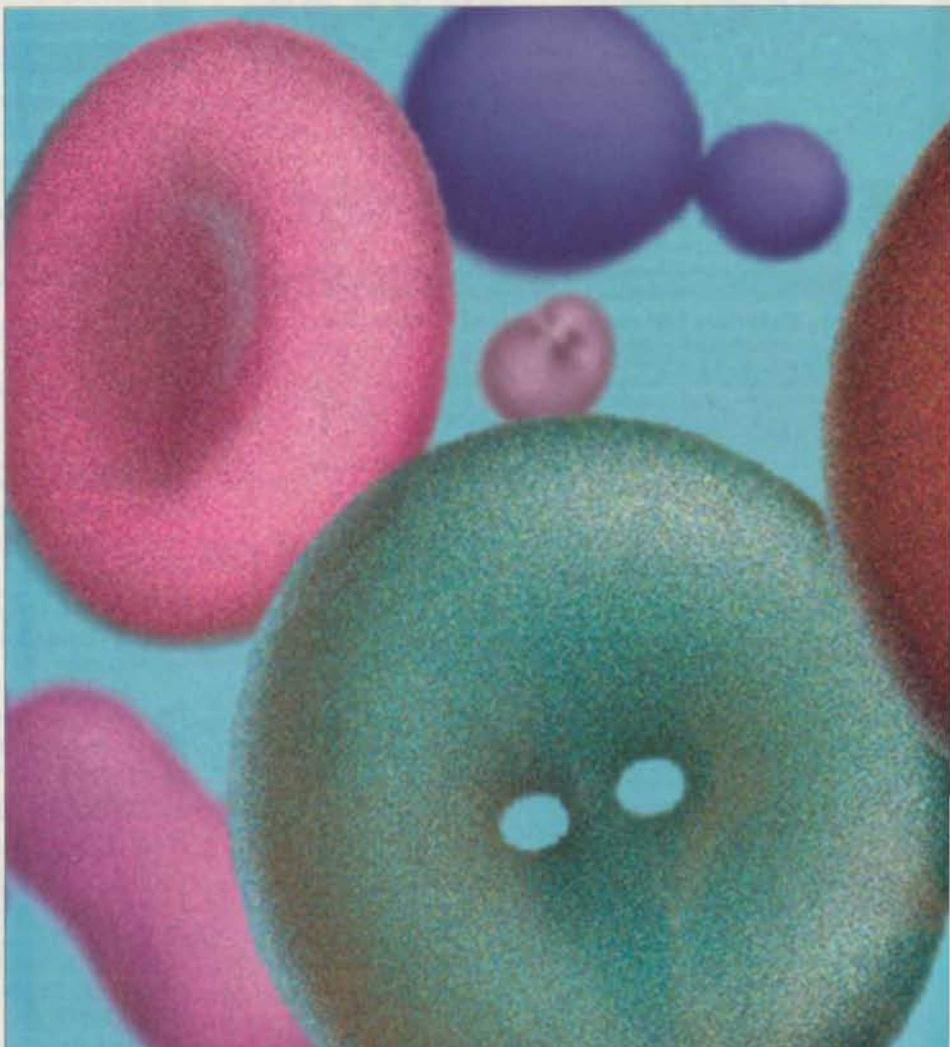
LA PHYSIQUE DES LIPOSOMES

XAVIER MICHALET, FRANK JÜLICHER, BERTRAND FOURCADE, UDO SEIFERT ET DAVID BENSIMON

Les liposomes ont acquis leur renommée surtout grâce à certains produits cosmétiques ou à leur utilisation possible pour transporter des médicaments. Mais ces minuscules vésicules bien flasques, dont la membrane est une double couche de molécules lipidiques, constituent aussi un système modèle pour la physique des membranes fluides, voire celle des membranes biologiques. En particulier, les chercheurs s'intéressent beaucoup à la morphologie des liposomes, lesquels peuvent ressembler à une poire, à un anneau, à un bouton à deux trous, passer d'une forme à l'autre, fusionner ou se scinder, etc. Comment est déterminée la géométrie des liposomes, quelles sont les formes et les métamorphoses possibles, telles sont quelques-unes des questions auxquelles les physiciens ont réussi à répondre ces dernières années.



Il y a un peu plus d'un siècle, en observant au microscope des globules rouges, le biologiste E. Browicz remarqua que l'intensité lumineuse diffusée par une telle cellule varie de façon erratique d'un point à l'autre de la membrane, provoquant une impression de scintillement[1]. Avec l'avènement du microscope à contraste de phase inventé par le Hollandais F. Zernicke — et pour lequel il reçut le prix Nobel en 1953 —, on s'aperçut que ces variations d'intensité sont dues à de petits mouvements rapides de la membrane cellulaire. Mais l'origine de ces mouvements est restée mystérieuse jusqu'en 1975, date à laquelle deux physiciens français, Françoise Brochard et Jean-François Lennon, ont pu montrer qu'il s'agissait d'un simple mouvement d'agitation thermique spontané de la membrane, ne nécessitant aucune activité biologique spécifique[2]. Ainsi, certaines propriétés des membranes biologiques, malgré la grande complexité biochimique de ces structures, ne font intervenir que des mécanismes physiques. Sans pour autant aller jusqu'aux cellules vivantes, les efforts de ces vingt dernières années ont permis aux physiciens de la « matière molle » de comprendre les propriétés d'objets que l'on peut qualifier de lointains cousins des globules rouges, les liposomes[3]. Un liposome, ou vésicule, est un « sac » de taille microscopique, formé d'une double couche de molécules dites amphiphiles faisant office de membrane (fig. 1). Les liposomes font l'objet d'études aux motivations diverses. Pour le grand public, ces objets sont surtout connus à travers leur emploi dans les produits cosmétiques. De fait, les liposomes intéressent beaucoup les laboratoires de pharmacologie, de biologie cellulaire, de chimie, car ils sont capables d'enfermer en leur sein le solvant dans lequel ils ont été préparés (voir « Les liposomes » dans *La Recherche* de juillet-août 1989). Leur utilisation comme transporteurs de médicaments au sein du circuit sanguin, ou encore pour véhiculer des catalyseurs chimiques, est donc sérieusement envisagée. Ces applications représentent un aspect important, mais les liposomes intéressent aussi les chercheurs d'un point de vue fondamental. Ce sont en effet des systèmes modèles de la physique des membranes fluides, un domaine particulièrement actif de nos jours et qui étudie les édifices que les membranes peuvent construire, leur stabilité, leur dynamique, etc. En ce qui concerne les vésicules, il y a eu ces dernières années de nombreux progrès, relatifs en particulier à la connaissance et à la compréhension de leur morphologie. Pour cela, les chercheurs font bien sûr appel aux méthodes de la physico-chimie, mais aussi, de façon plus surprenante, à des outils théoriques que l'on retrouve dans certaines problématiques modernes des mathématiques. A ce titre, la physique des liposomes a une parenté avec celle des émulsions, celle des interfaces entre fluides, celle des cristaux liquides et même celle de... la gravitation quantique !

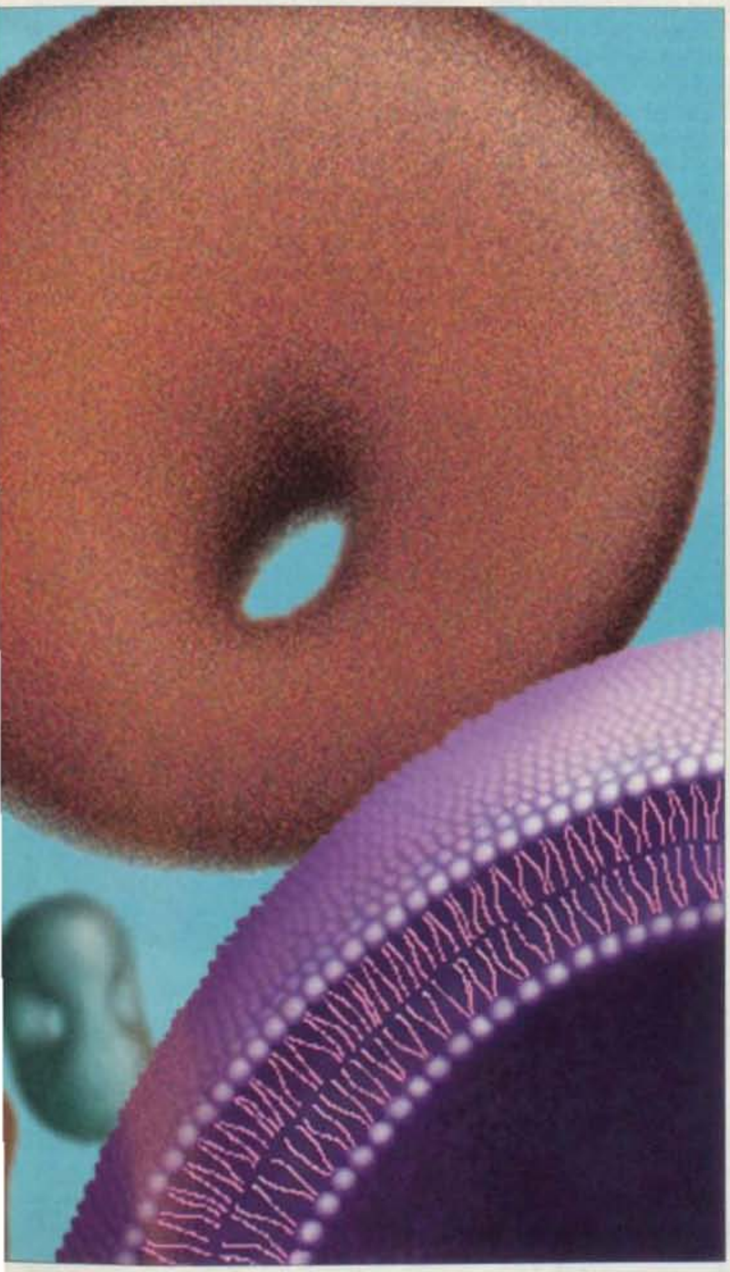


Figure 1. Les liposomes sont de petits sacs flasques, dont la taille peut aller de quelques dixièmes à quelques dizaines de micromètres, qui rentrent notamment dans la composition de certains produits cosmétiques. Ils se forment spontanément lorsqu'on dilue des molécules lipidiques dans l'eau. Une telle molécule est amphiphile, c'est-à-dire qu'elle comporte une « tête » hydrophile et une ou plusieurs « queues » hydrophobes. Ces molécules s'associent alors pour former une membrane, épaisse de quelques nanomètres, constituée de deux couches accolées, les « têtes » hydrophiles étant au contact de l'eau tandis que les « queues » en sont isolées. Systèmes modèles de la physique des membranes fluides, les liposomes suscitent l'intérêt des chercheurs en particulier dans le but de comprendre leurs morphologies possibles. Cet aspect de leur étude a beaucoup progressé ces dernières années.

Qu'est-ce qu'un liposome plus précisément ? La paroi de ces « cellules modèles » est constituée de deux couches accolées de lipides membranaires, des molécules longues de 15 à 30 angströms (1 Å = 10^{-10} m) que l'on rencontre également dans toutes les cellules vivantes (fig. 1). Différents lipides, naturels ou artificiels, sont employés suivant l'utilisation envisagée des liposomes (innocuité vis-à-vis de l'organisme, recyclabilité, coût de production, etc.). Les expériences que nous évoquerons portent sur des « phospholipides », qui constituent la famille la plus abondante dans le vivant. Mais il s'avère que la formule chimique des lipides n'a presque aucune incidence sur les comportements morphologiques dont nous allons parler.

Comment obtenir des liposomes et comment les observer ? Pour les produire, c'est très simple : ils se forment spontanément lorsqu'on essaie de diluer des lipides membranaires dans l'eau. Cette propriété est due à la nature amphiphile des molécules phospholipidiques : elles comportent une « tête » assez large ayant tendance à se rapprocher de molécules d'eau, tandis qu'à cette tête hydrophile se raccrochent une ou deux « queues » hydrophobes qui possèdent l'affinité inverse. Pour de telles molécules, une façon de satisfaire ces tendances antagonistes est de se rassembler en une double couche où les queues sont prises en sandwich et isolées de l'eau par les têtes. La membrane d'environ 50 Å d'épaisseur ainsi formée peut alors se refermer sur elle-même pour former une « vésicule », sorte de petit sac flasque de quelques micromètres de rayon en moyenne, isolant ainsi un petit volume d'eau du milieu environnant.

Etant donné l'extrême minceur de leur membrane, les vésicules sont presque invisibles au microscope optique usuel. Cependant, les ondes lumineuses subissent un déphasage lorsqu'elles traversent la membrane, déphasage d'autant plus important que l'épaisseur de matière rencontrée l'est. Le contour des liposomes est donc bien visible au microscope à contraste de phase, qui exploite le déphasage lumineux pour former l'image. En observant la même vésicule sous différents angles (dans la solution aqueuse, elle est toujours animée d'un mouvement erratique de translation et de rotation), on peut alors reconstituer sa forme dans l'espace.

Voyons à présent quelles caractéristiques influencent la forme des liposomes. Une propriété essentielle de la bicouche formant la paroi des liposomes est sa fluidité. Cela signifie que la membrane peut être vue comme un fluide visqueux de deux épaisseurs moléculaires, entouré d'eau. En particulier, la membrane peut, à la différence d'un solide, se cisailler sans effort aucun.

En dépit de cette fluidité, les vésicules sont très résistantes ; on peut, par

XAVIER MICHALET travaille avec **DAVID BENSIMON**, directeur de recherche au CNRS, au laboratoire de physique statistique de l'Ecole normale supérieure, à Paris.
FRANK JÜLICHER travaille avec **UDO SEIFERT**, chargé de recherche à l'Institut de physique du solide de Jülich, en Allemagne.
BERTRAND FOURCADE est maître de conférence à l'université Joseph Fourier de Grenoble.

exemple, les observer durant plusieurs jours sans noter le moindre changement. Mesurer la résistance des liposomes à l'étirement — leur compressibilité — est ce qu'ont fait dans les années 1980 E. Evans et ses collègues à l'université de Colombie Britannique, à Vancouver[4]. Pour cela, ils utilisaient une micropipette dont le diamètre intérieur n'est que de quelques micromètres, avec laquelle on aspire partiellement une vésicule d'une vingtaine de micromètres de diamètre. Au fur et à mesure qu'augmente la dépression dans la micropipette (donc la surpression dans le liposome), la membrane pénètre dans celle-ci, et l'ensemble du liposome perd son caractère flasque. La membrane finit par se tendre, jusqu'au point où son aire totale commence à augmenter. C'est la mesure de cette dilatation en fonction de la tension exercée sur la membrane qui permet de déterminer la résistance des liposomes à l'étirement.

Cette résistance s'avère très grande et en pratique, une vésicule libre dans l'eau n'est jamais soumise à des tensions suffisantes pour être étirée. La membrane peut donc être considérée comme incompressible. Son aire reste donc constante, une propriété fondamentale pour comprendre les formes des liposomes. Quant au volume du liposome, qui est le volume d'eau qu'il enclôt, il reste également fixe, aucun échange n'ayant lieu, en moyenne, à travers la membrane.

Comment caractériser la membrane des liposomes si les cisaillements ne nécessitent aucun effort du fait de la fluidité et qu'il est exclu de voir la surface s'étirer ? On doit aux Américains P.B. Canham et E. Evans ainsi qu'à l'Allemand W. Helfrich d'avoir, au début des années 1970, répondu à cette question cruciale pour comprendre la morphologie des liposomes[5]. Ces chercheurs ont montré que les seules déformations à envisager sont les modifications de courbure. La membrane réagit à un effort de flexion comme le ferait n'importe quel matériau élastique. Plus la membrane est courbée, plus l'énergie élastique emmagasinée est élevée. L'énergie élastique de courbure est donc directement reliée à la forme géométrique du liposome. Elle dépend aussi de sa composition, de même que la raideur d'un ressort dépend du matériau qui le compose. Or de nombreuses équipes de par le monde ont mesuré cette élasticité pour toutes sortes de phospholipides, par des techniques diverses : ces membranes sont les plus souples des matériaux connus. Cette extrême souplesse se traduit par des ondulations spontanées de la surface des vésicules, tout à fait analogues à celles observées sur les globules rouges : le choc incessant des molécules d'eau sur la membrane suffit à exciter ces ondulations, un peu comme des gouttes de pluie font vibrer la membrane d'un tambour (à la différence que cette dernière est tendue !)[6].

Comment déterminer *a priori* la forme adoptée par les liposomes à l'équilibre mécanique, qui est atteint quelques minutes après leur naissance ? On pourrait penser que la forme finale résulte de deux contraintes[7]. La première est la constance de l'aire et du volume, dont les valeurs initiales sont fixées au hasard lors de la formation des liposomes. La deuxième contrainte est liée à l'énergie de courbure : celle-ci devrait être la plus basse possible (à l'équilibre mécanique, l'énergie potentielle doit être minimale). Cependant, il existe une troisième contrainte : étant donné la courbure de la vésicule, la monocouche intérieure de la membrane a une aire légèrement plus faible que la monocouche extérieure. Autrement dit, il faut un peu moins de molécules pour tapisser l'intérieur du liposome que l'extérieur. Cette petite différence, que nous appellerons asymétrie géométrique, est fixée aléatoirement au moment où le liposome se forme, et ne change plus par la suite. En effet, pour qu'une molécule passe d'une monocouche à l'autre, il faudrait qu'elle puisse se retourner, privant un moment la tête hydrophile de son environnement aqueux ; cela représente une barrière d'énergie à surmonter et le processus est par conséquent peu fréquent.

Figure 2. Quelles sont les lois qui déterminent les formes stables que peuvent adopter les liposomes ? Les théoriciens ont établi un modèle satisfaisant, stipulant que la forme d'équilibre d'un liposome est la surface dont l'énergie élastique due à la courbure est la plus faible possible, avec la contrainte que l'aire, le volume et l'« asymétrie » du liposome aient des valeurs constantes, celles fixées lors de sa formation. L'« asymétrie » est la différence entre le nombre de molécules de la couche externe de la membrane et celui des molécules de la couche interne. Pour chaque topologie considérée, les formes prédites sont caractérisées par deux paramètres géométriques (le « volume réduit » et l'asymétrie). Cette figure montre quatre exemples de formes d'équilibre pour des liposomes ayant la même topologie que la sphère : forme oblongue (A), en discocyte (B), en stomatocyte (C) et en poire (D). (Modélisation par F. Jülicher et V. Seifert)

En minimisant l'énergie de courbure pour une aire, un volume et une asymétrie géométrique fixés, plusieurs équipes sont parvenues vers 1990 à obtenir par le calcul toutes les formes d'équilibre observées chez les liposomes[8]. A une réserve près, à savoir qu'il s'agissait des formes de même topologie que la sphère, c'est-à-dire des surfaces qui, telles la surface d'un ballon de rugby ou celle d'une poire, peuvent se ramener à une sphère grâce à des déformations continues. Parmi les formes d'équilibre ainsi trouvées, il y a par exemple le « discocyte », c'est-à-dire la forme biconcave des globules rouges humains (fig. 2).

Ce succès de la théorie « à l'équilibre mécanique » a conduit les physiciens à étudier comment et à quelles conditions un liposome passe d'une forme à une autre. Un changement de température est un exemple simple d'une cause possible de transformation. Pourquoi ? Comme toute matière, l'eau, mais aussi la membrane phospholipidique, se dilate en général quand la température augmente. Or il se trouve que la variation relative de volume de l'eau est négligeable par rapport à la variation relative d'aire de la membrane. Aussi, lorsqu'on chauffe la solution de quelques degrés, le volume du liposome ne change pratiquement pas, contrairement à son aire. Par ce moyen, on peut contrôler avec précision le *degré de gonflement* de la vésicule, c'est-à-dire le rapport volume/aire (bien que l'asymétrie change aussi un peu).

Que se passe-t-il dans cette situation ? Le liposome adopte très vite la forme dont l'énergie de courbure est minimale et qui correspond aux nouvelles caractéristiques géométriques[9]. En faisant varier la température, on a ainsi pu comparer les évolutions de liposomes telles qu'elles sont prédites par le calcul et telles qu'elles sont observées en laboratoire. Un exemple est le phénomène de bourgeonnement d'une vésicule « fille » à partir de la vésicule « mère » initiale, examiné en 1991 par J. Käs et E. Sackmann, de l'université technique de Munich[10] (fig. 3). Partant d'un liposome ellipsoïdal, ils ont progressivement augmenté la température de la solution, provoquant ainsi la dilatation de la bicouche. Les photographies du liposome, montrant la formation d'un bourgeon rattaché par un minuscule col, correspondent bien à ce que prévoyaient les calculs faits par divers chercheurs à la fin des années 1980, notamment par deux d'entre nous (B. Fourcade et U. Seifert).

Il est possible d'induire des changements de forme des liposomes par bien d'autres moyens que les changements de température. Le plus simple consiste à former des vésicules en solution salée (ou contenant tout autre soluté — sucre, protéine, etc.). Lorsqu'on rajoute ensuite de l'eau à la solution dans laquelle baignent les vésicules, la concentration en sel diminue immédiatement à l'extérieur. Pour annuler la pression osmotique ainsi créée entre l'intérieur (concentré) des liposomes et le milieu extérieur (dilué), l'eau pénètre lentement à travers la membrane, jusqu'à l'équilibre des concentrations. Ce qui a pour résultat d'augmenter le degré de gonflement des liposomes, et donc de provoquer un changement de forme, pouvant aller jusqu'à l'éclatement.

Un autre type d'expérience, plus délicat à quantifier, consiste à changer l'asymétrie de la membrane plutôt que son degré de gonflement, l'asymétrie étant, rappelons-le, la différence entre le nombre de molécules de la monocouche externe et celui de la monocouche interne. En 1991, E. Farge et P. Devaux, à l'Institut de biologie physico-chimique de Paris, ont ainsi modifié l'aire de la monocouche extérieure de leurs vésicules, en apportant à l'aide d'une micropipette un phospholipide qui s'incorpore aisément à la membrane, provoquant un changement de forme[11].

En résumé, ces expériences montrent et confirment que la morphologie des liposomes à l'équilibre est essentiellement régie par deux contraintes géométriques (la constance du degré de gonflement et de l'asymétrie) et par l'exigence d'une énergie de courbure minimale. Celle-ci constitue d'ailleurs l'une des originalités des liposomes par rapport à d'autres systèmes de membranes fluides : pour les bulles de savon, par exemple, c'est la formation d'une interface membrane-aire qui a un coût énergétique, et c'est donc l'aire du film de savon, et non pas son énergie de courbure, qui est minimale à l'équilibre.

Jusqu'ici, nous n'avons en fait considéré que des liposomes dont la forme est topologiquement équivalente à une sphère. Mais il est possible d'imaginer des surfaces radicalement différentes, et c'est alors que la morphologie des vésicules se révèle dans toute sa richesse, et que des résultats issus des mathématiques contemporaines font leur entrée (fig. 4 et 5).

A

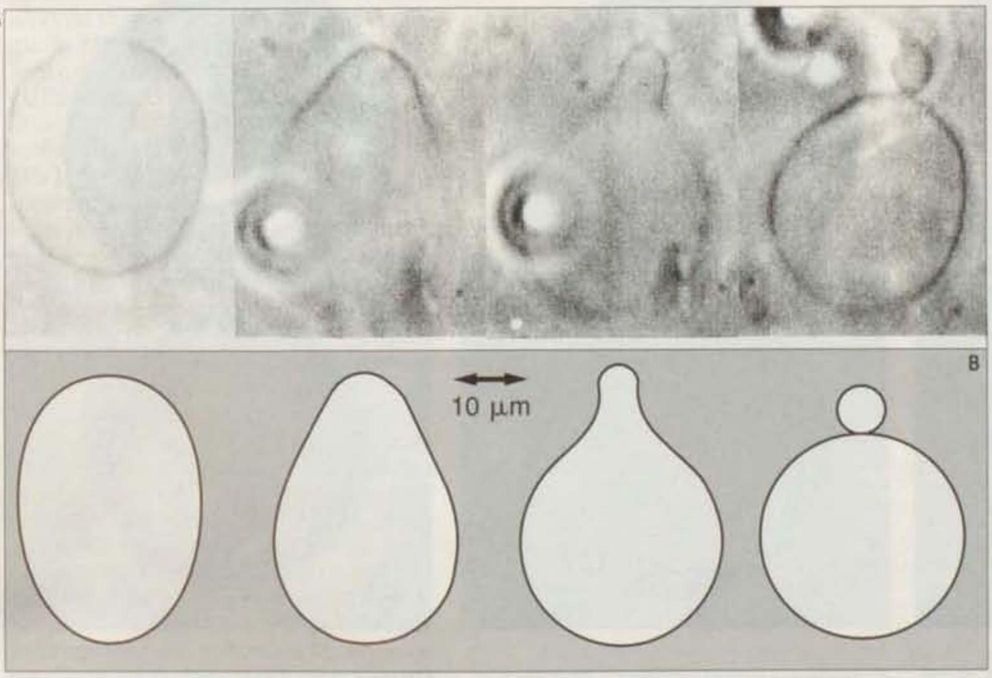


Figure 3. Il est possible de modifier la forme d'un liposome en changeant la température. L'expérience réalisée par Josef Käs de l'université technique de Munich consiste à augmenter progressivement la température d'une vésicule oblongue (A). Ce faisant, la membrane de la vésicule se dilate, tandis que le volume d'eau qu'elle enclôt reste constant. Ces changements entraînent une évolution de la forme, qui se poursuit jusqu'à obtenir deux liposomes reliés par un « col » de taille submicroscopique. Le fait qu'il subsiste une connexion entre les deux vésicules est mis en évidence en refroidissant la solution : le col s'élargit à nouveau, et la vésicule fille est réabsorbée par la vésicule mère. En B sont présentés les résultats de calculs théoriques portant sur une même modification de la température, résultats qui sont en très bon accord avec les observations au microscope. (A : clichés J. Käs et E. Sackmann ; B : U. Seifert)

La première surface à laquelle on songe et qui ne ressemble pas à une sphère est le tore, c'est-à-dire la surface d'un anneau circulaire. Un tore peut être au mieux déformé continûment en une sphère sur laquelle est greffée une petite anse. Il est en effet impossible de faire disparaître le trou sans déchirer la surface. Ces surfaces sont dites de « genre topologique 1 », le « 1 » correspondant au nombre d'anses qu'il faut rajouter à la sphère pour obtenir une surface équivalente.

Peut-il exister, à l'équilibre, des liposomes de genre torique ? La réponse, positive, a été apportée sur un plan théorique par U. Seifert en 1990[12,13] : il est possible de calculer des formes d'équilibre stables de genre torique possédant un axe de symétrie. Elles peuvent être

(1) E. Browicz, *Zbl. Med. Wiss.*, 28, 625, 1890.
(2) F. Brochard et J.-F. Lennon, *J. Phys. France*, 36, 1035, 1975.
(3) R. Lipowsky, *Nature*, 349, 475, 1991.
(4) E. Evans et W. Rawicz, *Phys. Rev. Lett.*, 64, 2094, 1990.
(5) P.B. Canham, *J. Theor. Biol.*, 26, 61, 1970 ; W. Helfrich, *Z. Naturforsch.*, 28c, 693, 1973 ; E. Evans, *Biophys. J.*, 14, 923, 1974.
(6) H. Engelhard et al., *J. Phys. Lett.*, 37, 1335, 1985 ; J.-F. Faucon et al., *J. Phys. France*, 50, 2389, 1989.
(7) H.J. Deuling et W. Helfrich, *J. Phys. France*, 37, 1335, 1976.
(8) S.V. Svetina et B. Zeks, *Eur. Biophys. J.*, 17, 101, 1989 ; L. Miao et al., *Phys. Rev. A*, 43, 6843, 1991 ; U. Seifert et al., *Phys. Rev. A*, 44, 1182, 1991.
(9) K. Berndl et al., *Europhys. Lett.*, 13, 659, 1990.
(10) J. Käs et E. Sackmann, *Biophys. J.*, 60, 825, 1991.
(11) E. Farge et P. Devaux, *Biophys. J.*, 61, 347, 1992.
(12) U. Seifert, *Phys. Rev. Lett.*, 66, 2404, 1991.
(13) Z.-C. Ou-Yang, *Phys. Rev A*, 41, 4517, 1990.

regroupées en trois familles, caractérisées par l'aspect général de leur section : les tores à section circulaire, ceux dont la section a une allure de croissant, et enfin ceux que l'on peut s'imaginer comme des disques biconcaves percés.

Les tores à symétrie axiale (ou « axisymétriques ») et de section circulaire, les plus fréquemment observés pour les liposomes, ressemblent à une chambre à air ; on les obtient en faisant tourner un cercle de rayon r autour d'un axe placé à une distance R de son centre. Ils peuvent donc être caractérisés par le rapport $\alpha = R/r$ des rayons de ces deux cercles, appelés cercles générateurs. Plus ce rapport est petit, plus le tore a un aspect gonflé. Pour les liposomes toriques, quelles valeurs ce rapport est-il susceptible de prendre ? Répondre à cette question nous amène aux travaux du mathématicien anglais T.J. Willmore, et cela nous montrera comment des considérations de mathématiques pures ont grandement contribué à expliquer, et même à prédire, les différentes formes possibles pour les liposomes.

Le problème que se posa Willmore vers 1965, et qui n'est toujours pas entièrement résolu aujourd'hui, est le suivant : trouver les surfaces fermées rendant minimale une certaine expression mathématique, laquelle correspond en fait à l'énergie de courbure des physiciens[14]. Notons que ce problème mathématique ressemble beaucoup à celui posé par les liposomes mais n'est pas identique : pour les liposomes, il y a des contraintes supplémentaires car les valeurs de l'aire, du volume et de l'asymétrie sont imposées.

Pour les surfaces de genre topologique 0, équivalentes à la sphère, on sait que le problème de Willmore n'a qu'une solution : la sphère. Toutes les autres surfaces de genre 0 ont une énergie de courbure plus élevée. Dans le cas des surfaces de genre 1, de même topologie que le tore, Willmore conjectura que la surface d'énergie de courbure minimale est un tore axisymétrique à section circulaire particulier, celui pour lequel le rapport α vaut $\sqrt{2}$. Cette surface particulière est appelée tore de Clifford par les mathématiciens (fig. 4).

C'est en s'appuyant sur la conjecture de Willmore, rappelée par B. Duplantier, du Centre d'études de Saclay, que l'un d'entre nous (U. Seifert) a prédit en 1990 que les tores axisymétriques et de section circulaire pour lesquels α est plus petit que $\sqrt{2}$ ne sont pas des formes d'équilibre pour les liposomes[15].

A peu près au même moment, M. Mutz et D. Bensimon, à l'Ecole normale supérieure, ont pu confirmer cette prédiction[16]. Tous les tores axisymétriques à section circulaire qu'ils ont observés ont effectivement un rapport α supérieur ou égal à $\sqrt{2}$. Mieux encore, nous avons montré plus récemment qu'il est impossible d'en trouver en deçà de cette valeur, en essayant de gonfler un liposome torique pour lequel α vaut exactement $\sqrt{2}$. Pour ce faire, il suffit de refroidir la solution : la conséquence de cette opération est de diminuer légèrement l'aire de la vésicule, tout en maintenant son volume inchangé. Le degré de gonflement augmente donc, et on observe la brisure de symétrie du tore initial : le trou, initialement au centre, s'éloigne de ce dernier tout en rétrécissant[17,18].

Revenons à la conjecture de Willmore car elle permet de comprendre pourquoi on observe aussi des liposomes toriques qui ne sont pas axisymétriques. En effet, l'énergie de courbure est invariante si l'on fait subir à la surface certaines transformations géométriques appelées transformations conformes et qui comprennent les dilatations, les translations, les rotations et les inversions (voir l'encadré). Or si l'on applique au tore de Clifford des inversions, on obtient des surfaces d'aspects différents, qui ont cependant la même topologie et la même énergie de courbure (mais des volumes, aires et asymétries différents). Ces surfaces, connues sous le nom de cyclides de Dupin, mathématicien et économiste français du XIXe siècle, ne possèdent plus la symétrie axiale (fig. 4). Comme elles ont la même énergie de courbure — minimale —, que le tore de Clifford, il n'est pas étonnant que nous observions des liposomes ayant ces formes.

Les vésicules toriques ne sont pas les plus étonnantes que nous ayons observées.

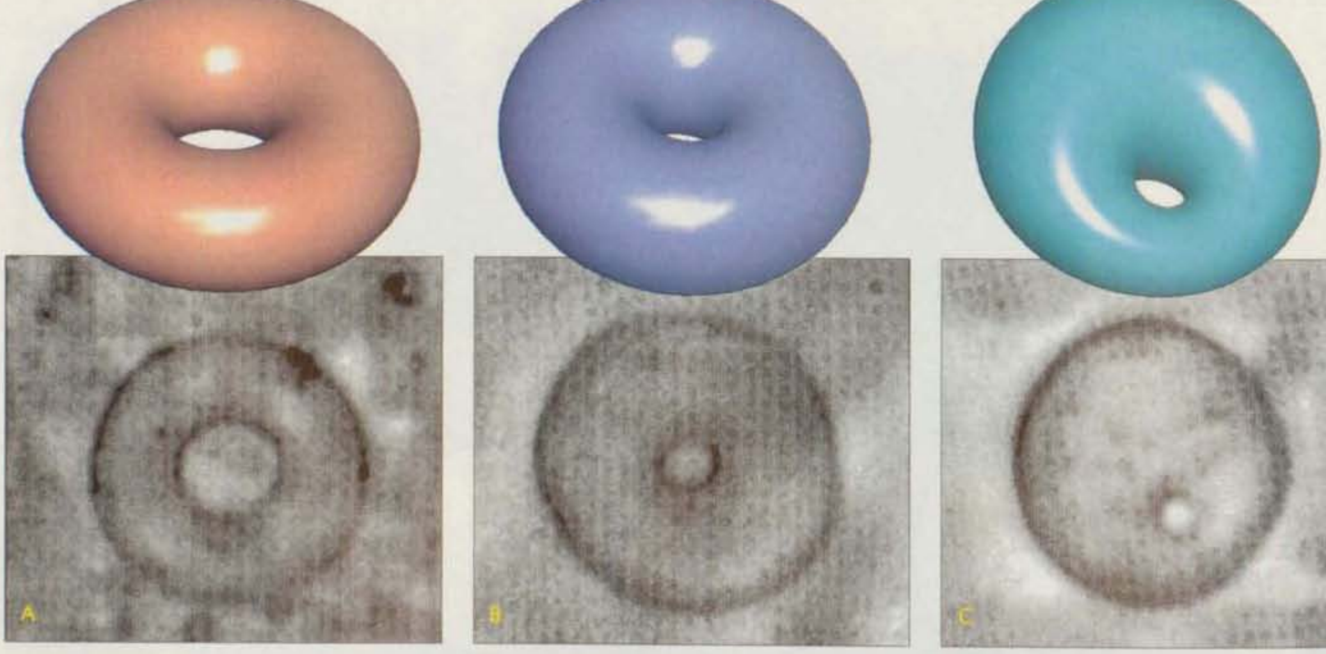


Figure 4. Les formes adoptées à l'équilibre par les liposomes peuvent être très différentes d'une forme plus ou moins sphérique. La topologie la plus simple après celle de la sphère est la topologie du tore. Parmi les tores possédant un axe de symétrie, les tores à section circulaires sont les plus courants pour les liposomes (A). Géométriquement, un tel tore s'obtient en faisant tourner un cercle de rayon r autour de l'axe de symétrie, distant de R. Le « tore de Clifford » (B) est celui qui possède l'énergie de courbure la plus faible, et est caractérisé par un rapport R/r valant $\sqrt{2}$. Les liposomes d'aspect plus gonflé que le tore de Clifford ne possèdent pas d'axe de symétrie : ce sont des « cyclides de Dupin », dont le trou est excentré (C). Un liposome initialement en forme de tore axisymétrique peut se métamorphoser en une cyclide de Dupin et réciproquement, simplement en modifiant la température de la solution. (Clichés X. Michalet et D. Bensimon ; modélisation par F. Jülicher et U. Seifert)

Rappelons qu'un tore équivaut topologiquement à une sphère avec une anse. La surface équivalente à une sphère avec deux anses est donc un tore à deux trous (fig. 5). Depuis l'observation par Mutz et Bensimon en 1991 de cette vésicule en forme de bouton[16], nous pensions qu'elle était la seule représentante de genre topologique 2 que nous pourrions observer, tout comme nous n'avions vu jusqu'à récemment que des tores à section circulaire (et dans le cas du tore de Clifford, ses compagnons non axisymétriques) pour le genre 1.

Au cours de ces dernières années, les mathématiciens ont essayé de généraliser la conjecture de Willmore, qui attribuait le minimum de l'énergie de courbure au tore de Clifford dans le cas du genre 1, aux surfaces de genre plus élevé. Mais le problème était un peu plus ardu. Dans le cas des tores, il est facile de décrire la surface par une équation, et d'en calculer l'énergie de courbure. Il suffit alors de trouver quel tore possède l'énergie la plus faible (c'est le tore de Clifford), et d'invoquer quelques arguments raffinés pour conjecturer que c'est bien là le minimum absolu pour toutes les surfaces de genre 1.

Dès le cas du genre 2, une telle démarche n'est plus possible, car on ne sait pas dire *a priori* quelles sont les surfaces jouant le rôle des tores symétriques à section circulaire, et encore moins trouver l'équation d'une telle surface. Une conjecture de la fin des années 1980, due au mathématicien américain R. Kusner, prédit que la valeur minimale de l'énergie de courbure pour le genre 2 est obtenue par la surface de Lawson (du nom du mathématicien américain qui l'a découverte), dont l'allure n'a rien à voir avec notre vésicule bouton (fig. 5). Afin de tester numériquement la validité de cette conjecture, Kusner, K. Brakke et leurs collaborateurs, à l'université du Massachusetts, ont développé un programme informatique qui minimise l'énergie de courbure pour un genre topologique donné[19]. Stimulés par ce travail et par le problème posé par la vésicule bouton, deux d'entre nous, (F. Jülicher et U. Seifert), ainsi que R. Lipowsky, à l'Institut de physique du solide de Jülich (Allemagne), ont étudié le problème physique correspondant, dans lequel les valeurs du « volume réduit » (voir l'encadré) et de l'asymétrie de la membrane sont imposées. Pour ce faire, ils ont développé indépendamment en 1992 un algorithme semblable qui minimise l'énergie de courbure en tenant compte de ces contraintes[20].

La surface de Lawson figure naturellement parmi les surfaces obtenues par les deux calculs. Elle et le bouton ont exactement la même énergie de courbure. Et en fait, cela n'a rien d'étonnant car on peut montrer que le bouton s'obtient par simple inversion de la surface de Lawson. Si, à la surface de Lawson, on applique toutes les inversions possibles, on aboutit à une famille très variée de surfaces qui ont strictement la même énergie de courbure, qui est par ailleurs le minimum de cette énergie. Ce qui change radicalement par rapport au genre 1, c'est que pour certaines positions du centre d'inversion, les surfaces obtenues possèdent les mêmes caractéristiques (volume réduit, asymétrie) que la surface de Lawson initiale, bien qu'elles soient d'aspects différents.

En d'autres termes, pour chaque couple (volume réduit, asymétrie), les inversions permettent d'obtenir toute une famille de surfaces différentes, mais possédant la même énergie élastique, le même volume, la même aire et la même asymétrie. Quelle sera alors la forme d'équilibre d'un liposome caractérisé par l'un de ces couples (volume réduit, asymétrie) ? La réponse est... indéterminée ! En effet, toutes ces formes ayant exactement la même énergie, le même volume, la même surface et la même asymétrie, il est vraisemblable que la vésicule puisse passer spontanément d'une forme à l'autre. On prédit ainsi le déplacement spontané des trous du liposome, un phénomène étonnant appelé « diffusion conforme ».

Quel est le pendant expérimental de ces développements théoriques ? Début 1993, en imaginant à quoi ressemblerait une vésicule de Lawson observée avec un microscope à contraste de phase (qui permet de voir uniquement des sections), nous nous sommes aperçus qu'elle ne possède guère de symétrie, et qu'on risque fort de la confondre avec plusieurs vésicules imbriquées. Nous avons donc observé d'un œil plus attentif les vésicules « composées » et nous n'avons pas tardé à découvrir la première vésicule de Lawson (fig. 5).

Le phénomène de « diffusion conforme » est quant à lui plus délicat à déceler, notamment parce qu'on ne voit que des coupes d'une surface en général compliquée. Par ailleurs, le mouvement aléatoire de rotation du liposome se superpose inévitablement au phénomène attendu de sa déformation lente. Néanmoins, beaucoup d'indices nous permettent de penser que nous avons également mis en évidence la diffusion conforme.

Pour des membranes de topologie complexe, la diffusion conforme n'est pas le seul phénomène intéressant. Nous avons observé tout dernièrement que les effets de fluctuations thermiques sont en fait beaucoup plus marqués dans ces systèmes que dans ceux de topologie sphérique[21]. Ainsi, on rencontre des liposomes qui se présentent comme deux sphères concentriques reliées par des passages tubulaires, de sorte que l'intérieur de la vésicule centrale communique

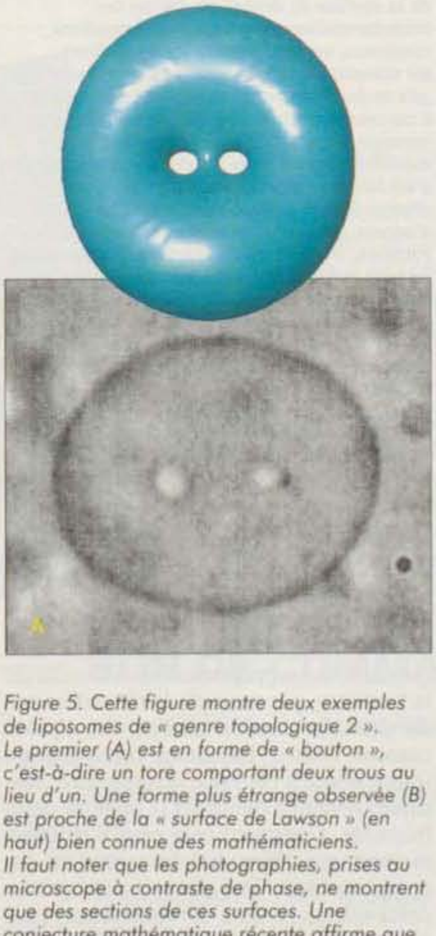
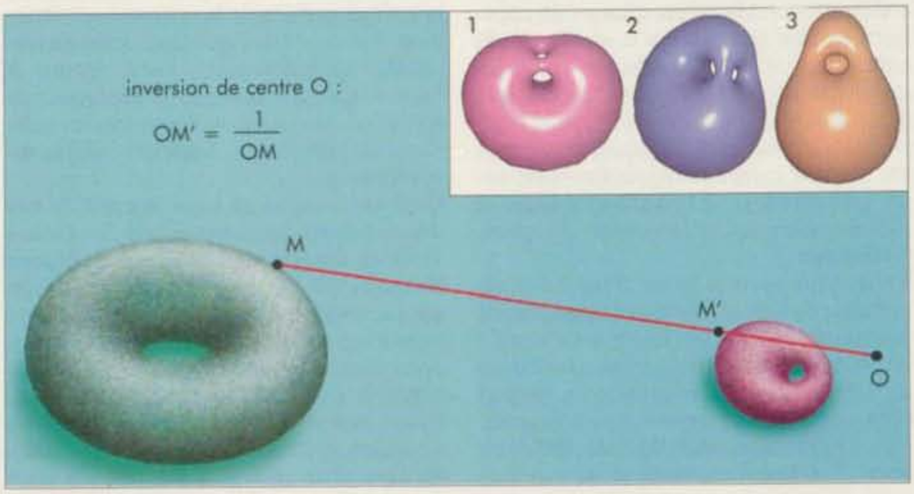


Figure 5. Cette figure montre deux exemples de liposomes de « genre topologique 2 ». Le premier (A) est en forme de « bouton », c'est-à-dire un tore comportant deux trous au lieu d'un. Une forme plus étrange observée (B) est proche de la « surface de Lawson » (en haut) bien connue des mathématiciens. Il faut noter que les photographies, prises au microscope à contraste de phase, ne montrent que des sections de ces surfaces. Une conjecture mathématique récente affirme que la surface de Lawson est, parmi les surfaces de genre topologique 2, celle dont l'énergie de courbure est minimale. En fait, la surface de Lawson a même énergie de courbure que les surfaces (dont le « bouton » figuré en bas fait partie) qui lui sont reliées par transformation d'inversion (voir l'encadré). Il n'est donc pas étonnant que ces surfaces soient observées chez les liposomes, dont l'énergie de courbure doit être minimale pour une aire, un volume et une asymétrie fixés. (Clichés X. Michalet et D. Bensimon ; modélisation par F. Jülicher et U. Seifert)

(14) T.J. Willmore, *Total curvature in Riemannian geometry*, Ellis Horwood Ltd., 1982.
(15) B. Duplantier, *Physica, 168 A*, 179, 1990.
(16) M. Mutz et D. Bensimon, *Phys. Rev. A*, 45, 4525, 1991 ; B. Fourcade *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 68, 2551, 1992.
(17) B. Fourcade, *J. Phys. II France*, 2, 1705, 1992.
(18) F. Jülicher *et al.*, *J. Phys. II France*, 3, 1681, 1993.
(19) L. Hsu *et al.*, *Experimental Mathematics*, 1, 192, 1992.
(20) F. Jülicher *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 71, 452, 1993.
(21) X. Michalet *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 72, 168, 1994.
(22) C. Gebhard *et al.*, *Z. Naturforsch.*, 32c, 581, 1977.
(23) S. Leibler, *J. Phys. France*, 47, 507, 1986.
(24) F. Jülicher et R. Lipowsky, *Phys. Rev. Lett.*, 70, 2964, 1993.
(25) U. Seifert, *Phys. Rev. Lett.*, 70, 1335, 1993.
(26) H.-G. Döbereiner *et al.*, *Biophys. J.*, 65, 1396, 1993.
(27) R. Lipowsky, *Biophys. J.*, 64, 1133, 1993.

Energie de courbure et transformations conformes



L'énergie de courbure acquise par une surface élastique lorsqu'elle s'écarte de la configuration plane a des propriétés géométriques très utiles pour comprendre la morphologie des liposomes. Tout d'abord, elle ne dépend pas de la taille de la surface considérée mais seulement de sa forme géométrique. C'est l'une des raisons pour lesquelles les physiciens préfèrent utiliser, à la place du volume et de l'aire d'un liposome, la notion de « volume réduit » ; c'est le rapport entre le volume et l'aire élevée à la puissance 3/2 ; ainsi défini, le volume réduit est un nombre sans dimension et indépendant de la taille de la surface. L'invariance de l'énergie de courbure par dilatation est en fait un cas particulier d'une propriété plus générale : si l'on fait subir à une surface une transformation géométrique qui conserve les angles entre n'importe quels segments de droites, l'énergie de courbure de la surface résultante est la même que celle de la surface de départ[15]. Parmi ces transformations, appelées *transformations conformes*, on trouve outre les dilatations, les translations et les rotations, une famille un peu moins connue, les inversions par rapport à un centre (voir le schéma). Appliquées par exemple à une sphère, ces inversions ne modifient que sa taille ; mais si on les applique à un tore, en variant la position du centre d'inversion, la surface résultante change d'aspect, perdant notamment la symétrie de rotation. Dans le cas des surfaces à deux trous, on peut même s'arranger, par une dilatation, pour retrouver le volume, l'aire et l'asymétrie de la surface de départ. Ainsi, les surfaces 2 et 3 sont obtenues à partir de la surface 1 en plaçant le centre d'inversion à deux endroits différents, et en adaptant leur échelle. Cette propriété est à l'origine du phénomène de diffusion conforme évoqué dans l'article. (Modélisation par F. Jülicher et U. Seifert)

avec l'extérieur de la vésicule périphérique. Ces passages sont animés d'un mouvement brownien : leurs positions relatives fluctuent au cours du temps, sans pour autant qu'ils se rencontrent et fusionnent. Tout se passe comme s'il y avait une répulsion entre les trous, que l'on peut expliquer en termes d'optimum d'énergie de courbure. La forme de ces liposomes de topologie complexe n'est donc pas figée, mais fluctue de façon désordonnée en raison de l'agitation thermique.

Jusqu'ici, nous n'avons parlé que de membranes homogènes, composées d'un seul type de molécules. Ce n'est pas le seul cas intéressant puisque les membranes biologiques, par exemple, comportent un grand nombre de phospholipides différents[22]. Pour se rapprocher de la réalité biologique sans s'éloigner trop brusquement du modèle que nous avons décrit, il paraît naturel de considérer d'abord le cas des membranes à deux composants[23]. Quels effets nouveaux peut-on prédire dans une telle situation ?

Supposons d'abord que les deux lipides soient très différents l'un de l'autre. Leur tendance est alors de se regrouper à l'équilibre dans des domaines distincts, mais l'existence d'une frontière entre ces domaines implique un certain coût énergétique. L'idée la plus simple est de dire que ce coût est proportionnel à la taille de la frontière, par exemple la circonférence du domaine central si l'un des lipides entoure l'autre. Diminuer cette énergie (qui s'ajoute à l'énergie de courbure classique) revient à diminuer la taille de cette frontière. Comment cela peut-il se faire, sachant que l'aire des domaines est incompressible ? En remarquant qu'une demi-sphère a une circonférence plus petite qu'un disque de même aire, on voit aisément que le moyen le plus simple est que le domaine en question « bourgeonne » en dehors de la surface de départ. A condition toutefois que la diminution de l'énergie de frontière compense l'augmentation d'énergie de courbure qui s'ensuit. Jülicher et Lipowsky ont prédit en 1993 qu'un tel phénomène devrait se produire spontanément au-delà d'une certaine taille du domaine[24].

Un autre aspect de ce lien entre la composition de la membrane et la forme d'équilibre des liposomes est étroitement lié au précédent[25]. Supposons que les deux lipides ont au contraire une bonne affinité l'un pour l'autre, mais que leur géométrie moléculaire est différente. Si l'on modifie, par l'un des moyens que nous avons déjà évoqués, la forme d'une vésicule sphérique dans laquelle les deux lipides sont répartis de façon homogène dans toute la membrane, on crée des inhomogénéités de courbure. Si l'un des lipides tend, de par sa géométrie, à diminuer l'énergie de courbure, il se séparera de son homologue pour envahir les régions de forte courbure : dans le cas limite du bourgeonnement, on retrouve ainsi la situation précédente, où la composition de la vésicule mère diffère de celle de la vésicule fille.

Ces résultats théoriques restent à tester par l'expérience ; des études ont d'ores et déjà été entreprises, qui permettront peut-être de faire le lien avec le processus biologique le plus ressemblant, l'émission de vésicules par les cellules, les membranes de ces deux objets étant de compositions différentes[26,27].

Les membranes biologiques sont bien loin de consister en de simples mélanges de lipides. La membrane du globule rouge, par exemple, comporte, outre une bicouche lipidique, une sorte de filet de pêcheur constitué par un réseau de protéines (spectrine) ancrées dans cette bicouche par d'autres protéines (actine, ankyrine). Cette structure supplémentaire confère à ces cellules leur extrême résistance aux cisaillements qu'ils sont obligés de subir dans les capillaires sanguins. Or les physiciens ont déjà commencé à penser aux propriétés de liposomes possédant une structure interne proche, avec des vésicules « polymérisées » dans lesquelles on crée des liens chimiques entre les lipides constituant la membrane. La prise en compte de ces ingrédients supplémentaires complique notablement l'analyse, qui utilise des techniques sophistiquées de la physique moderne (méthode du groupe de renormalisation, techniques de simulation numérique dites de Monte-Carlo). S'il n'est pas question de détailler ici les résultats tant théoriques qu'expérimentaux déjà obtenus, ceux-ci montrent en tout cas que la physique des membranes n'a pas encore livré tous ses secrets. ■

POUR EN SAVOIR PLUS

■ D. Nelson *et al.* (eds), *Statistical mechanics of membranes and surfaces*, World Scientific, 1989.
■ R. Lipowsky *et al.* (eds), *The structure and conformation of amphiphilic membranes*, Springer-Verlag, 1992.
■ U. Pinkall et I. Sterling, « Willmore Surfaces », *The Mathematical Intelligencer*, vol. 9, n° 2, 1987.
■ M. Bloom *et al.*, *Quart. Rev. Biophys.*, *24*, 3293, 1991.