup>59</sup>. They show that nanoparticles with a rigid lipid shell enter cells more easily than flexible (“soft”) ones. The cellular uptake was

tested by incubating the vesicles with HELLA cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Also, using MD simulations the authors show that the “soft” NPs are deformed and thus energetically unfavorable for cellular uptake<sup>59</sup>. Yu et al. demonstrated, via both molecular-dynamics simulations and super resolution microscopy, that liposomes with moderate rigidity displayed enhanced diffusivity through mucus and thus achieved an oral insulin delivery efficacy superior to that of both their soft and hard counterparts<sup>60</sup>. Also, they show that liposomes with different transition temperatures ( $T_m$ ) gain different rigidities and further transform into various shapes, which results in different diffusion capacities.

In order to interpret the membrane softening effect in terms of molecular interactions, we analyzed how quercetin affects membrane structural and dynamic properties, namely thickness, area per lipid, deuterium order parameter of sn-1 acyl chain of POPC lipids, and POPC diffusion coefficients (Figure 5).



*Figure 5: Variation of structural parameters of lipid membranes. (a). area per lipid; (b) membrane thickness; (c) deuterium order parameter of sn-1 chain of POPC, and (d) Diffusion coefficient of POPC lipids.*

We found that the area per lipid increases with quercetin concentration. The estimate does not take into account the area taken by quercetin. On the other hand, the average value of bilayer thickness decreases with increasing quercetin concentration. This is consistent with a decrease in the order parameter for POPC acyl chains (Fig. 5c). Also, the diffusion coefficient of POPC lipids is increased in the presence of quercetin molecules, from  $1.58 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  in the absence of quercetin to  $5.03 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  in membranes containing 16% quercetin. The overall picture is very consistent: in the presence of quercetin, membranes get thinner and more disordered, hence softer; more space is available to each lipid, which increases their diffusion rates. Similar findings were obtained by Sanver et al. using X-ray scattering after encapsulating quercetin in DOPC membranes<sup>61</sup>: in their report it was shown that the presence of quercetin reduces bilayer thickness and increases bilayer undulations, leading to a membrane-fluidizing effect.

How can such softening effect be interpreted in terms of molecular interactions? We can use the same MD simulations to determine the interaction of quercetin with the lipids at the atomistic level. First, we verified by visual inspection that, even at the highest concentration, quercetin does not aggregate inside the bilayer. Then, we determined the position and orientation of quercetin in the membrane by calculating the symmetrized partial densities of quercetin molecules. We then calculated the distribution of the angle between the bilayer normal and the plane of the larger aromatic ring (Figure 6j), defined by atoms 6-8-13 (see Figure 1).

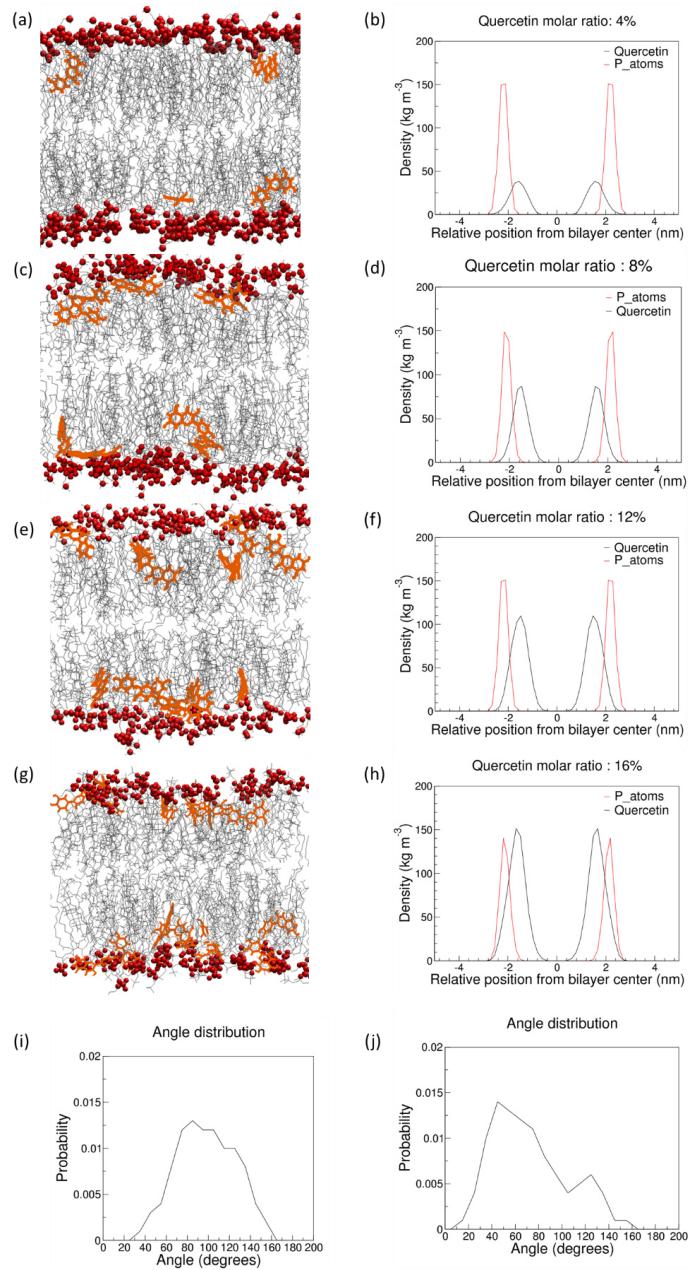


Figure 6. (a-h) Snapshots (left panels) and partial density profiles (right panels) of quercetin in membranes at different concentrations. The partial density of phosphorus atoms in lipid head groups is reported for reference. (i) Quercetin orientation in the membrane, quantified as angle distribution; the angle is defined by the bilayer normal (z-axis) and the normal to the larger aromatic ring (defined by atoms C6, C8 and C13 of quercetin). (j) Quercetin orientation in the membrane, quantified as the angle between the C13-C6 vector and the bilayer normal (z axis).

Partial density profiles indicate that quercetin is preferentially located below the lipid head group region, at the interface between the highly hydrated glycerol groups and the apolar acyl chains, at all concentrations. The preferred orientation of quercetin is with the aromatic rings in the plane containing the bilayer normal (Figure 6i). The vector defined by atoms C13 and C16 (see Figure 1), crossing the larger aromatic ring, is preferentially tilted with respect to the bilayer normal (Figure 6j). Fluctuations in the molecular orientation are broad, but overall the orientation of aromatic rings allows atoms O29 and O26 (hydroxyl groups in the phenyl ring) to be in the proximity of the water interface, as confirmed by the average numbers of hydrogens bonds with water molecules ( $3.4 \pm 1$  bonds per quercetin molecule on average, data not shown). The larger aromatic ring is embedded more deeply in the membrane compared to the smaller (phenyl) ring. Simulations also allow us to be more precise, and study the most favorable contacts within the membrane. For instance, atom C13 makes contact mostly with the first carbon atom of sn-1 chains ( $90 \pm 4$  % contact fraction, while the fraction of phospholipids in the system is only 65%), while contacts with the last carbon atom of acyl chains are infrequent ( $35 \pm 20$  %); this is consistent with partial density profiles (Figure 6) and also suggests that quercetin is more often in contact with phospholipids than it is with cholesterol. Overall, the localization of quercetin agrees well with previous data obtained by electron paramagnetic resonance (EPR) measurements on DPPC (1,2-dipalmitoyl-snglycero- 3-phosphocholine) liposomes, and is consistent with fluorescence spectroscopy data on human skin fibroblast cells<sup>19</sup>. It is also compatible with MD simulations by Kosinova et al.<sup>33</sup> and by Sanver et al.<sup>57</sup>, showing that quercetin localizes below the polar region of the membrane. We notice that the orientation of the aromatic rings reported by previous simulations is almost parallel to the membrane surface. This is different from our findings. However, the lipid composition used in previous studies is different (DOPC, while we used a POPC+POPE+CHOL mixture), and differences in the force fields can also contribute to differences in orientation; in particular, we notice that the partial charges for all oxygen atoms are higher in both Kosineva et al. and Sanver et al., which makes it more favorable for the molecule to be in contact with water (hence the preferential localization on the membrane surface).

To better understand how quercetin localization affects lipid-lipid interactions, we calculated the 2D radial distribution function  $g(r)$  for the center of mass (COM) of lipid molecules, and for the COM of lipid acyl chains (Figure 7). It is apparent that, with increasing quercetin concentrations, larger distances between the lipid molecules are more frequently sampled; in other words, lipid molecules are more frequently found farther apart from one another. This is due to the presence of the flavonoid, intercalating among lipid acyl chains. Looser packing of acyl chains is also demonstrated by lower order parameters, as reported above, and by lower lipid-lipid interaction energies (Figure 7c), and is the molecular explanation for membrane softening by quercetin.

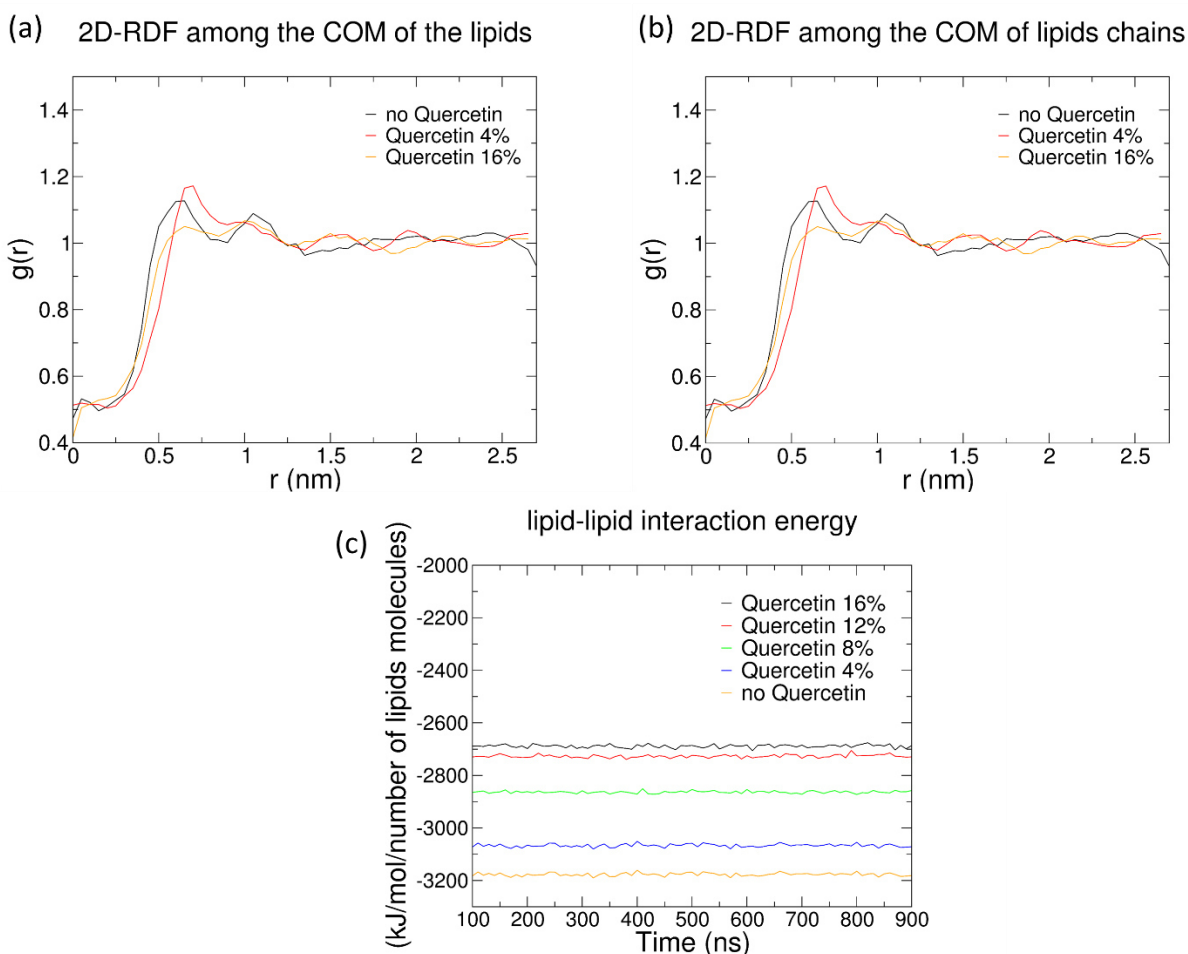


Figure 7: Variation of 2D-RDF in terms of Quercetin concentration of (a) COM of lipid molecules, and (b) COM of lipids tails. Only three compositions are reported, for the sake of clarity. (c) Lipid-lipid interaction energy in simulations with different concentration of quercetin.

Previous studies have reported effects of flavonoids on membrane properties. For example, Ingólfsson et al. examined the membrane localization and bilayer-modifying effects of five phenolic phytochemicals—capsaicin, curcumin, epigallocatechin gallate, genistein, and resveratrol. The authors used MD simulations using both Martini and all atom force fields and found that phytochemicals localize into the bilayer/solution interface of POPC membrane (lipid headgroup and backbone region). The authors demonstrated that these molecules have modest effects on the bulk bilayer properties (increases in the average area per lipid or decreases in bilayer thickness) with little effect on average lipid order or bilayer compressibility, and they produced significant changes in the bilayer pressure profile which vary among the compounds. Huh et al. showed that Tannic acids, naturally occurring polyphenolic compounds, have also been found to weaken bilayer integrity through their increase in membrane area using both experimental techniques, X-Ray diffraction and NMR<sup>62</sup>. Tamba et al. demonstrated that Tea catechins, which are flavonoids, disrupt bilayers, rupture lipid vesicles, and induce cell lysis, using both phase-contrast fluorescence microscopy and the single GUV method<sup>63</sup>. Sanver et al. studied the effect of quercetin and rutin on DOPC membrane structural parameters using both X-ray diffraction and MD simulations<sup>61</sup>. They showed that both molecules, inserted and partitioned in lipid bilayer at different locations, increased the lattice spacing, reduced bilayer thickness, and increased bilayer undulations. The influence of rutin was not as strong as for quercetin due to the different location of both molecules in the membrane; quercetin is located more deeply in the membrane. Gharib et al. studied the interaction of a series of Monoterpenes including eucalyptol, pulegone,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -terpineol,  $\gamma$ -terpineol,  $\delta$ -terpineol and Thymol with DPPC lipid membranes using Differential scanning calorimetry, Raman spectroscopy and fluorescence anisotropy<sup>64</sup>. They showed that Monoterpenes abolished the pre-transition of DPPC membrane and modified the intensity of the Raman peak, proving their interaction with the choline head group of phospholipids. The molecules decreased also the main transition temperature suggesting their interaction with the alkyl chains of DPPC membrane. Their results of fluorescence anisotropy showed that Monoterpenes fluidized the liposomal membrane at 25, 41, and 50 °C. Kaddah et al., investigated the impact of a series of glucocorticoids molecules with



different concentrations on the membrane fluidity of DPPC liposomes using Electron paramagnetic resonance spectroscopy measurement<sup>65</sup>. They showed that the molecules concentration is a key parameter that affect the membrane fluidity of DPPC liposomes.

The relevance of our findings is twofold. First of all, softening of model membranes by quercetin indicates that probably a similar effect would be observed also in cell membranes. A recent study showed that membrane elasticity correlates with lipid ordering and viscosity in cells<sup>66</sup> – in agreement with our observations in model systems. Second, membrane softening and membrane thinning can have important effects on the activity of membrane proteins, as reported in a number of studies [for reviews, see 67–69]. For a protein in which the hydrophobic length of the active state is longer than that of the inactive state, the protein activity will increase when the average bilayer thickness increases (within a given range), and vice versa. Also, softening the bilayer (decreasing bilayer elasticity) will shift the conformational equilibrium toward the state with more hydrophobic mismatch. Hence, bilayer softening could increase or decrease protein activity depending on the specific protein–bilayer match. Moreover, lipid chainlength is often found to modulate the function of integral transmembrane proteins. In numerous cases, the enzyme or transport activity reaches a maximum at a particular lipid chainlength and is reduced in membranes with either shorter or longer lipid chains. Optimum activity is attained when the hydrophobic thickness of the lipid membrane matches the transmembrane hydrophobic span of the protein.

## **4. Conclusions**

In this work, we investigated the effect of quercetin on the bending rigidity of lipid membranes using AFM measures and MD simulations. AFM data show that the average values of Young modulus decrease in the presence of quercetin, but the decrease is comparable to the statistical uncertainty of the AFM measures. Atomistic MD simulations confirm that quercetin softens the bilayer membrane, and also indicate that it decreases membrane thickness and increases disorder of acyl chains. Consistent with such changes in structural properties, diffusion coefficients are also increased. Changes in structural and dynamic properties can be interpreted

in the light of quercetin localization and orientation in the membrane: due to its amphipathic nature, quercetin is located preferentially at the interface between the hydrophobic core and polar head groups of the lipids, roughly parallel to the membrane normal; in such position and orientation, quercetin increases the average distance among phospholipids, reducing their mutual attraction and therefore softening the membrane.

### Acknowledgement

LM acknowledges funding from the *Institut National de la Sante et de la Recherche Medical* (INSERM). Calculations were performed in part at the French supercomputing center CINES (Grant A0060710138). JE acknowledges funding from the *Association de coopération, développement et santé of Lebanon*.

## 5. References

- (1) Lakhnampal, P.; Rai, D. K. Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL* **2007**, *2* (2). <https://doi.org/10.4314/ijmu.v2i2.39851>.
- (2) Jan, A. T.; Kamli, M. R.; Murtaza, I.; Singh, J. B.; Ali, A.; Haq, Q. M. R. Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits—An Overview. *Food Reviews International* **2010**, *26* (3), 302–317. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.484285>.
- (3) Boots, A. W.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A. Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* **2008**, *585* (2), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>.
- (4) Coelho-Dos-Reis, J. G. A.; Gomes, O. A.; Bortolini, D. E.; Martins, M. L.; Almeida, M. R.; Martins, C. S.; Carvalho, L. D.; Souza, J. G.; Vilela, J. M. C.; Andrade, M. S.; Barbosa-Stancioli, E. F. Evaluation of the Effects of Quercetin and Kaempherol on the Surface of MT-2 Cells Visualized by Atomic Force Microscopy. *J. Virol. Methods* **2011**, *174* (1–2), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.019>.
- (5) Zandi, K.; Teoh, B.-T.; Sam, S.-S.; Wong, P.-F.; Mustafa, M. R.; Abubakar, S. Antiviral Activity of Four Types of Bioflavonoid against Dengue Virus Type-2. *Virol. J.* **2011**, *8*, 560. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-560>.
- (6) Dajas, F. Life or Death: Neuroprotective and Anticancer Effects of Quercetin. *J Ethnopharmacol* **2012**, *143* (2), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.005>.
- (7) Gibellini, L.; Pinti, M.; Nasi, M.; Montagna, J. P.; De Biasi, S.; Roat, E.; Bertocelli, L.; Cooper, E. L.; Cossarizza, A. Quercetin and Cancer Chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**, *2011*, 591356. <https://doi.org/10.1093/ecam/neq053>.
- (8) S, A.; MI, T.; R, B.; L, M.; N, P.; C, B.; Fj, G. Quercetin Dietary Supplementation of Fattening Lambs at 0.2% Rate Reduces Discolouration and Microbial Growth in Meat during Refrigerated Storage. *Meat Sci* **2012**, *93* (2), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.08.023>.

- (9) Wu, D.; Kong, Y.; Han, C.; Chen, J.; Hu, L.; Jiang, H.; Shen, X. D-Alanine:D-Alanine Ligase as a New Target for the Flavonoids Quercetin and Apigenin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *32* (5), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.06.010>.
- (10) Lin, C.-F.; Leu, Y.-L.; Al-Suwayeh, S. A.; Ku, M.-C.; Hwang, T.-L.; Fang, J.-Y. Anti-Inflammatory Activity and Percutaneous Absorption of Quercetin and Its Polymethoxylated Compound and Glycosides: The Relationships to Chemical Structures. *Eur J Pharm Sci* **2012**, *47* (5), 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.024>.
- (11) De Souza, K. C. B.; Bassani, V. L.; Schapoval, E. E. S. Influence of Excipients and Technological Process on Anti-Inflammatory Activity of Quercetin and Achyrocline Satureioides (Lam.) D.C. Extracts by Oral Route. *Phytomedicine* **2007**, *14* (2–3), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.10.007>.
- (12) Nabavi, S. F.; Russo, G. L.; Daglia, M.; Nabavi, S. M. Role of Quercetin as an Alternative for Obesity Treatment: You Are What You Eat! *Food Chem* **2015**, *179*, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.006>.
- (13) Aditya, N. P.; Macedo, A. S.; Doktorovová, S.; Souto, E. B.; Kim, S.; Chang, P.-S.; Ko, S. Development and Evaluation of Lipid Nanocarriers for Quercetin Delivery: A Comparative Study of Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Nanostructured Lipid Carriers (NLC), and Lipid Nanoemulsions (LNE); 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.058>.
- (14) Cai, X.; Fang, Z.; Dou, J.; Yu, A.; Zhai, G. Bioavailability of Quercetin: Problems and Promises. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (20), 2572–2582. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990120>.
- (15) Aditya, N. P.; Macedo, A. S.; Doktorovová, S.; Souto, E. B.; Kim, S.; Chang, P.-S.; Ko, S. Development and Evaluation of Lipid Nanocarriers for Quercetin Delivery: A Comparative Study of Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Nanostructured Lipid Carriers (NLC), and Lipid Nanoemulsions (LNE). **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.058>.
- (16) Tamjidi, F.; Shahedi, M.; Varshosaz, J.; Nasirpour, A. Nanostructured Lipid Carriers (NLC): A Potential Delivery System for Bioactive Food Molecules. **2013**.
- (17) Hao, J.; Guo, B.; Yu, S.; Zhang, W.; Zhang, D.; Wang, J.; Wang, Y. Encapsulation of the Flavonoid Quercetin with Chitosan-Coated Nano-Liposomes. *LWT - Food Science and Technology* **2017**, *85*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.048>.
- (18) Toniazzi, T.; Peres, M. S.; Ramos, A. P.; Pinho, S. C. Encapsulation of Quercetin in Liposomes by Ethanol Injection and Physicochemical Characterization of Dispersions and Lyophilized Vesicles. *Food Bioscience* **2017**, *19*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.003>.
- (19) Bozena, P.-P.; Wi, G.; Lucjan, M.; Roman, P.; Tomasz, P.; Barbara, Z.; Jaroskaw, P.; Antoni, G. Modification of Membranes by Quercetin, a Naturally Occurring Flavonoid, via Its Incorporation in the Polar Head Group. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768* (9), 2195–2204. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.027>.
- (20) Azzi, J.; Jraij, A.; Auezova, L.; Fourmentin, S.; Greige-Gerges, H. Novel Findings for Quercetin Encapsulation and Preservation with Cyclodextrins, Liposomes, and Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposomes. *Food Hydrocolloids* **2018**, *81*, 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.006>.
- (21) Briuglia, M.-L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D. A. Influence of Cholesterol on Liposome Stability and on in Vitro Drug Release. *Drug Deliv Transl Res* **2015**, *5* (3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>.
- (22) Takechi-Haraya, Y.; Sakai-Kato, K.; Goda, Y. Membrane Rigidity Determined by Atomic Force Microscopy Is a Parameter of the Permeability of Liposomal Membranes to the Hydrophilic Compound Calcein. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (5), 1887–1893. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0624-x>.

- (23) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Impact of Particle Elasticity on Particle-Based Drug Delivery Systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, *108*, 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.007>.
- (24) Kloxin, A. M.; Benton, J. A.; Anseth, K. S. In Situ Elasticity Modulation with Dynamic Substrates to Direct Cell Phenotype. *Biomaterials* **2010**, *31* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.025>.
- (25) Frenzel, M.; Steffen-Heins, A. Impact of Quercetin and Fish Oil Encapsulation on Bilayer Membrane and Oxidation Stability of Liposomes. *Food Chemistry* **2015**, *185*, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.121>.
- (26) Huang, M.; Su, E.; Zheng, F.; Tan, C. Encapsulation of Flavonoids in Liposomal Delivery Systems: The Case of Quercetin, Kaempferol and Luteolin. *Food Funct.* **2017**, *8* (9), 3198–3208. <https://doi.org/10.1039/C7FO00508C>.
- (27) Phachonpai, W.; Wattanathorn, J.; Muchimapura, S.; Tong-Un, T.; Preechagoon, D. Neuroprotective Effect of Quercetin Encapsulated Liposomes: A Novel Therapeutic Strategy against Alzheimer's Disease. *American Journal of Applied Sciences* **2010**, *7* (4), 480–485.
- (28) Storrs, R. W.; Tropper, F. D.; Li, H. Y.; Song, C. K.; Kuniyoshi, J. K.; Sipkins, D. A.; Li, K. C. P.; Bednarski, M. D. Paramagnetic Polymerized Liposomes: Synthesis, Characterization, and Applications for Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (28), 7301–7306. <https://doi.org/10.1021/ja00133a001>.
- (29) Liang, X.; Mao, G.; Simon Ng, K. Y. Probing Small Unilamellar EggPC Vesicles on Mica Surface by Atomic Force Microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2004**, *34* (1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.017>.
- (30) Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.langmuir.7b00363> (accessed Oct 2, 2019). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00363>.
- (31) Eid, J.; Greige-Gerges, H.; Monticelli, L.; Jrajaj, A. Elastic Moduli of Lipid Membranes: Reproducibility of AFM Measures. *Chemical and Physics of lipids*.
- (32) Sinha, R.; Gadhwal, M. K.; Joshi, U. J.; Srivastava, S.; Govil, G. Interaction of Quercetin with DPPC Model Membrane : Molecular Dynamic Simulation, DSC and Multinuclear NMR Studies. *J. Indian Chem. Soc.* **2011**, *88*, 9.
- (33) Košinová, P.; Berka, K.; Wykes, M.; Otyepka, M.; Trouillas, P. Positioning of Antioxidant Quercetin and Its Metabolites in Lipid Bilayer Membranes: Implication for Their Lipid-Peroxidation Inhibition. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (4), 1309–1318. <https://doi.org/10.1021/jp208731g>.
- (34) Granada-Flor, A. de; Sousa, C.; Filipe, H. A. L.; Santos, M. S. C. S.; Almeida, R. F. M. de. Quercetin Dual Interaction at the Membrane Level. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (12), 1750–1753. <https://doi.org/10.1039/C8CC09656B>.
- (35) Doktorova, M.; LeVine, M. V.; Khelashvili, G.; Weinstein, H. A New Computational Method for Membrane Compressibility: Bilayer Mechanical Thickness Revisited. *Biophysical Journal* **2019**, *116* (3), 487–502. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.12.016>.
- (36) Reissner, E. Stresses and Small Displacements of Shallow Spherical Shells. II. *Journal of Mathematics and Physics* **1946**, *25* (1–4), 279–300. <https://doi.org/10.1002/sapm1946251279>.
- (37) Berry, J. D.; Mettu, S.; Dagastine, R. R. Precise Measurements of Capsule Mechanical Properties Using Indentation. *Soft Matter* **2017**, *13* (10), 1943–1947. <https://doi.org/10.1039/C6SM02841A>.
- (38) Evans, E. A. Bending Resistance and Chemically Induced Moments in Membrane Bilayers. *Biophys J* **1974**, *14* (12), 923–931.
- (39) Dodda, L. S.; Cabeza de Vaca, I.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. LigParGen Web Server: An Automatic OPLS-AA Parameter Generator for Organic Ligands. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (W1), W331–W336. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx312>.

- (40) Dodda, L. S.; Vilseck, J. Z.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. 1.14\*CM1A-LBCC: Localized Bond-Charge Corrected CM1A Charges for Condensed-Phase Simulations. *J Phys Chem B* **2017**, *121* (15), 3864–3870. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.7b00272>.
- (41) Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. Potential Energy Functions for Atomic-Level Simulations of Water and Organic and Biomolecular Systems. *PNAS* **2005**, *102* (19), 6665–6670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408037102>.
- (42) Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (28), 6474–6487. <https://doi.org/10.1021/jp003919d>.
- (43) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- (44) Lemańska, K.; Woude, H. van der; Szymusiak, H.; Boersma, M. G.; Gliszczyńska-Świątło, A.; Rietjens, I. M. C. M.; Tyrakowska, B. The Effect of Catechol O-Methylation on Radical Scavenging Characteristics of Quercetin and Luteolin—A Mechanistic Insight. *Free Radical Research* **2004**, *38* (6), 639–647. <https://doi.org/10.1080/10715760410001694062>.
- (45) Glättli, A.; Daura, X.; Gunsteren, W. F. V. A Novel Approach for Designing Simple Point Charge Models for Liquid Water with Three Interaction Sites. *Journal of Computational Chemistry* **2003**, *24* (9), 1087–1096. <https://doi.org/10.1002/jcc.10235>.
- (46) Knight, C. J.; Hub, J. S. MemGen: A General Web Server for the Setup of Lipid Membrane Simulation Systems. *Bioinformatics* **2015**, *31* (17), 2897–2899. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv292>.
- (47) Tieleman, D. P.; Maccallum, J. L.; Ash, W. L.; Kandt, C.; Xu, Z.; Monticelli, L. Membrane Protein Simulations with a United-Atom Lipid and All-Atom Protein Model: Lipid-Protein Interactions, Side Chain Transfer Free Energies and Model Proteins. *J Phys Condens Matter* **2006**, *18* (28), S1221–1234. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/28/S07>.
- (48) Hess, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4* (1), 116–122. <https://doi.org/10.1021/ct700200b>.
- (49) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52* (12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- (50) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81* (8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.
- (51) Parrinello, M.; Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52* (12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- (52) Takechi-Haraya, Y.; Sakai-Kato, K.; Abe, Y.; Kawanishi, T.; Okuda, H.; Goda, Y. Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. *Langmuir* **2016**, *32* (24), 6074–6082. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741>.
- (53) Eid, J.; Razmazma, H.; Jraj, A.; Ebrahimi, A.; Monticelli, L. On Calculating the Bending Modulus of Lipid Bilayer Membranes from Buckling Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124* (29), 6299–6311. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.0c04253>.
- (54) Doktorova, M.; LeVine, M. V.; Khelashvili, G.; Weinstein, H. A New Computational Method for Membrane Compressibility: Bilayer Mechanical Thickness Revisited. *Biophys J* **2019**, *116* (3), 487–502. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.12.016>.
- (55) Saeedimazine, M.; Montanino, A.; Kleiven, S.; Villa, A. Role of Lipid Composition on the Structural and Mechanical Features of Axonal Membranes: A Molecular Simulation Study. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 8000. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44318-9>.

- (56) Evans, E.; Rawicz, W.; Smith, B. A. Back to the Future: Mechanics and Thermodynamics of Lipid Biomembranes. *Faraday Discuss.* **2013**, *161*, 591–611. <https://doi.org/10.1039/c2fd20127e>.
- (57) Alexander, J. F.; Kozlovskaya, V.; Chen, J.; Kuncewicz, T.; Kharlampieva, E.; Godin, B. Cubical Shape Enhances the Interaction of Layer-by-Layer Polymeric Particles with Breast Cancer Cells. *Adv Healthc Mater* **2015**, *4* (17), 2657–2666. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500537>.
- (58) Hartmann, R.; Weidenbach, M.; Neubauer, M.; Fery, A.; Parak, W. J. Stiffness-Dependent In Vitro Uptake and Lysosomal Acidification of Colloidal Particles. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (4), 1365–1368. <https://doi.org/10.1002/anie.201409693>.
- (59) Sun, J.; Zhang, L.; Wang, J.; Feng, Q.; Liu, D.; Yin, Q.; Xu, D.; Wei, Y.; Ding, B.; Shi, X.; Jiang, X. Tunable Rigidity of (Polymeric Core)–(Lipid Shell) Nanoparticles for Regulated Cellular Uptake. *Advanced Materials* **2015**, *27* (8), 1402–1407. <https://doi.org/10.1002/adma.201404788>.
- (60) Yu, M.; Song, W.; Tian, F.; Dai, Z.; Zhu, Q.; Ahmad, E.; Guo, S.; Zhu, C.; Zhong, H.; Yuan, Y.; Zhang, T.; Yi, X.; Shi, X.; Gan, Y.; Gao, H. Temperature- and Rigidity-Mediated Rapid Transport of Lipid Nanovesicles in Hydrogels. *PNAS* **2019**, *116* (12), 5362–5369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818924116>.
- (61) Sanver, D.; Sadeghpour, A.; Rappolt, M.; Di Meo, F.; Trouillas, P. Structure and Dynamics of Dioleoyl-Phosphatidylcholine Bilayers under the Influence of Quercetin and Rutin. *Langmuir* **2020**, *36* (40), 11776–11786. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01484>.
- (62) Huh, N. W.; Porter, N. A.; McIntosh, T. J.; Simon, S. A. The Interaction of Polyphenols with Bilayers: Conditions for Increasing Bilayer Adhesion. *Biophysical Journal* **1996**, *71* (6), 3261–3277. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79519-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79519-X).
- (63) Tamba, Y.; Ohba, S.; Kubota, M.; Yoshioka, H.; Yamazaki, M. Single GUV Method Reveals Interaction of Tea Catechin (–)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Membranes. *Biophys J* **2007**, *92* (9), 3178–3194. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.097105>.
- (64) Gharib, R.; Auezova, L.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Effect of a Series of Essential Oil Molecules on DPPC Membrane Fluidity: A Biophysical Study. *J IRAN CHEM SOC* **2018**, *15* (1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s13738-017-1210-1>.
- (65) Kaddah, S.; Khreich, N.; Kaddah, F.; Khrouz, L.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Corticoids Modulate Liposome Membrane Fluidity and Permeability Depending on Membrane Composition and Experimental Protocol Design. *Biochimie* **2018**, *153*, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.011>.
- (66) Steinkühler, J.; Sezgin, E.; Urbančič, I.; Eggeling, C.; Dimova, R. Mechanical Properties of Plasma Membrane Vesicles Correlate with Lipid Order, Viscosity and Cell Density. *Communications Biology* **2019**, *2* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0583-3>.
- (67) McIntosh, T. J.; Simon, S. A. Roles of Bilayer Material Properties in Function and Distribution of Membrane Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35* (1), 177–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.102022>.
- (68) Marsh, D. Protein Modulation of Lipids, and Vice-Versa, in Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778* (7), 1545–1575. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.01.015>.
- (69) Andersen, O. S.; Koeppe, R. E. Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2007**, *36*, 107–130. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132643>.

Supporting Information

**Atoms charge of Quercetin molecule**

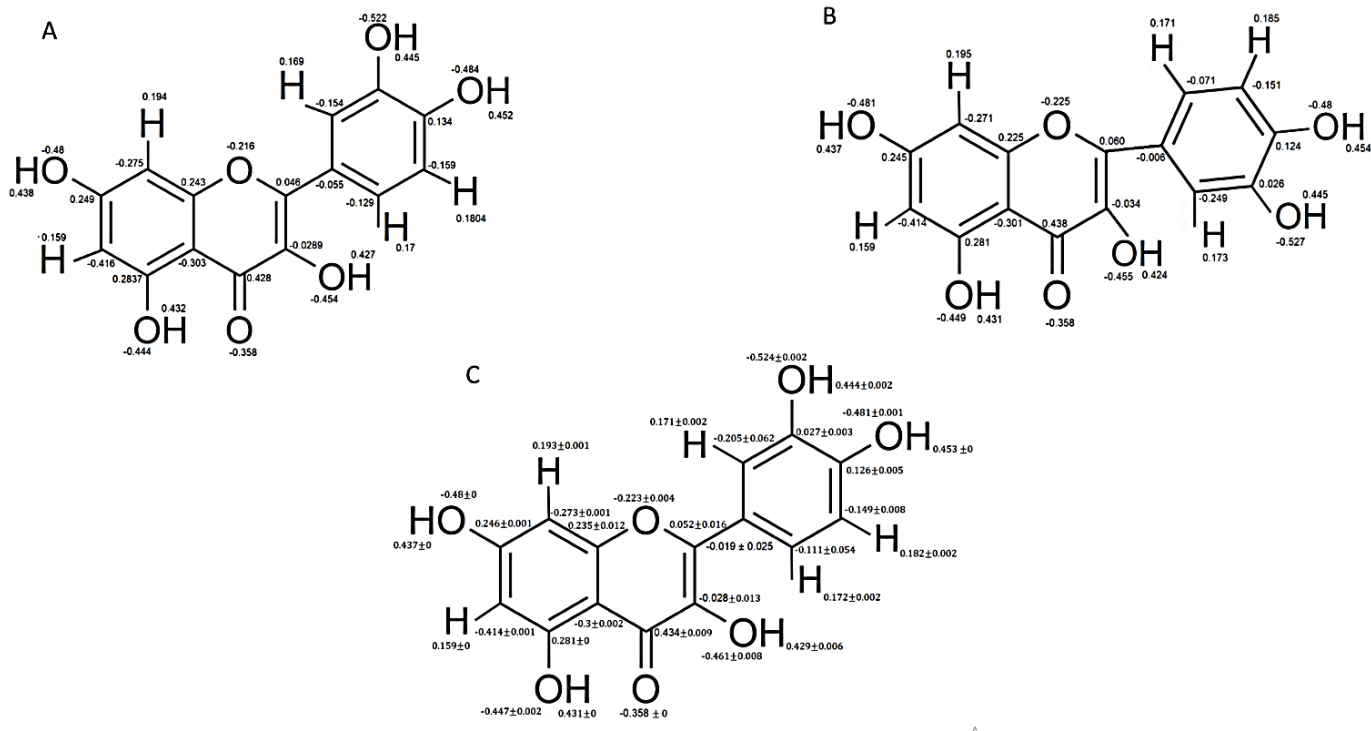


Figure S1: Atoms charges of quercetin molecule in A- configuration 1 B- configuration 2, and C- mean values of the two configurations.

# Chapitre 6 : Comportement des liposomes et organisation des phospholipides E80 dans des solvants eutectiques profonds à base de chlorure de choline, par AFM

Dans le chapitre 6, nous soulignons l'importance des solvants eutectiques profonds (DES), en particulier ceux à base de chlorure de choline, chlorure de choline:urée, chlorure de choline:glycérol, chlorure de choline:éthylène glycol, et chlorure de choline:acide lévulinique. Nous focalisons notre étude sur l'auto-assemblage des phospholipides E80 dans ces solvants, ainsi que sur la reformation stable, au cours du temps, des liposomes E80 en présence de ces solvants.

Les observations AFM montrent que des vésicules lipidiques se sont formées 24 heures après la dissolution des phospholipides E80 dans les quatre DESs étudiés et que le diamètre moyen des vésicules formées, dépend du coefficient de partage logP (qui détermine le degré de l'hydrophobicité) du composant donneur de liaisons hydrogène (HBD). Plus le HBD est hydrophobe plus le diamètre des vésicules est grand.

Le comportement des liposomes E80, a été repéré dans une imagerie AFM, une première fois après exposition directe aux quatre DESs, une deuxième fois après incubation prolongée des liposomes E80 dans les quatre DESs ou dans quatre solutions aqueuses préparées chacune des composants de chaque DES.

Dans les deux cas, la taille des liposomes observés dans les images AFM a été réduite. Cependant, lorsqu'ils ont été incubés dans les solutions aqueuses des composants DES, les liposomes ont été convertis en bicouches lipidiques adsorbées au mica (SLB) après deux heures avant leur reconstitution en vésicules plus petites après 24h. Les résultats montrent que les DESs sont des solvants prometteurs pour l'organisation des phospholipides, aussi pour la stabilité des



liposomes, compte tenu de leur pouvoir dissolvant des principes actifs qui peuvent être véhiculé par des liposomes stables.

# First investigation of liposomes behavior and phospholipids organization in choline chloride-based deep eutectic solvents by atomic force microscopy

Jad Eid<sup>a,b</sup>, Tracy El Achkar<sup>a,c</sup>, Sophie Fourmentin<sup>c</sup>, Hélène Greige-Gerges<sup>a</sup>, Alia Jraij<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Bioactive Molecules Research Laboratory, Faculty of Sciences, Lebanese University, Lebanon*

<sup>b</sup>*Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB), University of Lyon, CNRS UMR 5086, Lyon, France*

<sup>c</sup>*Unit e de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR Condorcet FR CNRS 3417, ULCO, F-59140 Dunkerque, France*

\*Corresponding author: [ajraij@ul.edu.lb](mailto:ajraij@ul.edu.lb)

Department of Physics, Faculty of Sciences, Lebanese University, P.O.Box: 14-6573, Hadath, Lebanon

## Abstract

Deep eutectic solvents (DES) have gained a lot of attention over the past years due to their numerous interesting properties. Despite being massively explored in various domains, there is still a need to understand the phospholipid self-assembly in these rising solvents. The present work aims to examine the phospholipids organization in four choline chloride-based DES (ChCl-DES) via atomic force microscopy (AFM). The effect of choline chloride:urea, choline chloride:glycerol, choline chloride:ethylene glycol, choline chloride:levulinic acid and the aqueous solutions of their individual components on E80 preformed liposomes was appraised for the first time. Lipid vesicles were formed 24h after dissolving E80 phospholipids in the studied DES and their mean diameter was dependent on the partition coefficient  $\log P$  of the hydrogen bond donor (HBD) component. When it comes to the effect on preformed liposomes, the size of the adsorbed liposomes was reduced after exposure to DES or to the aqueous solutions of their constituents. Similar results were observed when studying the dimensions of preformed liposomes in the aqueous solutions of DES components over time. However, when incubated in DES, liposomes were converted into supported lipid bilayers (SLB) before their reconstitution into vesicles.

**Keywords:** atomic force microscopy, deep eutectic solvents, liposomes, phospholipids.

## List of abbreviations

AFM: atomic force microscopy; ChCl:EG: choline chloride:ethylene glycol; ChCl:G: choline chloride:glycerol; ChCl:Lev: choline chloride:levulinic acid; ChCl:U: choline chloride:urea; ChCl-DES: choline chloride-based deep eutectic solvents; D: mean diameter; DES: deep eutectic solvents; DMPC: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; H: mean height; HBA: hydrogen bond acceptor; HBD: hydrogen bond donor; PC: phosphatidylcholine; PNP-TR: pyrex-nitride probes triangular cantilevers; POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; SLB: supported lipid bilayers; T<sub>m</sub>: melting temperature.

## 1. Introduction

Adopted as alternatives to conventional organic solvents and ionic liquids, DES attracted the researchers' attention for being sustainable, tunable and easy to prepare from widely available and cheap starting materials. DES are obtained by simply combining two or three components that are able to self-associate via hydrogen bonds, resulting in a liquid mixture [1]. After being introduced in 2003 by Abbott and coworkers [2], the physicochemical properties and the potential applications of these systems were extensively explored in various domains [1,3]. Most of the DES are prepared using a quaternary ammonium salt and hydrogen bond donors (HBD) like sugars, amino acids and alcohols. The majority of the studies consider choline chloride-based DES (ChCl-DES). In fact, choline chloride is not only cheap but also non-toxic and biodegradable, as it is approved as a nutritional additive in all species, for being an effective source of choline [4]. Choline chloride:urea (ChCl:U), choline chloride:glycerol (ChCl:G), choline chloride:ethylene glycol (ChCl:EG) are the most studied eutectic mixtures.

Liposomes are spherical vesicles made of one or more phospholipid bilayers, surrounding aqueous compartments. They have long been used as vehicles for many therapeutic compounds and as models of lipid membranes. Making up most of the membrane lipid fraction, a phospholipid consists of one glycerol, two fatty acids, and a phosphate esterified by a polar group. Owing to their amphiphilic nature, these molecules, above a certain concentration, self-

organize into lipid vesicles in aqueous media. The adsorption of liposomes on a solid surface has been investigated in literature [5,6]. Supported lipid bilayers (SLB) with a planar structure can be formed by the direct adsorption of lipids on a solid substrate [7] and by a spontaneous rupture of vesicles on solid surface [8]. The vesicles' rupture may occur via different mechanisms [5,8], such as fusion of vesicles that may lead to the coverage of the surface by lipid bilayers, or interaction of vesicles with a particular substrate [8–11].

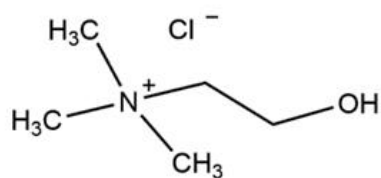
The phospholipid assembly has been investigated in many non-aqueous but polar solvents, such as glycerol and formamide [12–14]. Few studies investigated the behavior of lipids in DES. They were all presented in our recent review [15]. Bryant *et al.* investigated the behavior of different phosphatidylcholine lipids in ChCl:U DES. Solvent penetration experiments, paired with polarizing optical microscopy, showed that the DES penetrated the lipids, at ambient temperature (23°C) and that a non-swelling lamellar phase was formed. Above a certain penetration temperature, a highly swollen and dispersible lamellar phase was formed which spontaneously converted to vesicles few minutes later. Moreover, the chain-melting temperatures increased with the alkyl chain length and saturation of the lipids in the presence of the DES, which is similar to what happens in water. However, the temperature values were higher in DES than in water, which is most probably attributed to the binding of chloride ions to the lipid membrane [16]. After proving that phospholipids self-organize into vesicles in ChCl:U, Bryant *et al.* tested the behavior of phospholipids, by solvent penetration experiments, in different alkylammonium-based DES using glycerol or ethylene glycol as HBD. The minimum temperature for fluid lamellar phase formation depends on the cation and anion type in the DES but does not really depend on the HBD type. As in water, melting temperature ( $T_m$ ) in the DES increases with the lipid alkyl chain length. However,  $T_m$  values were higher in DES than in water owing to the stabilization of the ordered phase ( $L\beta$ ) over the fluid phase ( $L\alpha$ ) by the cations and anions of the salt [9]. When studying the effect of the anion, alkylammonium bromide- based DES presented higher  $T_m$  than alkylammonium chloride- based ones, owing to a stronger binding of bromide to the quaternary ammonium headgroups of the lipids. The  $L\alpha$  phase stability strongly depends on the hydrocarbon chain length of the alkylammonium DES cation [17]. Moreover, Gutierrez *et al.* demonstrated how to go from aqueous chemistry to DES chemistry in order to preserve the membrane-like

structure of liposomes in DES (ChCl:U and ChCl:thiourea). Liposomes were prepared by thin film hydration, using 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) phospholipids. The preformed liposomes were then put in the presence of the aqueous solutions of DES' individual components. Knowing that DES can be obtained by freeze-drying the aqueous solutions of its constituents, the mixture of (water + DES components + liposomes) was freeze-dried. Cryo-etch SEM showed fence-like structures incorporating vesicles. Likewise, vesicles were observed by confocal microscopy. These results show that liposomes were incorporated within DES and their membrane-like structure was maintained in these solvents [18].

AFM has been developed mainly as a powerful technique to measure quantitative and qualitative properties by probing different kind of surfaces on the nanometer scale [19]. The application of AFM to biological systems has recently gained a great interest given its ability to image samples in their natural aqueous environment over a wide range of time scales, from milliseconds to hours, and its high resolution performance in visualizing surfaces topologies on the nanometer scale [20–23]. AFM has been used to study the physical characteristics of lipid vesicles [24–26], and visualize 2D and 3D images of the vesicles, to determine their size distribution, their morphology and their stability. AFM allows to image liposomes aggregation and to investigate their surface properties such as rigidity, viscoelasticity, and adhesion [25,27–30]. Furthermore, owing to its high resolution imaging capacity, AFM readily treats the SLB and monolayers [31–33]. Actually, AFM is adopted to assess the instantaneous morphological changes of both liposomes and SLB under various conditions. Several parameters like temperature, pH or salt composition can be modified during the AFM measurements creating defined environments that can modulate the liposomes features [27,34,35].

To the best of our knowledge, no studies regarding the effect of DES or the aqueous solutions of their constituents on the stability of liposomes have been performed to date. In this study, AFM was used to study the behavior of preformed liposomes as well as phospholipids organization in four ChCl-DES and in the aqueous solutions of their constituents. The three most studied DES (ChCl:U, ChCl:G and ChCl:EG) were tested, along with choline chloride:levulinic acid (ChCl:Lev). The structures of the DES' constituents and the main physico-chemical properties are presented in Figure 1 and Table 1, respectively.

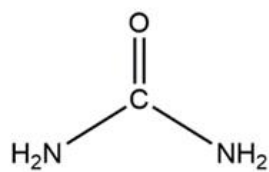
### Hydrogen Bond Acceptor



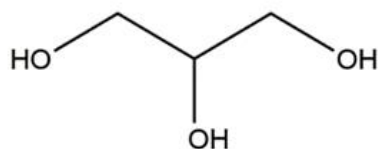
Choline chloride

---

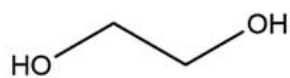
### Hydrogen Bond Donors



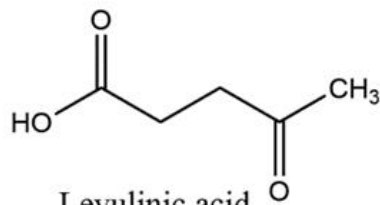
Urea



Glycerol



Ethylene glycol



Levulinic acid

Figure 33. Structures of the constituents used for DES synthesis (single column figure).

Hydrogen bond acceptor (HBA)	Hydrogen bond donor (HBD)	Abbreviation	Density at 25 °C (g cm <sup>-3</sup> ) [3,36–41]	Viscosity at 25 °C (mPa s) [3,36,38]	Polarity $\epsilon_T N$ [40,42,43]
	Urea	ChCl:U	1.196; 1.240; 1.250	1366; 632; 750	0.81
	Glycerol	ChCl:G	1.190; 1.180; 1,192	360; 376; 259	0.83; 0.84; 0.86
Choline Chloride	Ethylene glycol	ChCl:EG	1.115; 1.117; 1.120	40; 36; 37	0.84; 0.82
	Levulinic acid	ChCl:Lev	1.138	270	0.35

Table 4. Main physicochemical properties of the studied DES.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Choline chloride (99%), urea (98%), ethylene glycol (99.5%) and levulinic acid (> 98%) were purchased from Acros Organics (Netherlands). Glycerol ( $\geq 99\%$ ) was purchased from Fisher Scientific (UK). Choline chloride was dried at 60 °C for 2 weeks prior to use. All other compounds were used as received. Lipoid E80 (80-85% egg phosphatidylcholine, 7-9.5% phosphatidylethanolamine, 3% lysophosphatidylcholine, 0.5% lysophosphatidylethanolamine, 2-3% sphingomyelin, 2% water, 0.2% ethanol, iodine value 65-69) was obtained from lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Ethanol is furnished by Sigma Aldrich (France). Mica sheets (9 mm diameter and 0.1 mm thickness) from Nano and More (France), were used as a substrate in AFM imaging. Pyrex-nitride probes triangular cantilevers PNP-TR, (NanoWord Innovative Technologies, Nano and More, Paris, France) integrating a sharpened pyramidal tip with a radius < 10 nm and a macroscopic half cone 35° angle, were used for liposomes imaging.

## **2.2. Preparation of DES and aqueous solutions of DES constituents**

DES were prepared using the heating method, which consists on combining ChCl and the HBD at an appropriate molar ratio, followed by stirring the mixture at 60 °C until a clear and homogenous liquid is formed. Four ChCl-based solvents were prepared using urea, glycerol, ethylene glycol or levulinic acid as HBD at a HBA:HBD molar ratio of 1:2. The water content of the prepared solvents was determined by a coulometric Karl Fisher titrator (Mettler Toledo DL31). The values of water content vary between 0.05 and 0.33 wt. %.

The aqueous solutions of DES constituents were prepared by adding the masses of each individual DES component to water, in which the molar ratio used to prepare the different DES was respected.

## **2.3. Preparation of liposomes**

Liposomes were prepared following the ethanol injection method. 500 mg of lipid E80 were dissolved in 10 ml of ethanol. The obtained organic phase was later injected, using a syringe pump (Fortuna optima, GmbH-Germany), into 20 ml of ultra-pure water, at a flow rate of 1 ml/min, under magnetic stirring at 400 rpm at room temperature. The liposomal suspension was then kept under stirring (400 rpm) for 15 min. Finally, ethanol was removed by rotary evaporation (Heidolph instruments GmbH and co., Germany) at 40 °C and 60 rpm under reduced pressure. The liposomal formulation was stored at 4 °C prior to analysis.

## **2.4. Atomic force microscopy imaging**

AFM imaging was performed at room temperature using an Agilent 5420 microscope (Key sight, California, USA) and a pyramidal AFM probe with a 0.08 N/m force constant. All samples were imaged in contact mode with a typical scan rate of 1 Hz, resolution of 512 x 512 pixels per image, scanning angle of 0°, and a set point typically below 0.1 nN to avoid vesicles damage or displacement. Images of 5x5  $\mu\text{m}^2$ , 4x4  $\mu\text{m}^2$  or 2x2  $\mu\text{m}^2$  were recorded. In this study, the AFM contact mode imaging was used to probe the following samples.



## **2.5. Exposure of adsorbed liposomes to DES and to aqueous solutions of DES components**

The liposomal suspension was diluted 10 times in ultrapure water. Then, 50  $\mu$ l of the diluted suspension was deposited on freshly cleaved mica surface and left for 15 min in air at room temperature; this allows the adsorption of liposomes on the mica surface. The adsorbed liposomes were then exposed to 50  $\mu$ l of ultrapure water (used as control), 50  $\mu$ l of each of the studied DES (ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, ChCl:Lev DES) or 50  $\mu$ l of the aqueous solutions of DES constituents prepared as described in paragraph 2.2. The exposure stands for 30 min in air for the nine samples. Every mica sheet was rinsed with ultrapure water to remove the non-adsorbed vesicles, and inserted directly (before drying) for imaging. At least 20 images were taken for each analysis and the experiment was repeated at least 2 times.

## **2.6. Incubation of preformed liposomes in DES and in aqueous solutions of DES components**

An aliquot of the liposomal suspension was diluted 10 times in water, in DES or in aqueous solutions of DES constituents. The dilution in water was considered as a control. After mixing, 50  $\mu$ l was removed at different times (5, 60, 80, 100, 120 minutes, 24 and 48h), deposited on freshly cleaved mica surface and left for 15 min in air for adsorption at room temperature. Excess vesicles were removed by rinsing the mica surface with ultrapure water, and then the mica sheet was inserted directly for imaging. For a statistical purpose, 20 images were recorded.

## **2.7. Phospholipid organization in DES**

10 mg of lipid E80 were dissolved in a mixture of DES (1.8 ml) (ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG or ChCl:Lev) and ultrapure water (0.2 ml). Water was added (10% v/v) to imitate the conditions of the experiments executed for preformed liposomes. The obtained mixtures were kept under stirring at room temperature. Aliquots of 50  $\mu$ l were removed at 4, 24 and 48h and deposited on mica surface for adsorption. The non-adsorbed structures were then removed by rinsing the

surface with ultrapure water. Finally, the samples were visualized by AFM, and 20 images were recorded for each analysis and the experiment was repeated at least 2 times.

### **3. Results**

#### **3.1. Effect of DES on adsorbed liposomes**

AFM technique, in contact mode, was first used to study the effect of DES and the aqueous solutions of DES' components on the structure and the morphology of liposomes following their adsorption on mica surface.

Figure 2 illustrates representative 2D images of the liposomes exposed to water, the four ChCl-DES and the aqueous solutions of ChCl and the appropriate HBD. The average values of the diameter and height of 200 liposomes detected in twenty images were determined using the AFM cross section tool.

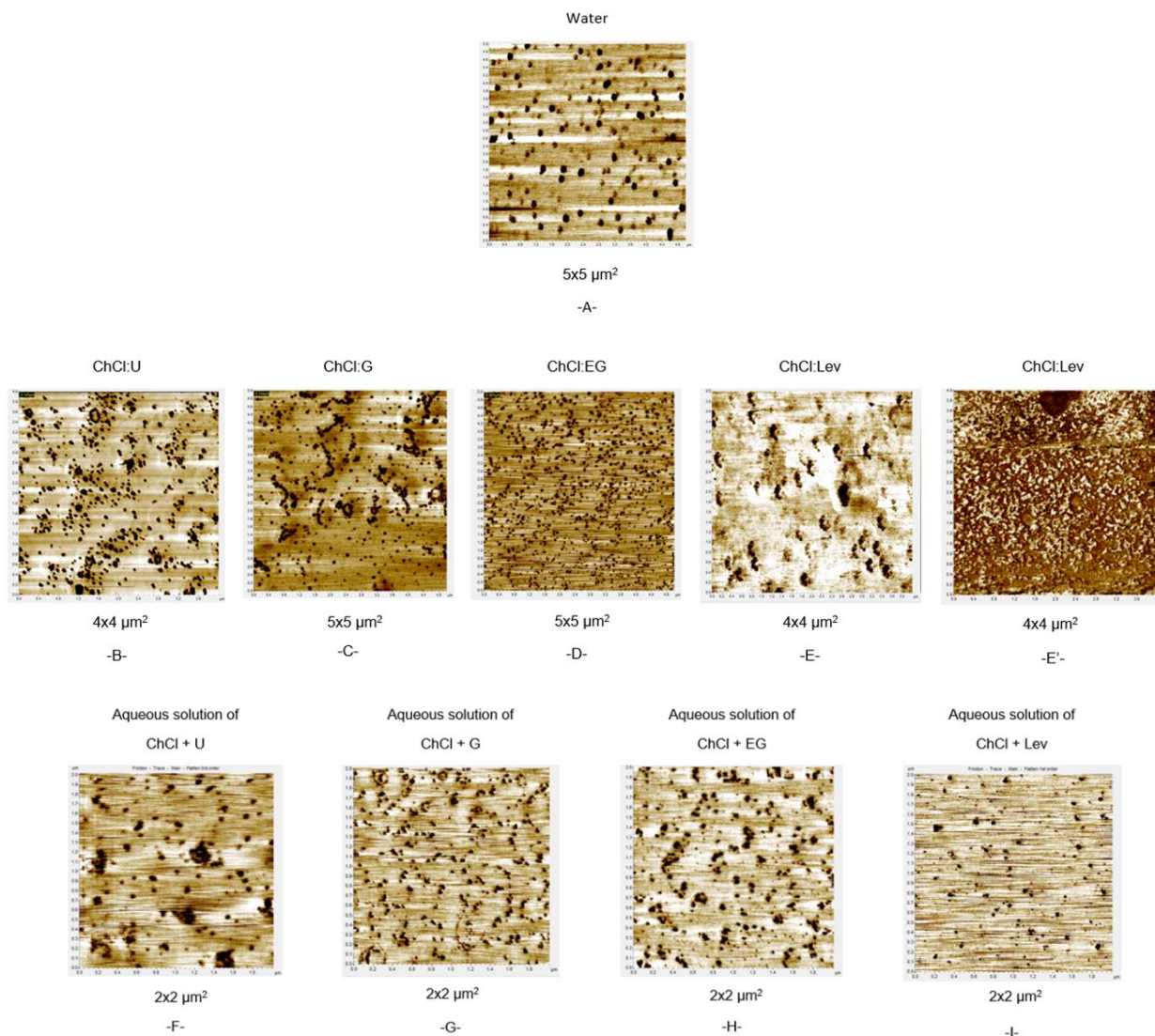


Figure 34. AFM contact mode 2D images of Egg PC liposomes exposed to A- Ultrapure water, B- ChCl:U, C ChCl:G, D- ChCl:EG, E, E' ChCl:Lev F- aqueous solution of ChCl + U, G- aqueous solution of ChCl + G, H- aqueous solution of ChCl + EG, I- aqueous solution of ChCl + Lev (2 column figure).

Exposed to water, well adsorbed vesicles on the mica substrate were obtained, with a spherical-cap structure and a diameter ranging from 90 to 220 nm (Figure 2 A), with a mean value of  $150 \pm 30$  nm and a height of  $22 \pm 4$  nm.

Exposed to DES (ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG), the adsorbed Egg phosphatidylcholine (Egg PC) liposomes maintained their spherical-cap structures, while their size decreased in comparison with those exposed to water. A different behavior was observed for liposomes exposed to

ChCl:Lev. A clear aggregation of liposomes (figure 2E), and/or conversion to supported lipid bilayers of  $\sim 7$  nm height (Figure 2E') were observed.

Exposed to the aqueous solutions of DES constituents, liposomes showed the same behavior as when exposed to DES with additional decrease in the mean dimensions' values; liposomes diameters varied between 30 and 60 nm. The mean diameter D and height H values are presented in Table 2. In contrast to liposomes exposed to ChCl:Lev DES, no aggregation or conversion to SLB was observed for the aqueous solution containing ChCl and Lev. Also, the liposomes in the four aqueous solutions of DES constituents maintain their spherical-cap shape.

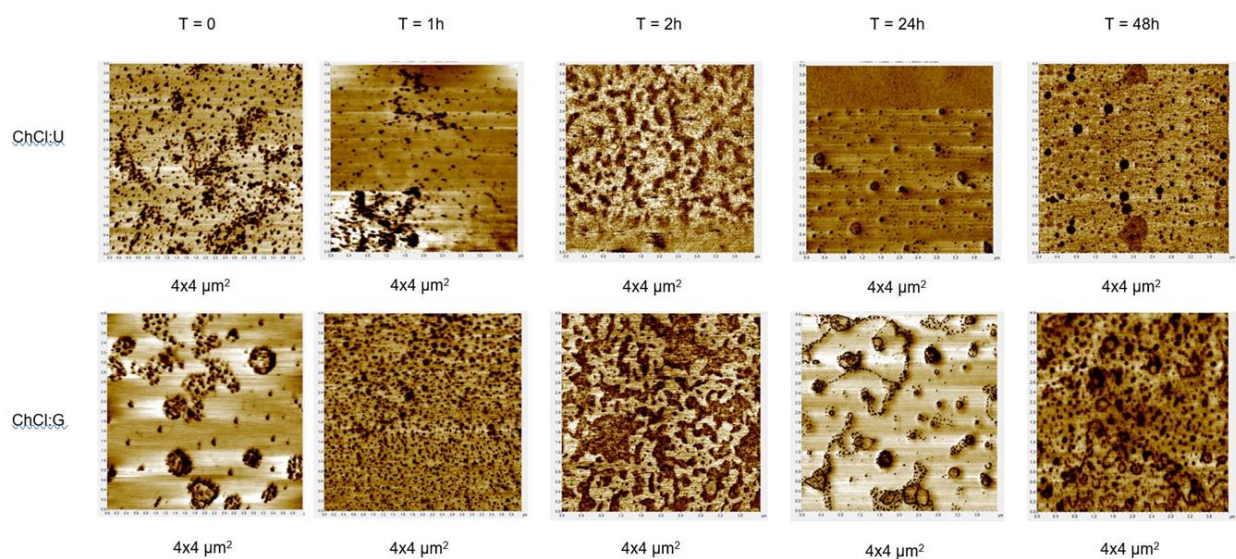
DES	ChCl:U	ChCl:G	ChCl:EG	ChCl:Lev
Time				
30 min	D = $75 \pm 15$ nm H = $17 \pm 3$ nm	D = $80 \pm 20$ nm H = $18 \pm 4$ nm	D = $60 \pm 18$ nm H = $16 \pm 3$ nm	Aggregation and/or SLBs
Aqueous Solutions	Aqueous Solution of ChCl + U	Aqueous Solution of ChCl + G	Aqueous Solution of ChCl + EG	Aqueous Solution of ChCl + Lev
Time				
30 min	D = $48 \pm 15$ nm H = $14 \pm 2$ nm	D = $45 \pm 7$ nm H = $14 \pm 2$ nm	D = $46 \pm 6$ nm H = $14 \pm 2$ nm	D = $45 \pm 4$ nm H = $14 \pm 2$ nm

Table 5. Mean diameter D and mean height H of Egg PC liposomes exposed to ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, ChCl:Lev, aqueous solution of ChCl + U, aqueous solution of ChCl + G, aqueous solution of ChCl + EG, and aqueous solution of ChCl + Lev, after 30 min of exposure, determined by AFM using the cross section tool.

### 3.2. Time-dependent behavior of liposomes in DES media and in aqueous solutions of DES constituents

As mentioned in section 2.6., the Egg PC liposomal suspension was mixed with water, DES or the aqueous solutions of DES constituents before their deposition on mica surface. The samples were then imaged by AFM in contact mode. The morphology and dimensions (diameter and height) of liposomes were determined after various incubation times (up to 48h) for the eight samples.

Figure 3 illustrates AFM 2D images of Egg PC liposomes incubated in the four studied DES, and in the aqueous solutions of DES constituents for 1, 2, 24 and 48h. The images obtained at other incubation times (1h20 min, 1h40 min and 4h) are presented in Figure S1 (supplementary material).





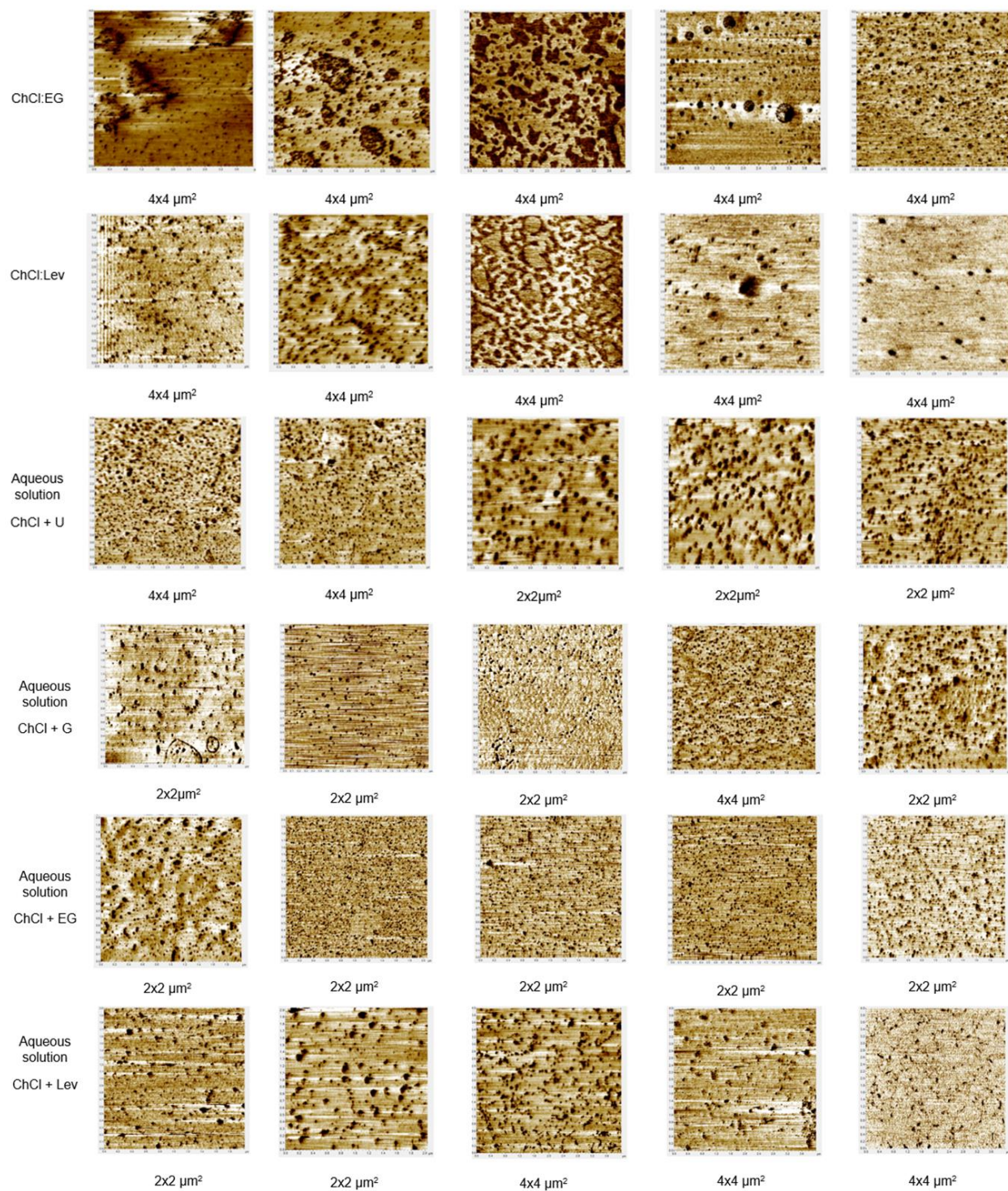


Figure 35. AFM 2D 4x4, and 2x2  $\mu\text{m}^2$  images of EggPC liposomes incubated in ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, ChCl:Lev, aqueous solution of ChCl + U, aqueous solution of ChCl + G, aqueous solution of ChCl + EG, and aqueous solution of ChCl + Lev, at  $t = 0, 1, 2, 24,$  and  $48\text{h}$ , obtained in contact mode (2 column figure).

AFM images of the suspension composed of DES and liposomes showed well adsorbed liposomes on mica sheets at time  $t = 0$  (Figure 3). The images present a non-homogeneous dispersion of vesicles on the mica surface. This indicates a non-homogeneity of liposomes distribution within the DES, compared to liposomes in water (figures not shown). In addition, the mean diameter values of liposomes suspended in the studied DES are less than those suspended in water, especially at  $t = 0$  and  $t = 1\text{h}$  (Table 3). Aggregation of vesicles started at  $t = 0$  for all the samples and seemed to dominate the images at  $t = 1\text{h}$ . Furthermore, complete conversion to SLB ( $\sim 7\text{ nm}$  of height) was observed at  $t = 2\text{h}$ . This indicates that aggregation and/or fusion occurs between  $t = 0$  and  $t = 2\text{h}$ , and continues till  $4\text{h}$  (Figure S1). The time evolution of the liposomes' morphologies in DES between  $t = 1\text{h}$  and  $t = 4\text{h}$  are shown in Figure S1 at  $t = 1\text{h}20\text{ min}$ , at  $t = 1\text{h}40\text{ min}$ , and at  $t = 4\text{h}$ . However, a clear reconstitution of liposomes was detected at  $t = 24\text{h}$  in all the DES media. The size of the reconstituted liposomes increased over time, and remained stable between 24 and 48h.

When it comes to liposomes incubated in the aqueous solutions of DES constituents, AFM images show well adsorbed liposomes on mica substrates at 0, 1, 2, 24 and 48h. In contrast to our findings on liposomes suspended in DES, no aggregation and fusion were detected on the mica substrates. We can only notice spherical-cap structures of liposomes for all the samples at different times; the SLB structures were seemingly absent. Despite the similarity of liposomes morphology compared to water, we noticed a clear decrease in size starting from  $t = 0\text{h}$ ; while some vesicles maintained their initial diameter ( $\sim 100\text{ nm}$ ). Starting from  $t = 1\text{h}$ , the decrement of sizes remains stable and liposomes conserve their mean diameter and height values at the different times for all samples, as indicated in Table 3.

Time (h) Solvent	0	1	2	24	48
Water	D = 120 ± 15 nm H = 21 ± 3 nm				
ChCl:U	D = 65 ± 13 nm H = 15 ± 3 nm	D = 60 ± 10 nm H = 14 ± 3 nm	SLB	D = 50 ± 18 nm H = 15 ± 3 nm	D = 80 ± 20 nm H = 17 ± 4 nm
ChCl:G	D = 80 ± 8 nm H = 16 ± 3 nm	D = 67 ± 10 nm H = 15 ± 3 nm	SLB	D = 35 ± 8 nm H = 12 ± 1 nm	D = 75 ± 18 nm H = 14 ± 2 nm
ChCl:EG	D = 65 ± 10 nm H = 14 ± 2 nm	D = 65 ± 8 nm H = 15 ± 3 nm	SLB	D = 66 ± 25 nm H = 17 ± 3 nm	D = 80 ± 18 nm H = 14 ± 2 nm
ChCl:Lev	D = 72 ± 13 nm H = 15 ± 3 nm	D = 60 ± 10 nm H = 14 ± 3 nm	SLB	D = 73 ± 10 nm H = 14 ± 2 nm	D = 90 ± 20 nm H = 18 ± 4 nm
Aqueous solution of ChCl + U	D = 62 ± 10 nm H = 15 ± 2 nm	D = 50 ± 8 nm H = 14 ± 2 nm	D = 47 ± 8 nm H = 14 ± 2 nm	D = 46 ± 6 nm H = 14 ± 3 nm	D = 46 ± 4 nm H = 14 ± 2 nm
Aqueous solution of ChCl + G	D = 55 ± 13 nm H = 15 ± 2 nm	D = 47 ± 6 nm H = 14 ± 2 nm	D = 45 ± 7 nm H = 14 ± 2 nm	D = 44 ± 6 nm H = 14 ± 3 nm	D = 44 ± 4 nm H = 14 ± 2 nm
Aqueous solution of ChCl + EG	D = 58 ± 13 nm H = 15 ± 3 nm	D = 49 ± 8 nm H = 14 ± 2 nm	D = 46 ± 7 nm H = 14 ± 2 nm	D = 45 ± 5 nm H = 14 ± 3 nm	D = 45 ± 4 nm H = 14 ± 2 nm
Aqueous solution of ChCl + Lev	D = 53 ± 11 nm H = 15 ± 2 nm	D = 47 ± 6 nm H = 14 ± 2 nm	D = 45 ± 6 nm H = 14 ± 2 nm	D = 45 ± 5 nm H = 14 ± 3 nm	D = 44 ± 4 nm H = 14 ± 2 nm

Table 6. Mean diameter D and mean height H of Egg PC liposomes incubated in water, ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, ChCl:Lev, aqueous solution of ChCl + U, aqueous solution of ChCl + G, aqueous solution of ChCl + EG, and aqueous solution of ChCl + Lev, at t = 0, 1, 2, 24, and 48h, determined by AFM using the cross section tool.



### 3.3. Phospholipids organization in the eutectic systems

Lipoid E80 was dissolved in the four ChCl-DES. Aliquots were removed at 4, 24 and 48h and imaged by AFM in contact mode. Figure 4 illustrates AFM 2D images of the evolution of lipid E80 organization within the four different DES in function of time.

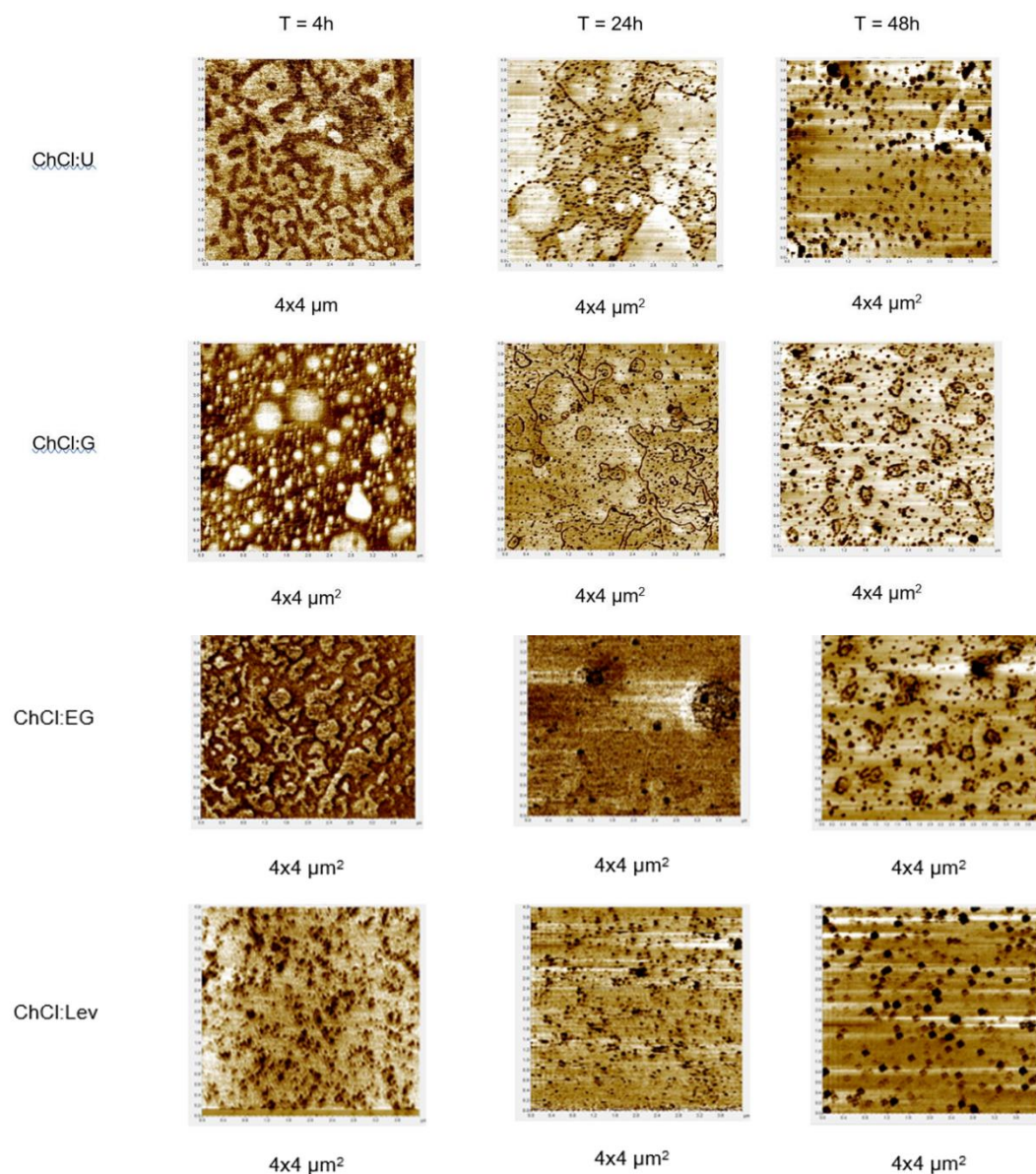


Figure 36. 4x4  $\mu\text{m}^2$  AFM 2D images of Lipoid E80 within ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, and ChCl:Lev obtained in contact mode at 4, 24 and 48h (2 column figure).

At t=4h, lipid bilayers are formed in presence of the three DES ChI:U, ChCl:G and ChCl:EG and cover the mica substrate, while clear formation of aggregated and separated vesicles was detected in ChCl:Lev DES. At t = 24h, spherical vesicles and other structures were seen in the four studied DES. At t = 48h, partial to complete conversion of lipoid E80 to stable spherical caps shape was observed in all DES. This conversion seems to be complete and faster in ChCl:Lev DES, followed by ChCl:U DES, then the two other solvents. Such finding is also proven by the increase of the vesicles' diameter with time. Table 4 shows the mean diameter and height values of the vesicles formed in the four DES in function of time.

Taking into account that the size of Egg PC liposomes suspended in water ranged from 80 to 160 nm with a mean size of  $120 \pm 15$  nm and a mean height of  $21 \pm 3$  nm, we can see the formation of Egg PC vesicles in the studied DES (Table 4). Note that the mean size of liposomes formed inside ChCl:Lev or ChCl:U is closer to that of Egg PC liposomes in water. On the other hand, it is obvious that the mean size of the liposomes increases with time; this is accompanied with the simultaneous disappearance of the lipid wires.

Time (h) DES	4	24	48
ChCl:U	SLB	D = $60 \pm 12$ nm H = $16 \pm 3$ nm	D = $77 \pm 11$ nm H = $15 \pm 2$ nm
ChCl:G	SLB	D = $50 \pm 8$ nm H = $12 \pm 1$ nm	D = $78 \pm 12$ nm H = $16 \pm 2$ nm
ChCl:EG	SLB	D = $66 \pm 25$ nm H = $17 \pm 3$ nm	D = $100 \pm 20$ nm H = $20 \pm 4$ nm

ChCl:Lev	D = $60 \pm 10$ nm H = $14 \pm 2$ nm	D = $80 \pm 12$ nm H = $16 \pm 3$ nm	D = $140 \pm 20$ nm H = $25 \pm 4$ nm
----------	---	---	--

Table 7. Mean diameter  $D$  and height  $H$  values of the vesicles formed in ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, and ChCl:Lev, at 4, 24 and 48h, obtained by AFM the cross section tool.

## 4. Discussion

Phospholipids self-assemble in polar solvents due to solvophobic interactions between their hydrocarbon chains and the solvent. For Egg PC, which is a mixture containing 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) as its major constituent, the lipid alkyl chain has liquid-like organization at 23 °C [44]. Phospholipids were dissolved within the studied DES, converted into SLB at  $t = 4$ h, then into vesicles at  $t = 24$ h. However, liposomes formation was faster in ChCl:Lev compared to other DES since no SLB were observed at 4h. Lipid vesicles formation within DES have been also reported by other researchers. Bryant *et al.* (2016) dissolved four different PC lipids (DMPC, DPPC, DSPC, and EggPC) in ChCl:U, and observed a spontaneous formation of vesicles above the lipid chain melting temperature [45]. The same authors detected the formation of vesicles after dissolving the same phospholipids in alkylammonium-based DES, using G or EG as HBD [46]. The dissolution and organization of lipid molecules within the DES could be explained by an association between chloride and the quaternary ammonium group of phospholipids and between choline of DES salt and the phosphate group of phospholipids. Nevertheless, the viscosity of the solvent does not affect the behavior of phospholipids given that similar results were observed for the most viscous DES (ChCl:U) and the least viscous one (ChCl:EG). The same applies to the density of the tested solvents. In order to understand the rapid formation of vesicles in ChCl:Lev, correlation studies between the mean diameter of the vesicles at 48h and the DES' or the HBD's properties were conducted, using the experimental values determined in different studies [36,38,42,47]. No correlations were found between the density, viscosity or polarity of the DES and the mean diameter of the vesicles (Figure S2).

However, a correlation was found between the mean diameter of the vesicles and logP of the HBD ( $R^2 = 0.9619$ ) (Figure 5), unlike the HBD's pKa (Figure S3). When the HBD is less hydrophilic, larger is the mean diameter of the vesicles.

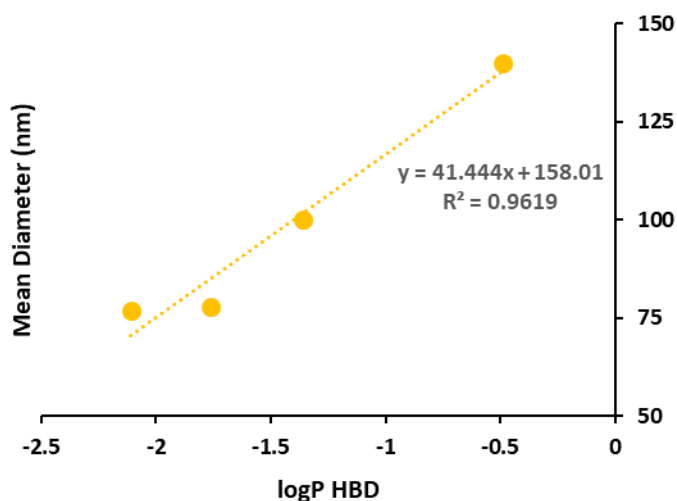


Figure 37. Correlation study between logP of the HBD and the mean diameter of the vesicles formed after 48h of the dissolution of E80 phospholipids in DES (single column figure).

On the other hand, the effect of DES or the aqueous solutions of DES components was studied on preformed liposomes. Egg PC vesicles showed variations in terms of size and distribution on the mica surface when exposed to DES or aqueous solutions of DES components for 30 min. The reduction of the size of the vesicles in presence of the aqueous solutions of ChCl and the HBD can be explained by the osmosis phenomenon. Given that liposomes are prepared in water using the ethanol injection method, the core-shell lipid structures consist on an internal aqueous cavity surrounded by lipid bilayers. That said, in the presence of aqueous solutions of DES components, inner water molecules tend to migrate through the semipermeable membrane. Likewise, a size reduction was detected in presence of the DES which is also related to osmosis. In fact, two recent

studies demonstrated the potential of ChCl:G and ChCl:EG DES as efficient, inexpensive and reusable draw solutions for the enrichment of biomacromolecules or the recovery of water from industrial wastewater, using forward osmosis [48,49]. Additionally, Bubalo *et al.* (2015) witnessed a decrease in the baker's yeast viability as a result of a high DES content in the medium and explained it by the high osmotic pressure imposed on the yeast cells, leading to the diffusion of water out of the cells [50]. This osmotic potential pushed liposomes to lose their confined water molecules to the surrounding environment, leading to the reduction of their size. Once again, a distinct behavior was noticed for liposomes exposed to ChCl:Lev where a clear aggregation of liposomes and/or conversion to supported lipid bilayers were observed. The distinctive effect of ChCl:Lev compared to the three other DES cannot be explained neither by the density nor the viscosity of the eutectic mixture. Moreover, all four DES are composed of ChCl, the only thing differing is the HBD. That said, if we compare the HBD (urea, glycerol, ethylene glycol and levulinic acid), levulinic acid turns out to be the most hydrophobic one. A hydrophobic compound gives rise to a relatively hydrophobic DES, which probably leads to the dissolution of the bilayer membrane fragments resulting in SLB formation. Thus, in the presence of ChCl:Lev, both osmosis and dissolution may contribute to the SLB formation.

Moreover, the preformed liposomes were also incubated in DES or the aqueous solutions of DES components before their deposition on mica surface and their behavior was followed over time. When incubated in the aqueous solutions of DES constituents, a reduction in the size of the lipid vesicles is detected until  $t = 1\text{h}$ , reflecting the progression of the osmosis phenomenon. This behavior was expected since similar observations were seen for adsorbed liposomes exposed to these aqueous solutions. After 2h in the presence of DES, the mica sheets were completely covered by SLB. This is due to osmosis and to eventual aggregation and/or fusion of the vesicles. The SLB formed were not stable and converted into vesicles after 24h, owing to the solvent encapsulation by the lipid bilayers. The reconstituted liposomes presented an increasing behavior in size with time, which is most probably due to additional lipid molecules joining the liposomal membrane structures. However, no correlation was detected between the mean diameter of the vesicles at 48h and the properties of the solvents (Figure S4) or the corresponding HBD (Figure S5).

## **5. Conclusions**

In summary, the present study investigates the organization of phospholipids in four ChCl-DES using AFM technique. It also reveals the effect of DES or the aqueous solutions of their components on preformed liposomes for the first time. The self-assembly of phospholipids in DES leads to the formation of lipid vesicles, that can have a potential application in drug delivery. On the other hand, the size of preformed liposomes decreased after their exposure to the studied DES and their corresponding aqueous solutions due to the osmosis phenomenon. Similar results were obtained when following the effect of the incubation of preformed liposomes in the aqueous solutions of DES components over time. However, when incubated in DES, liposomes converted into SLB after 2h, preceding their reconstitution into vesicles 24h later. Once more, results show that DES are promising solvents for the organization of phospholipids. Yet, further studies must be carried out to understand the mechanism behind the phospholipid self-assembly as well as the destruction of preformed liposomes in presence of DES and their reconstitution.

## **Conflicts of interest**

Authors declare no conflict of interest.

## **Acknowledgements**

Authors thank Doctor Luca Monticelli for the valuable suggestions on the manuscript, the Research Funding Program at the Lebanese University and the Agence Universitaire de la Francophonie (PCSI project 2018-2020) for funding the project and providing a scholarship to Jad Eid. We thank also the Lebanese University and the Université du Littoral Côte d'Opale for the scholarship of Tracy El Achkar.

## **References**

- [1] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme, Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>.
- [2] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chem Commun.* (2003) 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>.
- [3] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.* 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [4] Scientific Opinion on safety and efficacy of choline chloride as a feed additive for all animal species, *EFSA J.* 9 (2011) 2353. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2353>.
- [5] L. Habib, A. Jraij, N. Khreich, C. Charcosset, H. Greige-Gerges, Effect of Erythrodiol, A Natural Pentacyclic Triterpene from Olive Oil, on the Lipid Membrane Properties, *J. Membr. Biol.* 248 (2015) 1079–1087. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9821-x>.
- [6] I. Reviakine, A. Brisson, Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy, *Langmuir.* 16 (2000) 1806–1815. <https://doi.org/10.1021/la9903043>.
- [7] J. Jass, T. Tjärnhage, G. Puu, From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study, *Biophys. J.* 79 (2000) 3153–3163. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76549-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76549-0).
- [8] R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson, Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study, *Biophys. J.* 85 (2003) 3035–3047. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74722-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74722-5).
- [9] Z. Lv, S. Banerjee, K. Zagorski, Y.L. Lyubchenko, Supported Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy Studies, in: Y.L. Lyubchenko (Ed.), *Nanoscale Imaging Methods Protoc.*, Springer, New York, NY, 2018: pp. 129–143. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8591-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8591-3_8).
- [10] H.M. Seeger, G. Marino, A. Alessandrini, P. Facci, Effect of Physical Parameters on the Main Phase Transition of Supported Lipid Bilayers, *Biophys. J.* 97 (2009) 1067–1076. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.068>.
- [11] A. Charrier, F. Thibaudau, Main Phase Transitions in Supported Lipid Single-Bilayer, *Biophys. J.* 89 (2005) 1094–1101. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062463>.
- [12] R.V. McDaniel, T.J. McIntosh, S.A. Simon, Nonelectrolyte substitution for water in phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 731 (1983) 97–108. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90402-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90402-9).
- [13] T.J. McIntosh, A.D. Magid, S.A. Simon, Range of the solvation pressure between lipid membranes: dependence on the packing density of solvent molecules, *Biochemistry.* 28 (1989) 7904–7912. <https://doi.org/10.1021/bi00445a053>.
- [14] F. Gayet, J.-D. Marty, A. Brûlet, N.L. Viguerie, Vesicles in Ionic Liquids, *Langmuir.* 27 (2011) 9706–9710. <https://doi.org/10.1021/la2015989>.
- [15] T. El Achkar, S. Fourmentin, H. Greige-Gerges, Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds, *J. Mol. Liq.* 288 (2019) 111028. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111028>.
- [16] S.J. Bryant, R. Atkin, G.G. Warr, Spontaneous vesicle formation in a deep eutectic solvent, *Soft Matter.* 12 (2016) 1645–1648. <https://doi.org/10.1039/C5SM02660A>.
- [17] S.J. Bryant, R. Atkin, G.G. Warr, Effect of Deep Eutectic Solvent Nanostructure on Phospholipid Bilayer Phases, *Langmuir.* 33 (2017) 6878–6884. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01561>.
- [18] M.C. Gutiérrez, M.L. Ferrer, C.R. Mateo, F. del Monte, Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures, *Langmuir.* 25 (2009) 5509–5515. <https://doi.org/10.1021/la900552b>.

- [19] G. Binnig, C.F. Quate, Ch. Gerber, Atomic Force Microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- [20] B. Ruozi, G. Tosi, M. Tonelli, L. Bondioli, A. Mucci, F. Forni, M.A. Vandelli, AFM phase imaging of soft-hydrated samples: a versatile tool to complete the chemical-physical study of liposomes, *J. Liposome Res.* 19 (2009) 59–67. <https://doi.org/10.1080/08982100802584071>.
- [21] I. Sokolov, CHAPTER 1 Atomic Force Microscopy in Cancer Cell Research, *Cancer Nanotechnology* 1(2007) 1-17.
- [22] H. Uehara, T. Osada, A. Ikai, Quantitative measurement of mRNA at different loci within an individual living cell, *Ultramicroscopy.* 100 (2004) 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2004.01.014>.
- [23] S. Vahabi, B. Nazemi Salman, A. Javanmard, Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study, *Iran. J. Med. Sci.* 38 (2013) 76–83.
- [24] R.W. Storrs, F.D. Tropper, H.Y. Li, C.K. Song, J.K. Kuniyoshi, D.A. Sipkins, K.C.P. Li, M.D. Bednarski, Paramagnetic Polymerized Liposomes: Synthesis, Characterization, and Applications for Magnetic Resonance Imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 7301–7306. <https://doi.org/10.1021/ja00133a001>.
- [25] X. Liang, G. Mao, K.Y. Simon Ng, Probing small unilamellar EggPC vesicles on mica surface by atomic force microscopy, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 34 (2004) 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.017>.
- [26] 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. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00363>.
- [27] J. Sitterberg, M.M. Gaspar, C. Ehrhardt, U. Bakowsky, Atomic force microscopy for the characterization of proteoliposomes, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 606 (2010) 351–361. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-447-0\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-447-0_23).
- [28] B. Ruozi, D. Belletti, A. Tombesi, G. Tosi, L. Bondioli, F. Forni, M.A. Vandelli, AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study, *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 557–563. <https://doi.org/10.2147/IJN.S14615>.
- [29] N.H. Thomson, I. Collin, M.C. Davies, K. Palin, D. Parkins, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, P.M. Williams, Atomic Force Microscopy of Cationic Liposomes, *Langmuir.* 16 (2000) 4813–4818. <https://doi.org/10.1021/la991256p>.
- [30] A.F. Palmer, P. Wingert, J. Nickels, Atomic force microscopy and light scattering of small unilamellar actin-containing liposomes, *Biophys. J.* 85 (2003) 1233–1247. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74559-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74559-7).
- [31] Y. Fang, J. Yang, Role of the Bilayer–Bilayer Interaction on the Ripple Structure of Supported Bilayers in Solution, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 15614–15619. <https://doi.org/10.1021/jp961054r>.
- [32] L.K. Tamm, C. Böhm, J. Yang, Z. Shao, J. Hwang, M. Edidin, E. Betzig, Nanostructure of supported phospholipid monolayers and bilayers by scanning probe microscopy, *Thin Solid Films.* 284–285 (1996) 813–816. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(95\)08453-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(95)08453-3).
- [33] S. Singh, D.J. Keller, Atomic force microscopy of supported planar membrane bilayers, *Biophys. J.* 60 (1991) 1401–1410. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82177-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82177-4).
- [34] Y. Takechi-Haraya, K. Sakai-Kato, Y. Abe, T. Kawanishi, H. Okuda, Y. Goda, Observation of liposomes of differing lipid composition in aqueous medium by means of atomic force microscopy, *Microscopy.* 65 (2016) 383–389. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfw011>.



- [35] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 1(2) (2012) 147-168. <https://doi.org/info:doi/10.1166/jcsb.2012.1020>.
- [36] L. Moura, T. Moufawad, M. Ferreira, H. Bricout, S. Tilloy, E. Monflier, M.F. Costa Gomes, D. Landy, S. Fourmentin, Deep eutectic solvents as green absorbents of volatile organic pollutants, *Environ. Chem. Lett.* 15 (2017) 747–753. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0654-y>.
- [37] A.P. Abbott, G. Capper, S. Gray, Design of Improved Deep Eutectic Solvents Using Hole Theory, *ChemPhysChem.* 7 (2006) 803–806. <https://doi.org/10.1002/cphc.200500489>.
- [38] C. D’Agostino, R.C. Harris, A.P. Abbott, L.F. Gladden, M.D. Mantle, Molecular motion and ion diffusion in choline chloride based deep eutectic solvents studied by <sup>1</sup>H pulsed field gradient NMR spectroscopy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 21383. <https://doi.org/10.1039/c1cp22554e>.
- [39] A.P. Abbott, R.C. Harris, K.S. Ryder, Application of Hole Theory to Define Ionic Liquids by their Transport Properties †, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 4910–4913. <https://doi.org/10.1021/jp0671998>.
- [40] A.P. Abbott, R.C. Harris, K.S. Ryder, C. D’Agostino, L.F. Gladden, M.D. Mantle, Glycerol eutectics as sustainable solvent systems, *Green Chem.* 13 (2011) 82–90. <https://doi.org/10.1039/C0GC00395F>.
- [41] K. Shahbaz, S. Baroutian, F.S. Mjalli, M.A. Hashim, I.M. AlNashef, Densities of ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents: Prediction using artificial intelligence and group contribution techniques, *Thermochim. Acta.* 527 (2012) 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.10.010>.
- [42] C. Florindo, A.J. S. McIntosh, T. Welton, L. C. Branco, I. M. Marrucho, A closer look into deep eutectic solvents: exploring intermolecular interactions using solvatochromic probes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20 (2018) 206–213. <https://doi.org/10.1039/C7CP06471C>.
- [43] A. Pandey, R. Rai, M. Pal, S. Pandey, How polar are choline chloride-based deep eutectic solvents? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2013) 1559–1568. <https://doi.org/10.1039/C3CP53456A>.
- [44] 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. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741>.
- [45] S.J. Bryant, R. Atkin, G.G. Warr, Spontaneous vesicle formation in a deep eutectic solvent, *Soft Matter.* 12 (2016) 1645–1648. <https://doi.org/10.1039/C5SM02660A>.
- [46] S.J. Bryant, R. Atkin, G.G. Warr, Effect of Deep Eutectic Solvent Nanostructure on Phospholipid Bilayer Phases, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 33 (2017) 6878–6884. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01561>.
- [47] C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants., Wash. DC Am. Chem. Soc. 557 (1995).
- [48] D. Mondal, A. Mahto, P. Veerababu, J. Bhatt, K. Prasad, S.K. Nataraj, Deep eutectic solvents as a new class of draw agent to enrich low abundance DNA and proteins using forward osmosis, *RSC Adv.* 5 (2015) 89539–89544. <https://doi.org/10.1039/C5RA20735E>.
- [49] A. Mahto, D. Mondal, V. Poliseti, J. Bhatt, N. M. R, K. Prasad, S.K. Nataraj, Sustainable Water Reclamation from Different Feed Streams by Forward Osmosis Process Using Deep Eutectic Solvents as Reusable Draw Solution, *Ind. Eng. Chem. Res.* 56 (2017) 14623–14632. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03046>.
- [50] M. Cvjetko Bubalo, M. Mazur, K. Radošević, I. Radojčić Redovniković, Baker’s yeast-mediated asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutanoate in deep eutectic solvents, *Process Biochem.* 50 (2015) 1788–1792. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.015>.

## Supporting materials

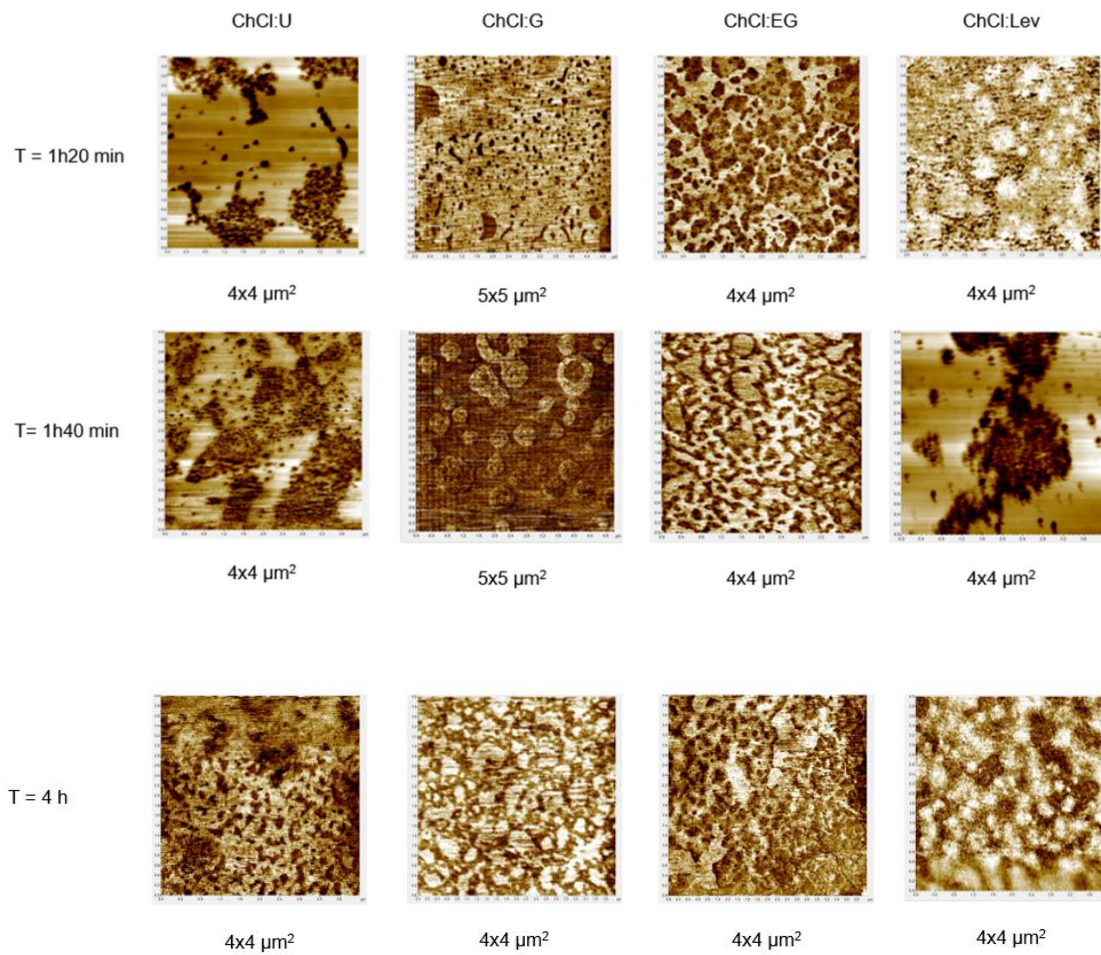


Figure S1. AFM 2D 4x4, and 5x5  $\mu\text{m}^2$  images of Egg PC liposomes incubated in ChCl:U, ChCl:G, ChCl:EG, ChCl:Lev, at  $t = 1\text{h}20\text{min}$ ,  $1\text{h}40\text{min}$ , and  $4\text{h}$  obtained in contact mode.

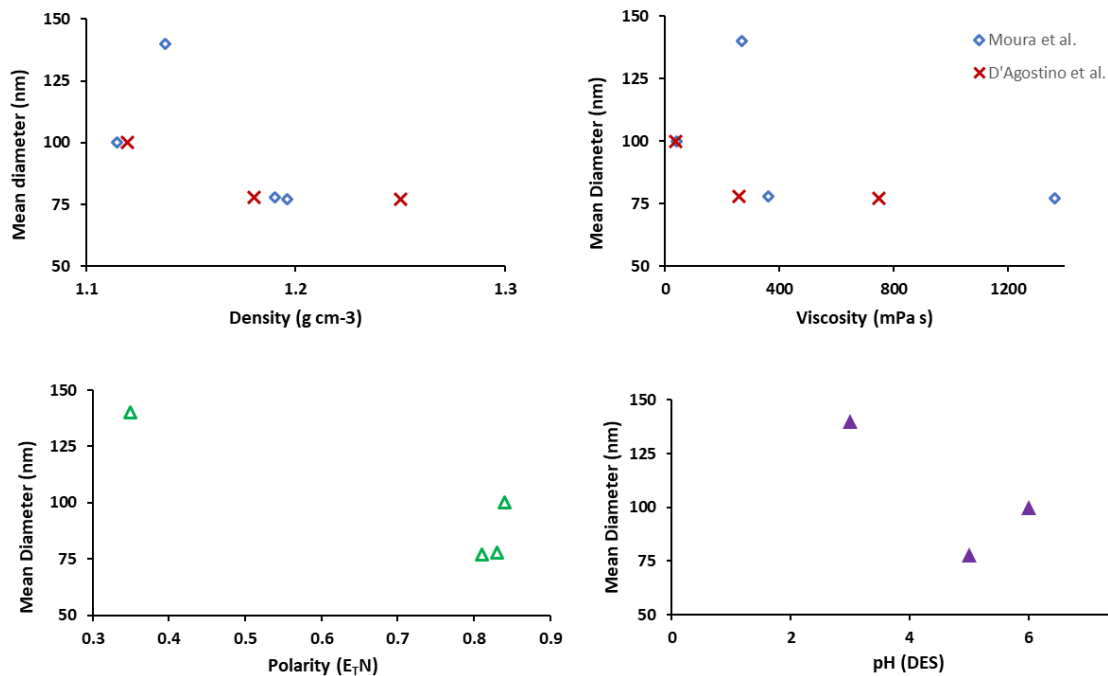


Figure S2. Correlation studies between the density, viscosity, polarity or pH of the studied DES and the mean diameter of the vesicles formed after 48h of the dissolution of E80 phospholipids in DES.

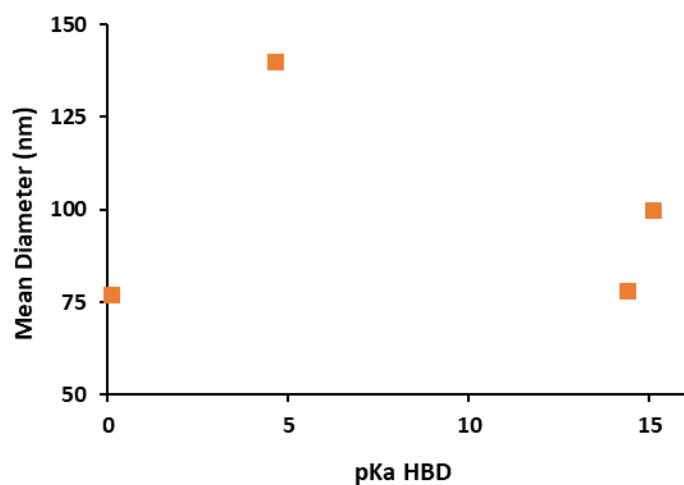


Figure S3. Correlation study between the pKa of the HBD and the mean diameter of the vesicles formed after 48h of the dissolution of E80 phospholipids in DES.

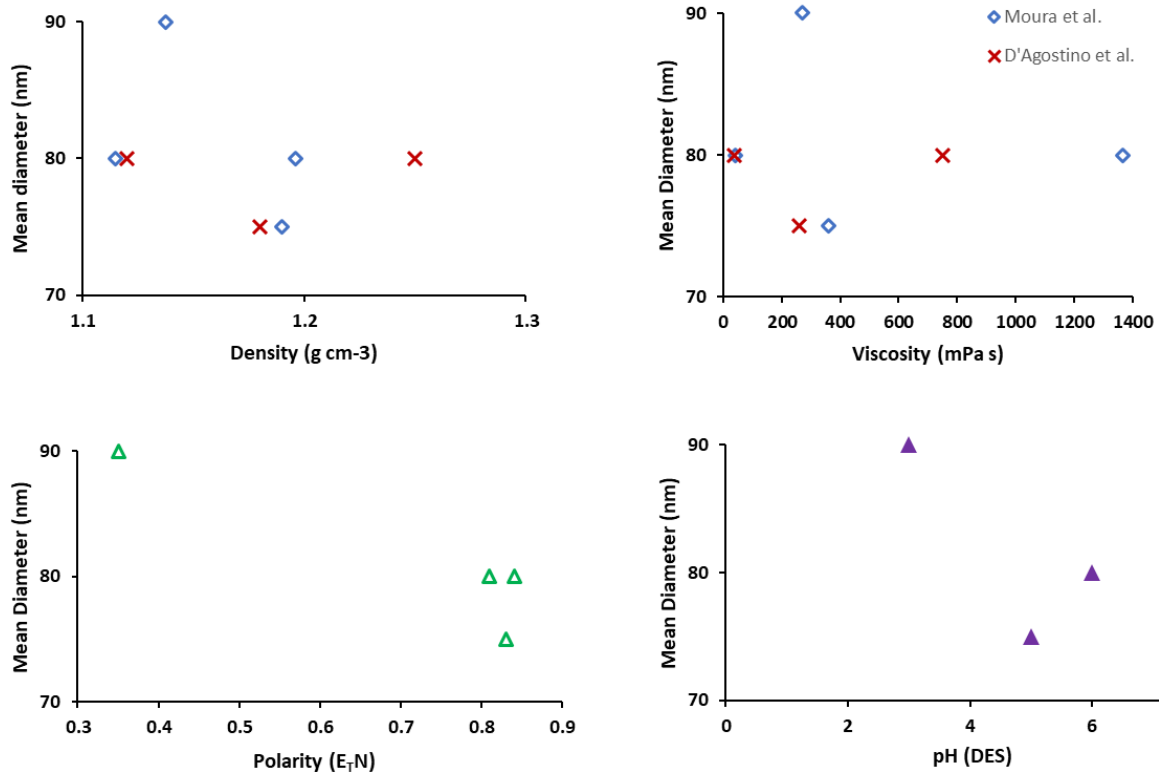


Figure S4. Correlation studies between the density, viscosity, polarity or pH of the studied DES and the mean diameter of preformed E80 liposomes, 48h after their incubation in DES

# Discussion générale et perspectives

L'objectif principal de ce travail de thèse consiste à étudier l'effet des huiles essentielles, en particulier des dérivés de phénylpropanoïdes, des monoterpènes, et des flavonoïdes sur la rigidité et la stabilité des membranes cellulaires. Ces huiles essentielles possèdent plusieurs bénéfices mais leurs propriétés physico-chimiques défavorables limitent leurs applications. L'encapsulation de ces principes actifs dans des liposomes peut être une solution pour franchir ces délimitations. Dans cette étude, nous avons utilisé les liposomes EggPC appelés aussi lipoïde E80, économiques par rapport aux lipides purs, pour des raisons déjà explicitées dans le manuscrit. Lors de l'encapsulation des principes actifs, il est important que la stabilité mécanique et les propriétés élastiques des liposomes soient conservées. L'élasticité des liposomes a une influence sur la taille, la forme, la perméabilité de la membrane et l'efficacité de l'encapsulation des médicaments, ainsi que sur le ciblage vers les tissus.

Malheureusement, les valeurs de l'élasticité rapportées dans la littérature pour les membranes lipidiques sont dispersées, et varient pour la même composition lipidique jusqu'à deux ordres de grandeur, parfois avec la même méthode de mesure.

Ces écarts élevés entre les valeurs de l'élasticité des membranes lipidiques ont constitué un problème au début de notre étude. Il était impossible de définir un intervalle de valeurs pour la rigidité d'une membrane lipidique -comme c'est le cas d'autres tissus ou matériaux- à partir des valeurs mesurées ou calculées dans la littérature. En général les intervalles de rigidité pour les différents matériaux/tissus sont connus (voir Figure 1 pour divers tissus biologiques). Malgré que l'intervalle publié pour les liposomes, varie dans la Figure 1 de 10 à 100 MPa, nous trouvons dans la littérature des valeurs de la rigidité des liposomes inférieures à  $10^1$  ou supérieures à  $100 \text{ MPa}^2$ . A titre d'exemple, pour les liposomes DPPC, Park et al. ont rapporté une valeur de  $81 \text{ MPa}^3$ , inférieure de plus de 25 % et de 60 % aux valeurs obtenues par Delorme et al.<sup>4</sup> et Takechi-Haraya et al.<sup>5</sup> respectivement  $110 \pm 15 \text{ MPa}$  et  $227 \text{ MPa}$ . Pour les liposomes EggPC, nous repérons dans la littérature une série de valeurs allant de 2 jusqu'à  $20 \text{ MPa}^{1,5}$ .

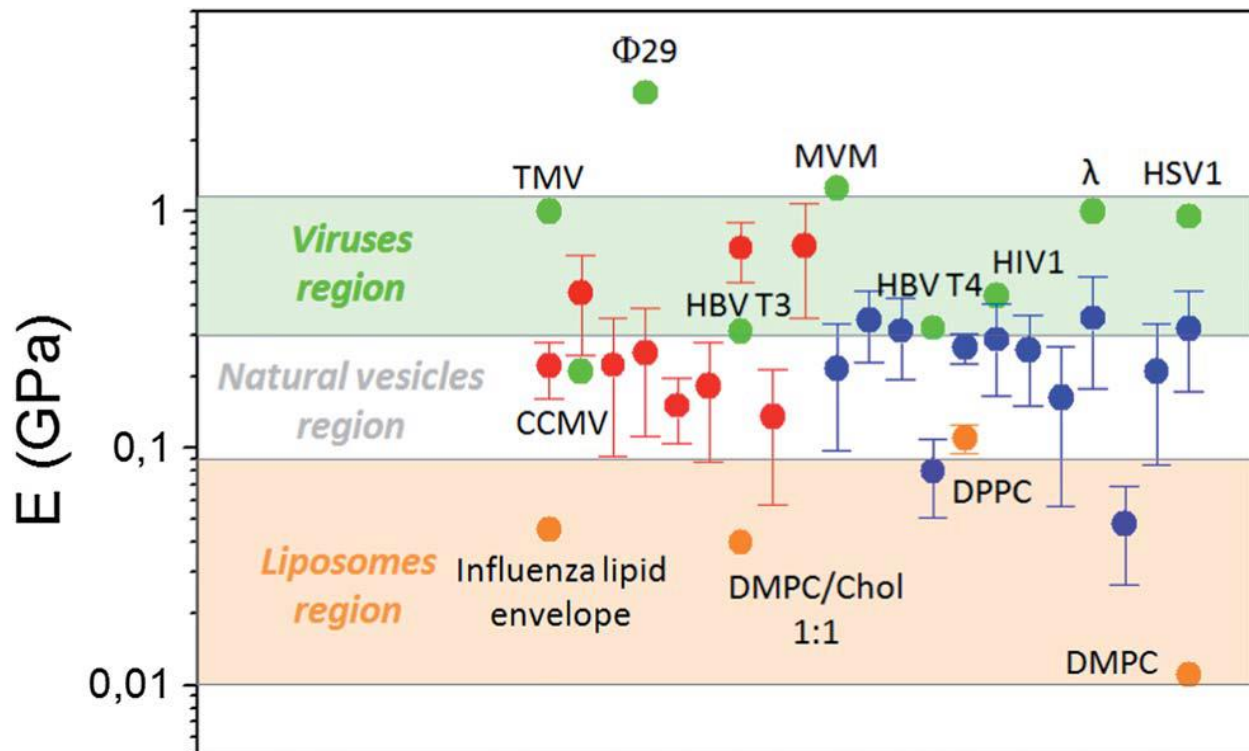


Figure 1 : Module d'Young  $E$  calculé pour des vésicules biologiques. Les données en rouge ou bleu concernent respectivement la fraction plasmique ou interne de la membrane<sup>6</sup>.

Cette diversité dans les valeurs de la rigidité, d'une composition lipidique donnée, a mis la valeur que nous avons obtenue en question aussi. Est-ce que notre mesure est vraie ? Reflète la valeur réelle ? ou les autres valeurs publiées sont les correctes ? En plus, il était impossible pour nous de comparer l'effet des principes actifs sur la rigidité, car la différence entre la rigidité du liposome blanc et celui chargé d'un principe actif, est du même ordre de grandeur des écarts entre les valeurs publiées, et parfois elle est plus petite.

C'est ainsi que nous avons réalisé des mesures expérimentales de la rigidité des liposomes EggPC de même taille, en changeant les conditions initiales de la mesure huit fois. Pareillement, en simulation numérique nous avons utilisé deux méthodes et plusieurs compositions lipidiques, en utilisant le champ de force de MARTINI, pour comprendre les facteurs influant la variation de la rigidité d'une membrane.

Les mesures expérimentales effectuées à l'aide de quatre sondes AFM et deux approches différentes pour le contact pointe-échantillon, montrent que le module d'Young et le module de courbure dépendent fortement de la théorie de contact utilisée. Des différences de 2 à 3 ordres de grandeur sont notées entre les deux approches de contact de Hertz ou de Coque. Des écarts d'un ordre de grandeur sont enregistrés pour le module d'Young en changeant la pointe (forme et constante de force  $k$ ), des écarts encore plus faibles sont notés au niveau du module de courbure. La théorie de contact de coque fournit l'accord le plus étroit entre nos mesures AFM ( $28.3 \pm 8.2k_B T$  ou  $34.8 \pm 8 k_B T$ , respectivement pour une pointe pyramidale ou conique et un levier ayant une constante de force de 0,08 N/m) et d'autres données expérimentales disponibles dans la littérature ( $34k_B T^5$ ), pour le module de courbure de la membrane EggPC. La comparaison avec nos calculs en dynamique moléculaire montrent que les valeurs du module de courbure calculées par la méthode de la déformation de la membrane ( $29 k_B T$ ) sont en bon accord avec les mesures AFM ajustées avec le modèle de Coque. Les travaux mettent en évidence la dépendance de la rigidité, qui est un paramètre propre à la membrane, des conditions expérimentales précises, et du modèle mathématique interprétatif (Hertz ou Shell).

Ainsi, nous avons déduit que les publications basées sur des conditions initiales de mesure ou de calcul différentes, par exemple qui ont utilisé des sondes AFM différentes ou des approches différentes de contact pointe-échantillon, ou des méthodes de simulation différentes ne peuvent pas aboutir à des valeurs identiques de la rigidité pour la même membrane. Cette dernière dépend des conditions de mesure. Une publication récente a introduit un facteur de correction pour obtenir une valeur unifiée de la rigidité intrinsèque d'une membrane, indépendamment de son épaisseur et du substrat auquel il est adsorbé, malheureusement cette correction ne tient pas compte de l'effet de l'apex, de la constante de force ou du modèle de contact<sup>7</sup>. Cependant, nous avons déduit que dans le cas des mêmes conditions de mesure/calcul, la comparaison sera possible, pour mettre en évidence l'effet d'un principe actif.

Le travail que nous avons effectué est original, parmi les mesures AFM, de point de vue de son problématique et de la quantité des courbes de force interprétées. Pour chaque type de sonde, 120 courbes de forces ont été interprétées manuellement par deux approches de contact. Dans les études ultérieures<sup>8,9</sup>, les sondes ont été variées pour mettre en évidence l'effet de leur forme,

leur finesse et leurs constantes de force sur la qualité des images obtenues et la stabilité des échantillons. Aucune étude a été disponible jusqu'à 2019 qui met en évidence ces effets sur la valeur d'une grandeur mécanique quantitative telle que la rigidité<sup>10</sup>.

Il était impossible de démarrer nos mesures AFM de la rigidité d'une membrane lipidique avec ou sans principe actif, sans comprendre l'origine des diverses valeurs de cette grandeur, repérées dans la littérature. Cette diversité a été discutée récemment en 2020, pour des membranes planes non pas pour des vésicules sphériques, par des auteurs qui avaient nos mêmes questionnaires, malheureusement à la fin de cette thèse<sup>10</sup>. Comme nous avons montré, ils ont obtenu que la réponse mécanique des systèmes tels que les bicouches lipidiques supportées (SLB) est fortement affectée par les conditions de mesure AFM. Les auteurs ont prouvé que la valeur du module d'Young augmente avec le rayon de l'apex de la pointe et avec la constante de force.

Les résultats du chapitre 3 peuvent être considérées comme une optimisation standard des conditions expérimentales pour toute mesure de la rigidité des structures lipidiques utilisant l'AFM dans notre groupe, au niveau des caractéristiques de la sonde d'une part (forme de la pointe et constante de force du levier), et du modèle de contact d'un autre part.

Une optimisation similaire est réalisée dans le cas des calculs en dynamique moléculaire utilisant la méthode de flambement. Nous avons évalué la reproductibilité des résultats du module de courbure avec différentes tailles de la boîte de simulation et avec différentes déformations. Nos résultats montrent que les calculs sont reproductibles et comparables aux mesures expérimentales, pour une taille du système égale ou supérieure à un certain seuil, soit environ  $L_x = 32$ ,  $L_y = 8$  et  $L_z = 20$  nm. Les simulations de petits systèmes fournissent des résultats peu fiables, tandis que pour les grands systèmes, le coût de calcul est augmenté sans aucun avantage évident.

Une fois la taille de la boîte de simulation, représentant la membrane, est optimisée, nous avons calculé le module de courbure d'une série de bicouches lipidiques mono-composants : (DLPC, 14:0-14:0), (DPPC, 16:0-16:0), (POPC, 16:0-18:1), (DOPC, 18:1-18:1), (PUPC, 16:0-22:6), (DLiPC, 18:2-18:2), (DNPC, 24:6-24:6), (POPG, 16:0-18:1), (POPS, 16:0-18:1), (POPE, 16:0-18:1) et (DPSM,



16:0-16:0). Nous avons trouvé des valeurs en accord avec celles trouvées dans la littérature. Pour la membrane à base de DPPC, nous avons obtenu un module de courbure de  $(29.8 \pm 1.1 k_B T)$  comparable à la valeur obtenue par d'autres auteurs utilisant la méthode de la déformation de la membrane dans le champ MARTINI  $(32.8 \pm 0.8 k_B T)^{11}$ . La valeur calculée dévie seulement de 5% de la valeur mesurée par les méthodes d'ondulations thermiques  $(28 k_B T)^{12}$ , de spectroscopie de scintillement  $(33.6 k_B T)^{13}$ , et de diffraction des rayons X  $(28.8 \pm 4.5 k_B T)^{14}$ . L'accord est également raisonnable en comparant nos résultats avec ceux obtenus à partir d'autres méthodes de simulation, à savoir les fluctuations d'espace  $(34.1 \pm 1.6 k_B T)^{15}$  et les fluctuations d'orientation des lipides  $(35 \pm 1.1 k_B T)^{16}$ . La comparaison des valeurs des autres membranes avec la littérature est détaillée dans la partie 3.2 du Chapitre 4. Ce travail nous a permis de déterminer la rigidité de plusieurs structures lipidiques. Pour les membranes lipidiques saturées, DPPC et DLPC, la rigidité diminue avec la diminution de la longueur de la chaîne acyle  $(32.8 \pm 0.9 k_B T$  vs  $23.7 \pm 1 k_B T$  pour DPPC et DLPC respectivement). Pour la même longueur de chaîne, la rigidité de la membrane diminue avec l'augmentation du nombre d'insaturations (cas des membranes DOPC et DLiPC). En outre, les lipides avec des chaînes lipidiques non saturées ont un module de courbure inférieure aux lipides avec des chaînes saturées, indépendamment de la longueur de la chaîne. Les bicouches DNPC (24:6-24:6) et PUPC (16:0-22:6) ont enregistré des modules de courbure inférieurs à tous les autres membranes PC étudiées. L'effet d'insaturation semble affecter le module de courbure plus que la longueur de la chaîne acyle.

L'effet du cholestérol sur les modules élastiques des bicouches DPPC et DOPC a été pareillement simulée dans les mêmes conditions de taille et avec la même méthode de flambement. Nous observons que le module de courbure augmente avec l'addition de cholestérol sur les DPPC, et l'augmentation est très significative (100%), de  $30 k_B T$  à  $60 k_B T$  lorsque la concentration molaire de cholestérol atteint 40%. Nos résultats ont montré que l'augmentation de la rigidité est approximativement linéaire avec la concentration du cholestérol. Ces résultats sont en accord avec les données expérimentales de Tierney et al.<sup>17</sup> utilisant la technique d'aspiration par micropipette, avec la seule différence que l'augmentation des valeurs expérimentales de la rigidité atteint un plateau à une concentration de 25%. Pour les DOPC, une augmentation linéaire du module de courbure avec la concentration en cholestérol est aussi notée. Cependant,

l'addition de 40% de cholestérol produit exclusivement une augmentation d'environ 50% dans la valeur du module de courbure. Un effet mineur du cholestérol sur le module de courbure du DOPC est enregistrée expérimentalement<sup>14,18</sup>. L'effet du cholestérol sur la rigidité des membranes est surestimé dans la simulation numérique, cela peut être due à la division du système en gros grains.

Ensuite, nous avons déterminé les modules élastiques pour un nombre de mélanges binaires et ternaires de lipides, avec plusieurs longueurs de chaîne acyles et différents niveaux d'insaturation, tout en utilisant la méthode de flambement. Des calculs du module de courbure ont été réalisés pour les mélanges binaires DLPC:DNPC, DPPC:DLPC, POPC:PUPC, POPC:POPE, DPSM:DLiPC, avec des rapports molaires variables A:B (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 et 0:100) pour chaque mélange. Le même calcul est réalisé pour les mélanges ternaire DPPC:DLiPC:Chol dans les rapports molaires 42:28:30, 61:2:37 et 8:75:17. Nous avons constaté que, dans le cas de mélanges binaires homogènes (DPPC:DLPC, POPC:PUPC, POPC:POPE et DPSM:DLiPC), la valeur du module de courbure peut être prédite à partir de la moyenne pondérée des modules des deux composants A et B. Dans le cas de mélanges présentant une séparation de phases (DLPC :DNPC), le module de courbure obtenu est plus proche de la valeur du composant plus mou (DNPC). Pour les trois mélanges ternaires nous avons effectué les simulations à une température 295 K, et nous avons confirmé, par observation visuelle, que le premier mélange subit une séparation de phase tandis que les deux autres sont homogènes. Il a été prouvé que le mélange ternaire DPPC:DLiPC:Chol avec le rapport molaire 42:28:30 se décompose en une phase liquide ordonnée (Lo) et une phase liquide désordonnée (Ld); la composition de la phase Lo est 61:2:37, et celle de la phase Ld est 8:75:17<sup>19</sup>. La valeur du module de courbure obtenue pour la phase Lo est beaucoup plus élevée que celle pour la phase Ld ( $99 k_B T$  contre  $23,1 k_B T$ ). Remarquablement, la valeur de la rigidité pour le mélange ternaire séparé en deux phases ( $41.7 k_B T$ ) est plus proche de celle pour la phase la plus molle, comme dans le cas des mélanges binaires. Cette déduction pourrait être intéressante pour l'interprétation des résultats expérimentaux. En effet, les domaines ne sont pas toujours résolus optiquement, et il est possible que les faibles valeurs de rigidité de courbure mesurées expérimentalement pour les mélanges de lipides reflètent, comme dans le cas des calculs, la

rigidité du composant le plus mou dans le mélange. Un article publié le 22 septembre 2020 montre la validité de cette prédiction (G. Kelley et al. 2020)<sup>20</sup>. Les auteurs ont montré par la méthode de diffraction des rayons X que la rigidité du mélange formé par DMPC/DLPC n'est pas simplement une quantité additive, et que les membranes mixtes sont plus dynamiques que chaque constituant, ce qui se traduit par une diminution de leur module de courbure, de leur module de compressibilité et de leur viscosité.

Pour plus de précision, nous avons calculé le module de courbure pour toutes les bicouches mono-composants binaires et ternaires, à partir de la méthode des fluctuations de la surface. Cette dernière permet une mesure du module de compressibilité  $K_A$  pour un système de petite taille qui représente la bicouche lipidique. Une relation mathématique simple relie le module de compressibilité  $K_A$  à celui de courbure  $k_c$  sert à cet effet. Les modules de courbure  $k_c$  prédites à partir de la méthode des fluctuations de la surface ne sont pas en bon accord avec ceux obtenus par la méthode de la déformation de la membrane ni avec les mesures ou calculs disponibles dans la littérature, pour la plupart des bicouches étudiées. Nos calculs ont montré que la méthode de la déformation de la membrane est plus descriptive dans le cas de flexion alors que celle des fluctuations de la surface est exclusivement valide pour la simulation de la compressibilité.

Dans les conditions d'optimisation obtenues pour la mesure AFM ainsi que pour la simulation MD, dans le cas des structures lipidiques, l'effet de la quercétine a été mené. Nous avons mesuré précisément en AFM, l'effet de cette molécule sur la rigidité des liposomes EggPC contenant du cholestérol avec un rapport molaire Lipide:Cholestérol :Quercétine 100:55:15. En parallèle, nous avons calculé en MD, l'effet de 4, 8, 12 et 16% de quercétine sur le module de compressibilité du mélange POPC:POPE:Chol considéré dans le rapport molaire 56:9:35, le plus proche à la constitution des liposomes E80.

Nous avons constaté que la valeur moyenne du module d'Young diminue en présence de la quercétine. En effet, le module d'Young  $E$  registre une valeur égale à  $22 \pm 5 \text{ MPa}$  pour des liposomes EggPC blancs, et se réduit à  $15 \pm 4 \text{ MPa}$  pour les EggPC chargés de quercétine. Les simulations MD exécutées ont confirmé que cette molécule rend la membrane plus molle,

augmente la surface par lipide, diminue l'épaisseur de la membrane et augmente le désordre des chaînes acyles. En accord avec ces changements dans les propriétés structurales et dynamiques, le coefficient de diffusion des lipides POPC dans le mélange POPC+POPE+Chol, a augmenté en présence de molécules de quercétine, passant de  $1.58 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  en l'absence de quercétine à  $5.03 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  dans les membranes contenant 16 % de quercétine. Les changements des propriétés structurales, dynamiques et mécaniques sont liés à la localisation de la quercétine dans la membrane qui se situe entre le noyau hydrophobe et la surface polaire de la bicouche lipidique résultant de la nature amphiphile de la quercétine. Les changements structurels ne sont pas détectés par l'imagerie AFM, et aucun effet sur la forme ou les dimensions des liposomes a été enregistré en présence de la quercétine. En simulation ces changements dans la structure peuvent être schématiquement visualisés à l'aide des interfaces de simulations, GROMACS, XMGRACE et VMD. Comme dans le cas de la grandeur mécanique  $K_A$ , les variations structurales sont d'autant plus grandes que le pourcentage de la quercétine augmente.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons observé le comportement des liposomes ou de phospholipides en milieu non aqueux, notamment dans les solvants eutectiques profonds (DES), en utilisant les optimisations déjà enregistrées dans les mesures AFM. Les premières images en présence du DES ont produit un changement structurel évident à l'œil dans la membrane, que ça soit pour les phospholipides ou pour les liposomes EggPC. La stabilité de la membrane EggPC en présence des DESs a été ainsi discutée sans avoir recours aux mesures quantitatives compliquées du module d'Young. La stabilité est un paramètre décisif dans le choix des liposomes. Notre mesure est limitée à l'effet des quatre DESs à base de chlorure de choline suivants : Chlorure de Choline : Urée, Chlorure de Choline : Ethylène glycol, Chlorure de choline : Glycérol, et Chlorure de Choline : Lévulinique acide.

Nous avons observé d'abord l'organisation des phospholipides du type EggPC, en présence de ces quatre DESs. Les observations AFM ont montré que les phospholipides ont été dissous dans les DESs étudiés, convertis en SLB à  $t = 4\text{h}$ , puis construits en vésicules à  $t = 24\text{h}$ . Cependant, la formation de liposomes était plus rapide dans le cas du ChCl:Lev que dans le cas des autres DESs. La dissolution et l'organisation des molécules lipidiques dans le DES pourraient s'expliquer par une association entre le chlorure et le groupe ammonium quaternaire des phospholipides et

entre la choline du sel des DESs et le groupe phosphate des phospholipides. Les images AFM ont montré que lorsque le HBD (donneurs des liaisons d'hydrogènes) est moins hydrophile, le diamètre moyen des vésicules formées après 48h est plus grand. Un composé hydrophobe tel que le ChCl:Lev, donne naissance à un DES relativement hydrophobe, qui entraîne probablement la dissolution plus rapide des fragments de la membrane.

Les observation AFM ne sont pas limitées aux phospholipides dans les quatre DESs, mais ont été étendues pour visualiser le comportement des liposomes EggPC dans ces solvants, ou dans des solutions formées des composants de ces solvants. Les vésicules EggPC ont montré des variations dans leurs dimensions et dans la distribution sur la surface du mica, lorsqu'elles ont été exposées au DES ou incubés dans des solutions aqueuses des composants du DES, pendant 30 minutes. La réduction de la taille des vésicules, dans ces deux derniers cas, peut s'expliquer par le phénomène d'osmose. Étant donné que les liposomes sont préparés dans l'eau par la méthode d'injection d'éthanol, les structures lipidiques consistent en une cavité aqueuse interne entourée de bicouches lipidiques. Alors, en présence du DES ou de solutions aqueuses des composants du DES, les molécules d'eau internes ont tendance à migrer à travers la membrane semi-perméable. Comme dans le cas des phospholipides et pour les mêmes raisons, les liposomes exposés au ChCl:Lev, ont montré d'une manière évidente dans le images AFM, une agrégation des liposomes et/ou une conversion en bicouches lipidiques (SLB).

Le comportement des liposomes dans les deux cas de l'addition des DESs ou de l'incubation dans des solutions aqueuses à base des composants des DESs, a été suivi dans le temps. Les images AFM ont montré qu'en présence des DESs et après 2h, les feuilles de mica étaient complètement recouvertes de SLBs. Ces dernières n'étaient pas stables et se transformaient en vésicules après 24 heures, en raison de l'encapsulation du solvant par les bicouches lipidiques. Cette observation n'est pas détectée en présence de la solution aqueuse des composants des DESs. Les liposomes dans ces derniers subissent justement une réduction dans leurs dimensions 1h après incubation.

# Perspectives

Ce travail focalisé sur les membranes lipidiques, diversifié dans ses orientations, ouvre des horizons envers plusieurs axes de recherche.

L'interprétation des écarts entre les valeurs du module d'élasticité des liposomes ou des membranes lipidiques, permet aux chercheurs de poursuivre leurs recherches pour déterminer des termes de correction relatifs aux paramètres étudiés. Ce qui permettra de fournir une valeur unique pour un module d'élasticité d'une membrane, quel que soient les conditions de mesure ou la méthode de quantification utilisée.

Les calculs de simulation MD ont fourni une base de données importantes pour tous les chercheurs dans le domaine des membranes lipidiques. La disponibilité de la rigidité d'une série de membranes lipidiques mono-composantes, binaires et ternaires dans des rapports molaires définis, permettra dans la suite de repérer l'effet de l'addition de diverses traces lipidiques ou d'autres additifs sur le comportement élastique de cette membrane.

La méthode de flambement, utilisée pour la mesure du module de courbure de macromolécules, a été optimisée pour le traitement de bicouches lipidiques, quelque soit leur composition, tout en minimisant le coût de calcul et conservant la fiabilité des valeurs.

La description quantitative de l'effet de la quercétine sur les liposomes EggPC, ou sur la membrane lipidique ayant la même constitution, ouvre la porte à des mesures quantitatives similaires décrivant l'effet d'une série de flavonoïdes ou d'autres principes actifs sur l'état mécanique des liposomes, ou sur des structures complexes à base de liposomes. Ceci peut être réalisé avec les mêmes conditions de mesure ou de calcul déjà adaptés dans le cas de la molécule quercétine. Notre groupe de recherche est intrigué à déterminer l'effet des dérivés monoterpènes (l'eucalyptol, le terpinéol, le thymol et le pulégone) et des phénylpropanoïdes (l'eugénol, l'isoeugénol, le trans-anéthol et l'estragol) sur la rigidité de différentes structures lipidiques.

Le comportement, observé en AFM, des lipoïdes E80 à l'intérieur des DESs à base de chlorure de choline, nous mène à étudier par la même méthode, le comportement d'autres compositions ou

structures lipidiques dans ces solvants. En addition des observations AFM, et par analogie au cas de la quercétine, l'AFM permet une quantification de la rigidité des liposomes reformés à l'intérieur des DESs étudiés ou tous les autres DESs.

Comme des systèmes dissolvants d'une part, et des milieux prouvant dans cette thèse la stabilité des liposomes d'autre part, les DESs peuvent être utilisés comme solubilisant de principes actifs encapsulés dans des systèmes liposomiaux simples ou hybrides. La mesure de la rigidité, telle qu'elle optimisée dans ce travail, peut être un facteur déterminant dans la construction de telles structures.

- (1) 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* (1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.042>.
- (2) Et-Thakafy, O.; Delorme, N.; Gaillard, C.; Mériadec, C.; Artzner, F.; Lopez, C.; Guyomarc'h, F. Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy. *Langmuir* **2017**, *33* (21), 5117–5126. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00363>.
- (3) Park, J.-W. Effect of Aminoglycoside on Mechanical Properties of Zwitterionic Phospholipid Vesicles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2011**, *88*, 517–520. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.046>.
- (4) Delorme, N.; Fery, A. Direct Method to Study Membrane Rigidity of Small Vesicles Based on Atomic Force Microscope Force Spectroscopy. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **2006**, *74* (3 Pt 1), 030901. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.030901>.
- (5) Takechi-Haraya, Y.; Sakai-Kato, K.; Abe, Y.; Kawanishi, T.; Okuda, H.; Goda, Y. Atomic Force Microscopic Analysis of the Effect of Lipid Composition on Liposome Membrane Rigidity. *Langmuir* **2016**, *32* (24), 6074–6082. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00741>.
- (6) 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* (4), 2275–2285. <https://doi.org/10.1039/C3NR05107B>.
- (7) Chiodini, S.; Ruiz-Rincón, S.; Garcia, P. D.; Martin, S.; Kettelhoit, K.; Armenia, I.; Werz, D. B.; Cea, P. Bottom Effect in Atomic Force Microscopy Nanomechanics. *Small* **2020**, *16* (35), 2000269. <https://doi.org/10.1002/sml.202000269>.
- (8) Chen, Y.; Cai, J.; Liu, M.; Zeng, G.; Feng, Q.; Chen, Z. Research on Double-Probe, Double- and Triple-Tip Effects during Atomic Force Microscopy Scanning. *Scanning* **2004**, *26* (4), 155–161.
- (9) Zavedeev, E. V.; Jaeggi, B.; Zuercher, J.; Neuenschwander, B.; Zilova, O. S.; Shupegin, M. L.; Presniakov, M. Yu.; Pimenov, S. M. Effects of AFM Tip Wear on Frictional Images of

- Laser-Patterned Diamond-like Nanocomposite Films. *Wear* **2018**, 416–417, 1–5.  
<https://doi.org/10.1016/j.wear.2018.09.008>.
- (10) Saavedra V., O.; Fernandes, T. F. D.; Milhiet, P.-E.; Costa, L. Compression, Rupture, and Puncture of Model Membranes at the Molecular Scale. *Langmuir* **2020**, 36 (21), 5709–5716. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00247>.
  - (11) Bochicchio, D.; Monticelli, L. The Membrane Bending Modulus in Experiments and Simulations: A Puzzling Picture. In *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*; 2016; Vol. 23, pp 117–143. <https://doi.org/10.1016/bs.abl.2016.01.003>.
  - (12) Levine, Z. A.; Venable, R. M.; Watson, M. C.; Lerner, M. G.; Shea, J.-E.; Pastor, R. W.; Brown, F. L. H. Determination of Biomembrane Bending Moduli in Fully Atomistic Simulations. *J Am Chem Soc* **2014**, 136 (39), 13582–13585.  
<https://doi.org/10.1021/ja507910r>.
  - (13) Mell, M.; Moleiro, L. H.; Hertle, Y.; Fouquet, P.; Schweins, R.; López-Montero, I.; Hellweg, T.; Monroy, F. Bending Stiffness of Biological Membranes: What Can Be Measured by Neutron Spin Echo? *Eur Phys J E Soft Matter* **2013**, 36 (7), 75.  
<https://doi.org/10.1140/epje/i2013-13075-2>.
  - (14) Nagle, J. F. Experimentally Determined Tilt and Bending Moduli of Single-Component Lipid Bilayers. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, 205, 18–24.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.006>.
  - (15) Doktorova, M.; Harries, D.; Khelashvili, G. Determination of Bending Rigidity and Tilt Modulus of Lipid Membranes from Real-Space Fluctuation Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19 (25), 16806–16818.  
<https://doi.org/10.1039/C7CP01921A>.
  - (16) Watson, M. C.; Brandt, E. G.; Welch, P. M.; Brown, F. L. H. Determining Biomembrane Bending Rigidities from Simulations of Modest Size. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, 109 (2), 028102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.028102>.
  - (17) Tierney, K. J.; Block, D. E.; Longo, M. L. Elasticity and Phase Behavior of DPPC Membrane Modulated by Cholesterol, Ergosterol, and Ethanol. *Biophys J* **2005**, 89 (4), 2481–2493.  
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.057943>.
  - (18) Gracià, R. S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R. L.; Lipowsky, R.; Dimova, R. Effect of Cholesterol on the Rigidity of Saturated and Unsaturated Membranes: Fluctuation and Electrodeformation Analysis of Giant Vesicles. *Soft Matter* **2010**, 6 (7), 1472–1482.  
<https://doi.org/10.1039/B920629A>.
  - (19) Barnoud, J.; Rossi, G.; Marrink, S. J.; Monticelli, L. Hydrophobic Compounds Reshape Membrane Domains. *PLOS Computational Biology* **2014**, 10 (10), e1003873.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003873>.
  - (20) Kelley, E. G.; Butler, P. D.; Ashkar, R.; Bradbury, R.; Nagao, M. Scaling Relationships for the Elastic Moduli and Viscosity of Mixed Lipid Membranes. *PNAS* **2020**, 117 (38), 23365–23373. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008789117>.