

Chapitre 7

Membranes et échanges membranaires

Cours

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Les membranes cellulaires : des mosaïques fluides
- 2 Diversité des échanges membranaires
- 3 Facteurs contrôlant la perméabilité d'une membrane
- 4 Transports cytotiques : exocytose et endocytose

ZOOM

- 1 La fluidité membranaire
- 2 Potentiel d'équilibre d'un ion ; loi de Nernst
- 3 Protéines et échanges membranaires de l'entérocyte
- 4 Importance des transports cytotiques

INTRODUCTION

Toutes les cellules sont délimitées par une membrane plasmique. Les cellules eucaryotes comprennent en outre des endomembranes entourant les compartiments cellulaires. Les membranes biologiques ne sont pas des frontières infranchissables ; elles sont traversées par des flux de matière qui constituent les échanges.

➔ **Quels sont les constituants des membranes biologiques et comment interviennent-ils dans la réalisation des échanges ?**

Ceux-ci seront étudiés sur l'exemple des cellules intestinales ou entérocytes.

1 Les membranes cellulaires : des mosaïques fluides

Les membranes cellulaires sont des interfaces entre deux milieux : entre les milieux intracellulaire et extracellulaire, pour la membrane plasmique, structure essentielle de l'état cellulaire ; entre le contenu d'un compartiment et le cytosol pour les endomembranes.

1.1 Les membranes : des mosaïques moléculaires

Les membranes cellulaires présentent les caractéristiques suivantes (figure 7.1).

- L'observation au microscope électronique à transmission révèle une structure tripartite de **5 à 8 nm d'épaisseur**, interprétée comme deux régions hydrophiles entourant une région hydrophobe.

Voir chapitre 8,
zoom 1 et chapitre 9,
§ 1.4

Ce sont des **mosaïques moléculaires** formées de lipides amphiphiles (phospholipides, cholestérol), orientés par l'environnement aqueux, et de protéines intégrées ou périphériques. La cohésion moléculaire est assurée par des liaisons faibles :

- interactions hydrophobes et liaisons de van der Waals entre les lipides membranaires ou entre ces lipides et les domaines transmembranaires des protéines intrinsèques ;
- liaisons ioniques ou hydrogène, parfois covalentes, entre les protéines extrinsèques et les lipides d'une hémimembrane.

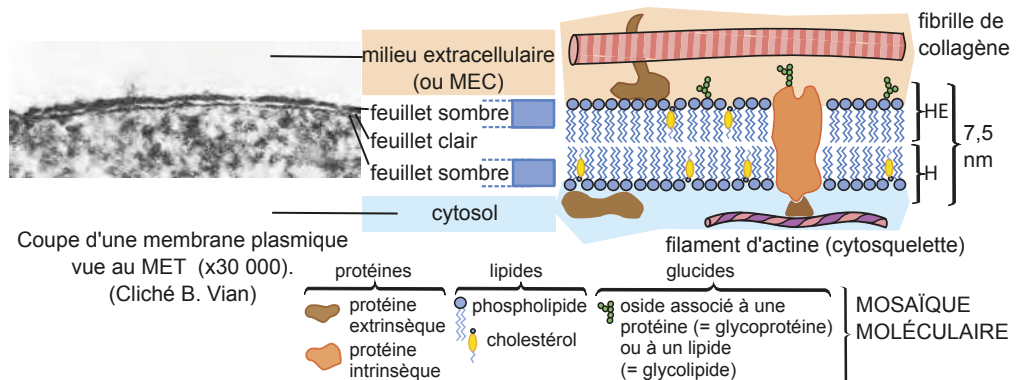


Figure 7.1 Ultrastructure et architecture moléculaire de la membrane plasmique d'une cellule animale.

HE : hémimembrane externe. HI : hémimembrane interne.

- Les deux hémimembranes sont de composition différente (**asymétrie membranaire**).
- Sur la face extracellulaire des membranes animales, un revêtement glucidique forme le **glycocalyx**.
- La nature des constituants des membranes, leur proportion relative et leur disposition sont la signature de chaque type de cellule.

1.2 Les membranes : des mosaïques dynamiques

Les membranes cellulaires présentent une **fluidité**, due aux déplacements latéraux et (dans une moindre mesure) transversaux des lipides membranaires.

La fluidité d'une membrane dépend de différents facteurs :

- elle est favorisée par une forte **teneur en acides gras insaturés** ;
- elle dépend de la teneur en **cholestérol** (effets différents selon la composition en acides gras) ;
- elle augmente avec la **température**.
- Les protéines membranaires diffusent latéralement dans la membrane à une vitesse 20 fois moindre que les lipides.

La fluidité des membranes influence leurs propriétés. Divers exemples seront vus dans le cours. La **déformation des membranes** permet des échanges, par les cytoses (voir § 4), et la fusion des membranes lors de la fécondation ou l'infection par les virus à enveloppe :

- les protéines membranaires peuvent changer de conformation dans la bicouche lipidique fluide ;
- les **réactions d'oxydoréduction** entre composés membranaires (chaînes respiratoire et photosynthétique) sont favorisées par cette dynamique ;
- il en va de même pour **l'action de messagers intercellulaires** par une chaîne de réactions entre protéines membranaires (transduction de signaux intercellulaires).

Voir chapitre 9,
zoom 2

ZOOM 1

La fluidité
membranaire

1.3 Des propriétés reposant sur l'organisation de la membrane

Nous venons de voir que les propriétés de **fluidité** reposent sur l'organisation d'une membrane. Les protéines membranaires, comme la plupart des protéines, ont des fonctions particulières qui déterminent la **spécificité** d'une membrane. La **perméabilité** membranaire dépend aussi de la disposition relative de la phase lipidique et des protéines qui y sont dispersées.

2 Diversité des échanges transmembranaires

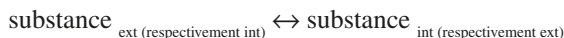
2.1 Deux types d'échanges : individuels ou « en masse »

Les échanges d'eau, d'ions minéraux et de petites molécules organiques non chargées sont relatifs à des **transports individuels** : l'échange envisagé ne met en jeu qu'une seule voire deux substances au plus (dans le cas des cotransports).

D'autres modalités d'échanges font intervenir des vésicules qui assurent le transfert simultané de nombreuses molécules entourées par une membrane. C'est un **transport en masse**.

2.2 Transports individuels passifs ou actifs, selon le bilan thermodynamique

Tout échange peut s'écrire à l'image d'une réaction chimique de la façon suivante :



où ext et int représentent les milieux extra- et intracellulaires.

Les transferts d'eau et de solutés au travers d'une membrane sont régis par des lois thermodynamiques.

a) Pour l'eau : transport passif selon le gradient décroissant de potentiel hydrique

Le potentiel hydrique, noté Ψ (psi), s'exprime en unités de pression (Pa ou bar). Il dépend de plusieurs composantes ; deux suffisent pour caractériser le profil énergétique des échanges d'eau de part et d'autre d'une membrane cellulaire.

- Une **composante hydraulique** (notée P) : elle représente l'écart de pression entre le liquide considéré et la pression atmosphérique.

Par exemple le contenu liquide d'une cellule végétale exerce le plus souvent une **pression de turgescence** sur la paroi ; en revanche, pour les cellules animales, P est souvent nul du fait de l'absence ou la faible rigidité de la matrice extracellulaire,

- Une **composante osmotique** (notée Ψ_o) : le potentiel osmotique dépend de la capacité des solutés présents dans un milieu à retenir l'eau. Il est défini comme l'opposé de la pression osmotique Π :

$$\Psi_o = -\Pi = -R.T.C.10^3$$

C : osmolarité, i.e. la quantité de matière des solutés par litre.

Le signe moins exprime le fait que l'eau est attirée par les solutés. Au final :

$$\Psi = P + \Psi_o = P - \Pi$$

Par définition, la valeur du potentiel de l'eau pure est nulle. Toutes les valeurs de Ψ des cellules sont négatives.

! Attention !

Le flux d'eau se réalise toujours du compartiment où le potentiel hydrique est le plus élevé vers le compartiment où le potentiel hydrique est le plus faible (selon un $\Delta\Psi < 0$).

Voir chapitre 4,
zoom 2

**ZOOM 2**

Potentiel d'équilibre d'un ion ; loi de Nernst

ZOOM 3

Protéines et échanges membranaires d'un entérocyte

b) Pour les solutés : transports passifs ou actifs

La différence de concentration d'un soluté de part et d'autre d'une membrane séparant deux compartiments biologiques est à l'origine d'un **gradient transmembranaire chimique** (ou de concentration, pour un soluté neutre), ou **électrochimique** (pour un soluté chargé). Ce gradient est une forme d'énergie que l'on peut évaluer par le calcul thermodynamique de la variation molaire d'enthalpie libre associée au transfert de cette substance d'un compartiment à l'autre au travers de cette membrane ($\Delta G'$ transfert ; ' car on se réfère à un pH de 7).

Ainsi l'approche thermodynamique permet d'envisager deux grands types de transports.

- Les **transports passifs spontanés** ($\Delta G'$ transfert < 0) ne nécessitent pas de dépense énergétique de la part des systèmes cellulaires. Il s'agit dans tous les cas de **diffusion**, la diffusion d'eau étant nommée osmose.
- Les **transports actifs non spontanés** ($\Delta G'$ transfert > 0) sont permis par un **couplage** à une transformation exergonique. Un **transport actif primaire** est couplé à l'hydrolyse de l'ATP (couplage chimioosmotique) ; un **transport actif secondaire** est couplé à un flux spontané d'un autre soluté (couplage osmoosmotique).

Dans les cellules animales, une pompe Na^+/K^+ ATP dépendante hydrolyse l'ATP et crée un efflux de Na^+ et un influx de K^+ , transferts opposés au gradient électrochimique. Ce transport actif primaire entretient une inégale répartition des ions de part et d'autre de la membrane qui peut être utilisée par des transports actifs secondaires (symport $\text{Na}^+/\text{glucose}$, par exemple). Dans les cellules végétales, une **pompe à protons** ATP-asiqque joue le rôle de transporteur actif primaire.

2.3 Deux types d'échanges individuels passifs selon la cinétique

La cinétique des transferts diffusifs permet de caractériser les modalités de franchissement de la membrane.

a) Diffusion simple : la loi de Fick

Le flux diffusif d'une espèce moléculaire X à travers une interface perméable à cette substance séparant deux milieux 1 et 2 entre lesquels le gradient de concentration est constant est décrit par la **première loi de Fick** :

$$F_{1 \leftrightarrow 2} = -D \cdot S \cdot ([X]_2 - [X]_1) / e = -(D \cdot S \cdot \Delta C_X) / e$$

$F_{1 \leftrightarrow 2}$: flux net de la substance de 1 vers 2 en $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$;

D : coefficient de diffusion en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; il dépend de la substance échangée ;

S : aire de l'interface en m^2 ;

ΔC_X : différence de concentration à savoir $[X]_2 - [X]_1$ en $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$;

e : épaisseur de l'interface en m ; $\Delta C/e$ est alors le **gradient de concentration**.

Le signe négatif de la formule permet d'obtenir une valeur positive du flux diffusif si celui-ci est orienté du milieu 1 (plus concentré) vers le milieu 2 (moins concentré).

! Attention !

Les gaz O_2 et CO_2 , les petites molécules hydrophobes comme l'urée, et partiellement l'eau, diffusent librement à travers les membranes biologiques.

Voir chapitre 3, § 1.2

b) Diffusion facilitée au travers d'une protéine porteuse

Lorsque la diffusion d'une substance fait intervenir une protéine membranaire, il s'agit d'une diffusion facilitée. Le flux diffusif tend alors vers une valeur maximale, qui peut être interprétée comme la conséquence d'une saturation des transporteurs avec lesquels le soluté échangé interagit (figure 7.2).

Voir chapitre 12, § 1.3

- Si cette protéine se lie transitoirement à la substance échangée X, il s'agit d'une **perméase**. Ce type de transport peut être représenté par une équation chimique :



On définit alors une constante de transporteur K_T correspondant à la concentration en soluté qui permet d'obtenir une vitesse initiale de transfert égale à la moitié de la vitesse initiale maximale du transfert réalisé par le transporteur spécifique ; K_T exprime l'inverse de l'affinité du transporteur vis-à-vis de X.

- Si la protéine de transport ne se lie pas à la substance transportée X, il s'agit d'un **canal protéique**. Dans les conditions physiologiques, le flux diffusif paraît non saturable et ressemble à celui d'une diffusion simple.

Il existe des canaux pour les ions (**canaux ioniques**) et des canaux à eau, ou **aquaporines**, qui ménagent des pores hydrophiles et augmentent considérablement la perméabilité à l'eau des membranes biologiques.

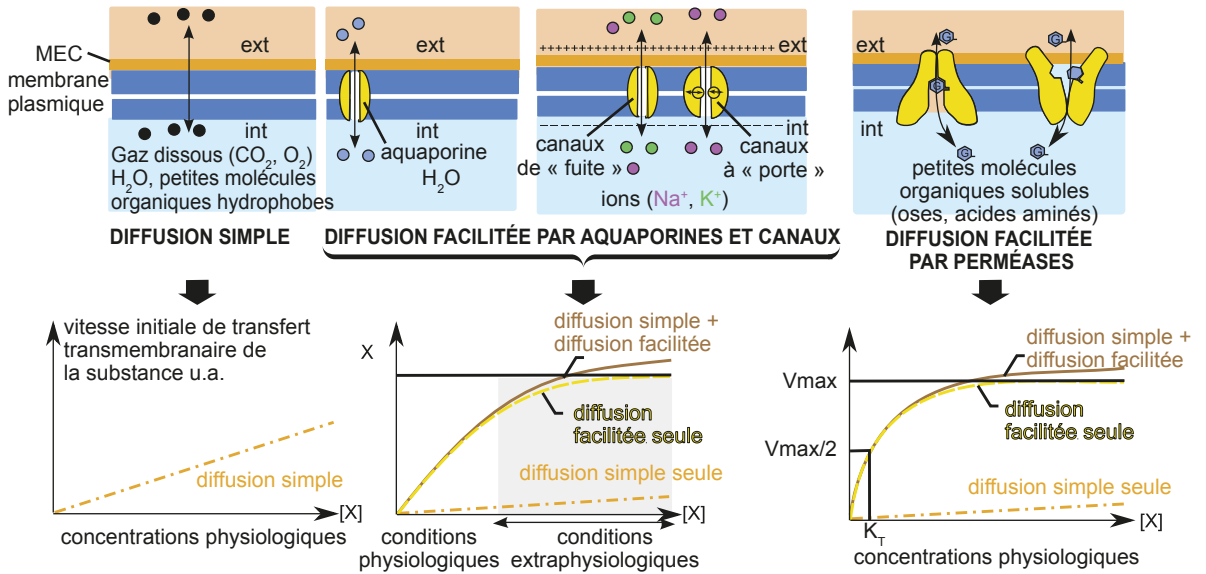


Figure 7.2 Les différents transports individuels passifs.

Si dans les conditions physiologiques, les canaux ne sont en général pas saturés (cinétique d'apparence linéaire), pour des concentrations expérimentales étendues aux conditions non physiologiques, ils présentent une cinétique hyperbolique avec un plateau de saturation, qui ressemble donc à celle des transports par protéines porteuses.

2.4 Flux ioniques transmembranaires à l'origine du potentiel de repos

a) Un potentiel de membrane mesurable sur toute cellule vivante

Les cellules vivantes présentent de part et d'autre de leur membrane plasmique et, chez les eucaryotes, de part et d'autre de certaines de leurs endomembranes, des différences de potentiel électrique (ddp) de l'ordre de -60 à -90 mV, pour les cellules animales, -100 à -300 mV pour les cellules végétales. Cette ddp transmembranaire, encore appelée **potentiel de membrane** mesurée en l'absence de stimulation, constitue le **potentiel de repos** (noté par la suite V_{rep}).

Remarque

Le terme de potentiel, couramment utilisé en biologie, désigne une ddp entre deux compartiments cellulaires, ou entre le cytosol et le milieu extracellulaire.

b) Origine du potentiel de repos des cellules animales : une perméabilité sélective à K^+

Le **tableau 7.1** montre que les concentrations ioniques intra- et extracellulaires sont différentes : il existe une **anisotropie ionique** de part et d'autre de la membrane plasmique. Mais chaque milieu est électriquement neutre.

Tableau 7.1 Concentrations ioniques intra- et extracellulaires pour une cellule animale.

Constituants		Concentrations intracellulaires		Concentrations extracellulaires	
		en mmol.L ⁻¹	en mEq.L ⁻¹	en mmol.L ⁻¹	en mEq.L ⁻¹
cations	Na ⁺	14	14	140	140
	K ⁺	140	140	5	5
	Ca ²⁺	10 ⁻⁴	2.10 ⁻⁴	1	2
anions	Cl ⁻	14	-14	147	-147
	organiques	126	-140	0	0

1 équivalent (Eq) correspond à une mole de charges.

Pour l'ion K^+ , par exemple, si la membrane lui est perméable, le gradient électrochimique entraîne un double flux : un flux sortant selon le gradient chimique et un flux entrant selon le gradient électrique (puisque K^+ est un cation et que l'intérieur de la membrane est négatif par rapport à l'extérieur). On définit le **potentiel d'équilibre** d'un ion comme la ddp pour laquelle le flux net de l'ion est nul (i.e., le flux selon le gradient électrique équilibre le flux selon le gradient chimique). Le potentiel de repos d'une cellule animale ($V_{rep} \approx -70$ mV) est proche du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ ($E_K \approx -80$ mV). Or l'ordre de grandeur du potentiel de repos est déterminé par l'ion auquel la membrane est la plus perméable. Ceci suggère que la membrane plasmique d'une cellule animale présente une **perméabilité élevée pour K^+** et qu'un autre ion (ici Na^+) participe minoritairement à la valeur du potentiel de repos, ce qui expliquerait qu'il ne soit pas exactement égal à E_K .

La membrane plasmique comprend des canaux protéiques toujours ouverts nommés **canaux de fuite**, qui sont bien plus perméables à K^+ qu'à Na^+ . La membrane est sélectivement perméable à K^+ : la **conductance** de la membrane à K^+ (notée g_{K^+}) est supérieure à sa conductance à Na^+ (g_{Na^+}).

! Attention !

L'inégale répartition des charges n'intéresse qu'une zone très restreinte, limitée à 1 nm de part et d'autre de la membrane. La proportion d'ions participant à la genèse du potentiel de repos est toujours faible ; ainsi 1 à 2 ions K^+ sur 10^5 diffusent à travers les canaux de fuite.

c) Maintien du potentiel de repos et autres origines de l'anisotropie ionique

Si l'inégale répartition n'était maintenue que par des flux diffusifs, ils aboutiraient à la longue à l'annulation des gradients électrochimiques. D'autres processus y participent (**figure 7.3**).

- La **pompe membranaire Na^+/K^+ ATP dépendante** entretient l'inégale répartition des ions tout en ayant un **rôle électrogène** direct car elle échange 3 Na^+ contre 2 K^+ , ce qui n'est pas neutre au plan électrique. Il en va de même dans les cellules végétales pour la pompe H^+ ATP dépendante qui expulse des protons vers le milieu extracellulaire.

ZOOM 2
Potentiel d'équilibre d'un ion ; loi de Nernst

Deux facteurs déterminent conjointement la perméabilité d'une bicouche lipidique vis-à-vis d'un soluté.

- Du fait des interactions hydrophobes entre les lipides, la perméabilité membranaire est très faible pour les molécules hydrophiles ; elle augmente avec le **caractère hydrophobe d'un soluté** qui favorise sa diffusion au travers de la bicouche lipidique, notamment lors du franchissement de la partie centrale.
- La perméabilité diminue quand la **masse moléculaire du soluté** augmente. Plus la masse moléculaire d'un soluté est faible, plus son coefficient de diffusion à travers une membrane donnée est élevé. La forte perméabilité de la bicouche lipidique vis-à-vis de l'eau peut être due à la petite taille de cette molécule qui lui confère une bonne diffusivité compensant sa faible lipophilie.

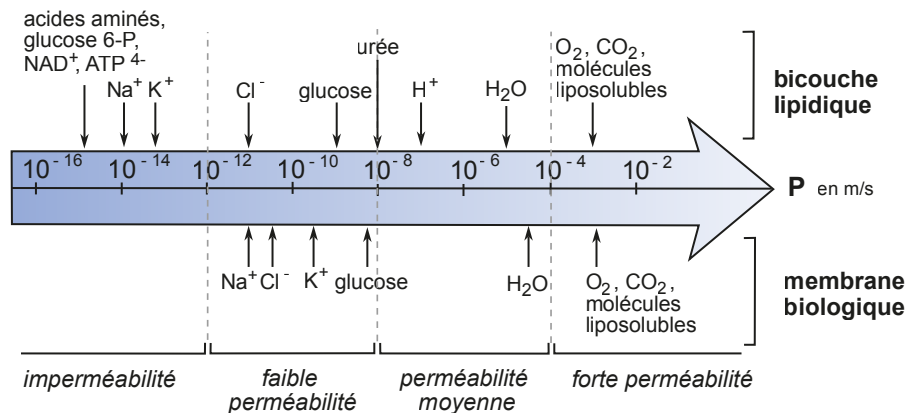


Figure 7.4 Perméabilité P d'une bicouche lipidique aux différentes substances ; comparaison avec la perméabilité de la membrane plasmique.

Sur la [figure 7.4](#) on constate que, si les gaz et les molécules hydrophobes diffusent aisément à travers une bicouche lipidique, celle-ci est quasiment imperméable aux ions, ce qui autorise le développement de **gradients électrochimiques**.

Les écarts entre les valeurs de perméabilité au travers d'une bicouche exclusivement lipidique et au travers des membranes biologiques mettent en évidence **l'intervention de protéines dans de nombreux transferts transmembranaires** de substances, qu'il s'agisse d'eau, d'ions minéraux ou encore de petites molécules organiques non chargées.

3.2 Les autres transports dépendent de la nature des protéines membranaires

La membrane apicale des entérocytes est le siège de l'absorption d'eau, d'ions minéraux et de petites molécules (glucose, acides aminés...) issues de la digestion. Ces substances passent ensuite vers le liquide interstitiel en traversant la membrane basale de l'entérocyte dont la composition en protéines et en lipides est différente de celle de la membrane apicale. Les transports membranaires aux deux pôles de la cellule peuvent être différents et faire intervenir des protéines membranaires localisées de façon spécifique sur l'une de ces deux membranes. Ainsi, le glucose est importé de la lumière intestinale par un transport actif secondaire au pôle apical et exporté vers le sang au pôle basal par une perméase ([figure 7.5](#)). La distribution hétérogène des protéines membranaires est maintenue par les jonctions serrées formant

Voir chapitre 5, § 4.1

une ceinture étanche qui interdit toute diffusion de protéine entre la membrane apicale et les membranes latérales et basale. Ces jonctions empêchent également le mélange entre contenu intestinal et milieu intérieur.

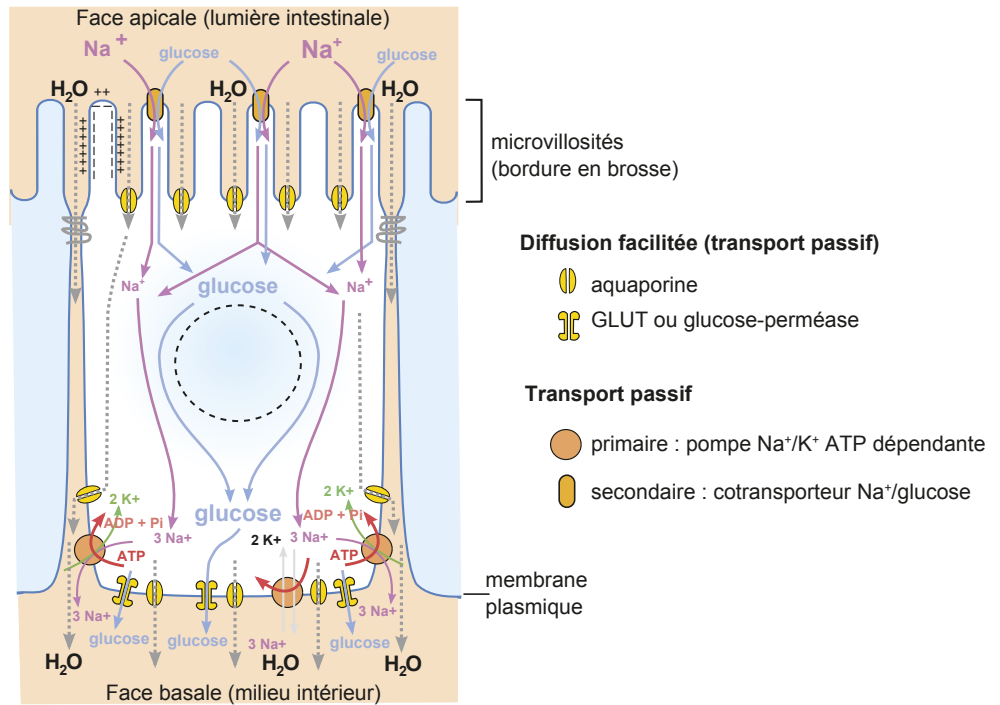


Figure 7.5 Protéines d'échanges membranaires d'un entérocyte.

Les canaux de fuite ne sont pas représentés.

ZOOM 3

Protéines et échanges membranaires d'un entérocyte

4

Transports cytotiques : exocytose et endocytose

Il s'agit de transports de masse, qui concernent plusieurs macromolécules en même temps et qui font intervenir des vésicules délimitées par une membrane entourant les substances transportées, soit avant leur exportation hors de la cellule (exocytose) soit après leur importation (endocytose).

4.1 L'exocytose

Les acides gras et le glycérol, issus de la digestion des lipides dans la lumière intestinale, diffusent à travers la membrane apicale des entérocytes. Ils sont ensuite réestérifiés pour former des triglycérides. Dans le réticulum endoplasmique s'assemblent des particules lipoprotéiques ou **chylomicrons** (97 % de triglycérides, phospholipides, cholestérol estérifié et 3 % de protéines) qui circulent alors, dans le réseau endomembranaire, par le trafic vésiculaire, vers le pôle basal de la cellule d'où ils sont sécrétés par exocytose vers les vaisseaux lymphatiques, au pôle basal des entérocytes.

a) Transport consécutif à un flux de vésicules guidé par le cytosquelette

Les chylomicrons quittent le réticulum endoplasmique dans des vésicules qui rejoignent l'appareil de Golgi où ils sont modifiés. L'appareil de Golgi forme à son tour des vésicules qui

Voir chapitre 6, § 1.1

rejoignent la membrane basale. Ce **flux vésiculaire** est guidé par le cytosquelette ; il demande l'hydrolyse de nucléotides triphosphates (ATP, GTP). À chaque étape de ce flux, l'arrimage d'une vésicule au compartiment accepteur est spécifique grâce à la complémentarité de protéines d'adressage.

b) Transport par fusion membranaire

Des protéines SNARE de type v-SNARE (sur la membrane de la vésicule) sont reconnues spécifiquement par les protéines t-SNARE de la membrane plasmique (t pour *target*, cible en anglais). Alors, la membrane de la vésicule et la membrane plasmique fusionnent, ce qui met en contact la lumière vésiculaire et le milieu extracellulaire (figure 7.6). Les chylomicrons sont alors libérés vers le milieu extracellulaire. La membrane de la vésicule est ensuite réinternalisée par endocytose. L'interaction des protéines SNARE recrute des ATPases : elle consomme donc de l'ATP ; à ce titre, l'exocytose peut être rangée dans les transports actifs en rappelant toutefois qu'il s'agit d'un transport en masse.

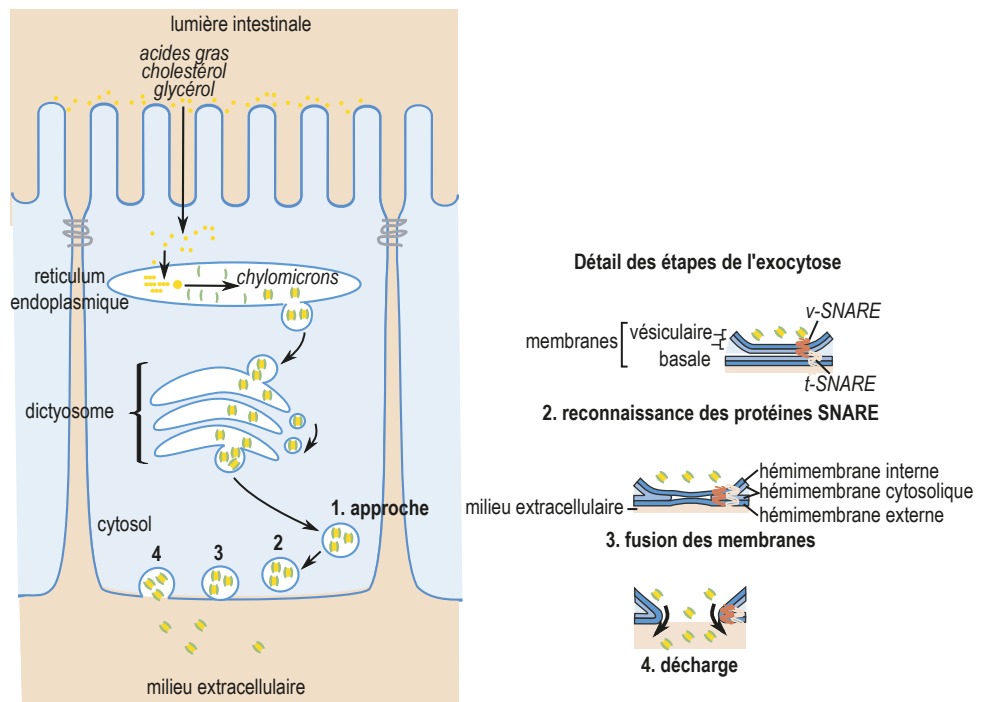


Figure 7.6 Les processus de fusion membranaire lors de l'exocytose.

4.2 L'endocytose

C'est le processus globalement inverse du précédent. La déformation d'un secteur de la périphérie cellulaire englobe une parcelle de milieu extracellulaire et l'enferme dans une vésicule qui passe dans le cytosol. Il permet notamment l'absorption de protéines, qui peuvent être liées à d'autres constituants comme des lipides.

Il existe deux types d'endocytose :

- La **pinocytose** permet d'internaliser de petites gouttelettes (solutés et solvant) du liquide extracellulaire.

- Lors de l'**endocytose par récepteur interposé**, l'internalisation des macromolécules est précédée de leur fixation à une protéine membranaire (récepteur) spécifique. Une dépression membranaire, ou puits, se forme et se referme en constituant une vésicule. Sur la [figure 7.7](#), la **vésicule d'endocytose est recouverte** de protéines fibreuses, des clathrines qui forment un habillage indispensable à l'internalisation de ce type de vésicules. Une fois dans le cytosol, elles sont déshabillées et la clathrine peut être réutilisée. Les vésicules contenant les macromolécules importées peuvent fusionner avec d'autres vésicules cellulaires (endosomes) qui les stockeront ou les dégraderont selon les cas.

Dans d'autre cas, les vésicules d'endocytose ne sont pas recouvertes (**vésicules lisses**). Certaines peuvent être transférées à l'autre face de la cellule et y être libérées par exocytose. Ce transport qui associe une endocytose au pôle apical et une exocytose au pôle basal est appelé **transcytose** ([figure 7.8](#)). Il permet notamment aux anticorps maternels (protéines) présents dans le lait des mammifères d'être absorbés à travers l'épithélium intestinal du nourrisson.

Dans tous les cas, l'endocytose est suivie d'une exocytose compensatoire qui permet le recyclage des récepteurs membranaires et préserve l'intégrité de la surface de la membrane plasmique.

Ainsi l'endocytose et l'exocytose sont des processus complémentaires qui exploitent la fluidité membranaire. Ils sont fondamentalement associés au fonctionnement du cytosquelette (microtubules et microfilaments en particulier). Ils jouent des rôles très importants dans la vie des cellules.

ZOOM 4

Importance des transports cytotiques

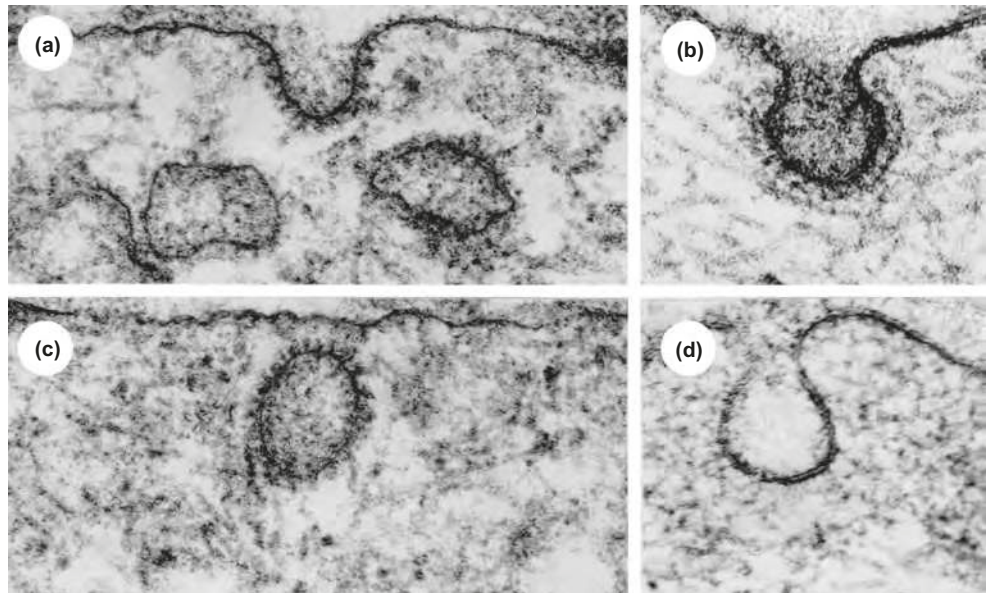


Figure 7.7 Micrographies électroniques illustrant le phénomène d'endocytose (x100 000).

(a) et (b) formation d'une vésicule d'endocytose par pincement de la membrane, l'enveloppe de clathrine est visible. (c) vésicule entièrement formée recouverte de clathrine à comparer avec une vésicule en formation non recouverte de clathrine (d). (Cliché Labo. BG, Orsay).

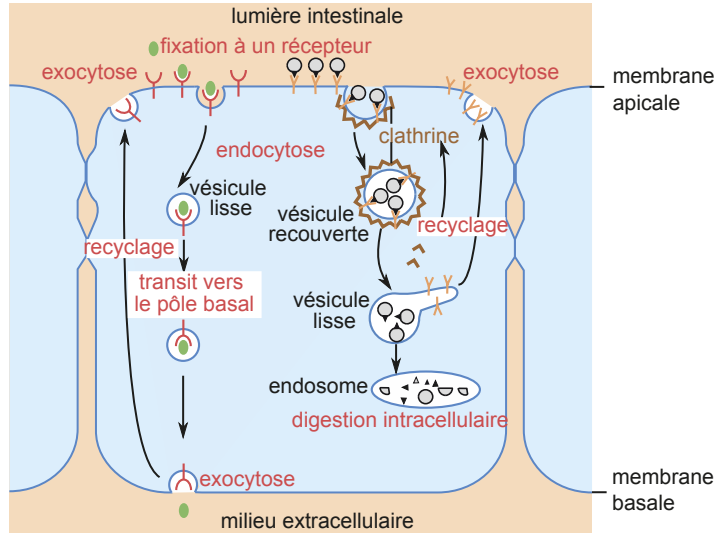


Figure 7.8 Endocytose par récepteur interposé.

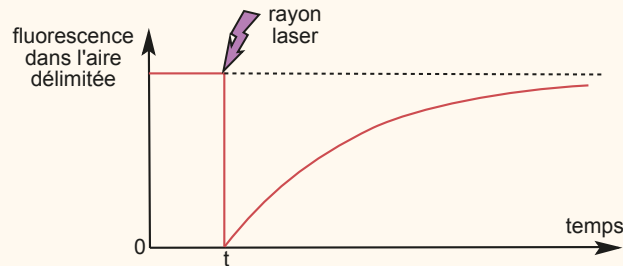
À gauche, endocytose de vésicules lisses aboutissant à une transcytose ; à droite, endocytose de vésicules recouvertes de clathrine, préalable à une digestion intracellulaire. Dans tous les cas, une exocytose compensatrice permet le recyclage des récepteurs de la membrane apicale.

ZOOM 1

La fluidité membranaire

Mise en évidence par la technique d'extinction de fluorescence ou FRAP

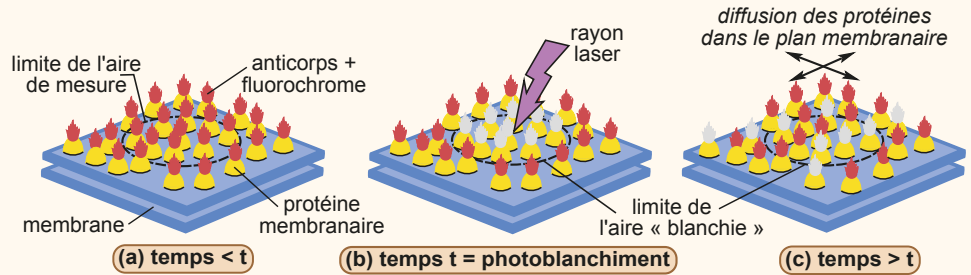
Des anticorps spécifiques d'une protéine membranaire sont rendus fluorescents par association avec un fluorochrome. Une solution de ces anticorps est mise en contact avec les membranes. On mesure alors la fluorescence d'une aire membranaire définie au cours du temps. Au temps t , l'ensemble des fluorochromes de l'aire est détruit irréversiblement par un faisceau laser localisé et puissant (photoblanchiment).



Résultats.

- **Avant le photoblanchiment** : la fluorescence est constante et non nulle. L'aire membranaire observée porte une quantité constante de fluorochromes, i.e. une quantité constante de protéines complémentaires de l'anticorps utilisé.
- **Au moment du photoblanchiment (temps t)**, la fluorescence disparaît ; le rayon laser a détruit irréversiblement les fluorochromes.

- **Après t**, la fluorescence augmente à nouveau. Des protéines membranaires, porteuses de fluorochromes intacts, ont colonisé l'aire observée. Elles sont issues de régions voisines.



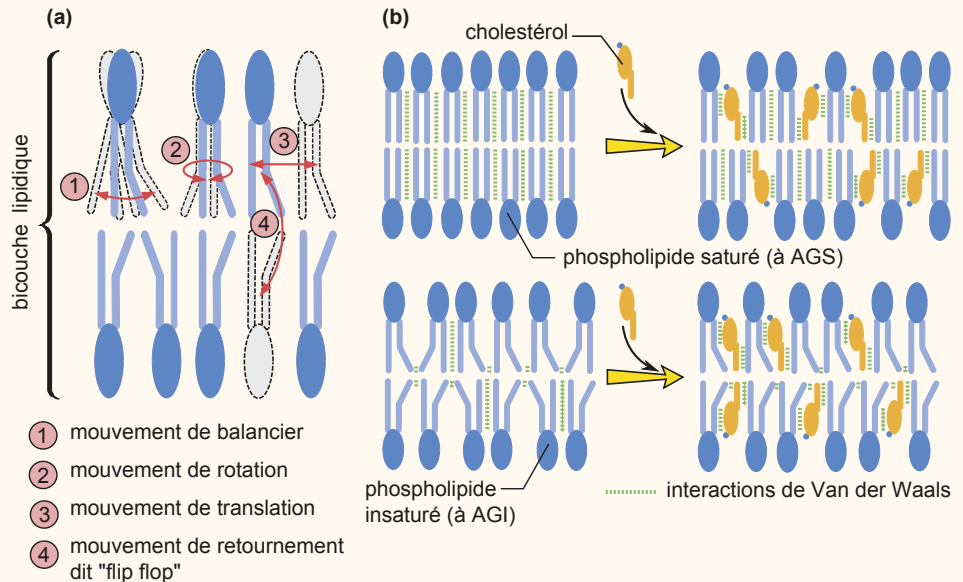
Interprétation.

On met ainsi en évidence la mobilité latérale des protéines au sein d'une membrane. Aucun apport d'énergie (sous forme d'ATP ou autre) n'étant requis, on peut attribuer l'origine des mouvements à la seule **agitation moléculaire**.

Déplacements des lipides au sein de la membrane

Le caractère labile des liaisons faibles au sein de la membrane autorise les mouvements suivants :

- rotations très rapides et mouvements de balancier, dans lesquels la molécule reste à sa place ;
- changements de place au sein de la même hémimembrane, par diffusion latérale ou translation ;
- passage d'une hémimembrane à l'autre (dénommé également « flip-flop » ou culbute) ; ce passage, peu fréquent (une fois par mois pour une molécule isolée), est catalysé par des enzymes membranaires, les translocases. Il peut requérir de l'énergie.



(a) Diversité des mouvements des lipides au sein de la membrane ; (b) effets du cholestérol sur la structure membranaire (contrôle de sa fluidité).

Facteurs de contrôle de la fluidité membranaire

- **La température**

Ce paramètre, lorsqu'il croît, favorise la rupture de liaisons faibles par l'agitation moléculaire et augmente ainsi la fluidité. À la température physiologique, une membrane est assimilée à un liquide. Si la température s'abaisse, sa viscosité augmente et elle a tendance à se figer, à se gélifier : elle s'apparente dans ce cas à un gel cristallin.

- **La composition lipidique**

Les **acides gras insaturés (AGI)** ont des chaînes aliphatiques « coudées » qui augmentent l'écartement entre deux chaînes voisines, ce qui diminue le nombre de liaisons de Van der Waals. Plus le degré d'insaturation est élevé, plus la température de gélification est basse.

Les organes végétaux qui sont exposés au froid hivernal présentent un changement de la composition lipidique de leur membrane à l'approche de la saison froide. L'augmentation de la teneur en AGI permet le maintien d'une fluidité membranaire à basse température. Les propriétés membranaires sont ainsi préservées et les fonctions cellulaires essentielles maintenues.

Le **cholestérol** qui s'intercale entre les phospholipides joue également un rôle essentiel, à deux titres. Dans les membranes riches en acides gras saturés (AGS), l'écartement qu'il induit entre chaînes aliphatiques diminue leurs interactions de Van der Waals et augmente ainsi la fluidité membranaire. À l'opposé, dans une membrane riche en AGI, il pont, de par sa forme, la portion proximale des chaînes aliphatiques d'AGI et la portion distale des chaînes aliphatiques des AGS ce qui augmente les liaisons intermoléculaires et diminue ainsi la fluidité.

Par exemple, la membrane apicale de l'entérocyte est beaucoup plus riche en glycolipides (capables de former des liaisons H intermoléculaires) et en cholestérol que la membrane basale, ce qui conduit à une moindre fluidité.

Les **endomembranes** d'une cellule ont une composition différente de celle de la membrane plasmique.

Elles sont en général plus pauvres en cholestérol ce qui peut autoriser une plus grande fluidité favorisant alors les flux membranaires.

Autres facteurs influençant la mobilité des protéines

- La mobilité d'une protéine intrinsèque est inversement corrélée à sa masse. Elle est aussi fortement diminuée par l'existence de liaisons avec les molécules adjacentes ou avec le cytosquelette.
- Des secteurs membranaires constituent des ensembles fonctionnels de protéines à l'extérieur desquels la diffusion est limitée, soit par des protéines de clôture (qui font obstacle à la diffusion des protéines situées à l'intérieur de l'aire), soit par de radeaux lipidiques (secteurs membranaires où les lipides constituent une phase gel).

ZOOM 2

Potentiel d'équilibre d'un ion ; loi de Nernst

Transfert actif ou passif d'un soluté : calcul de la variation d'enthalpie

Un **gradient transmembranaire** (chimique ou électrochimique) est une forme d'énergie que l'on peut évaluer sous forme d'une variation molaire d'enthalpie libre réactionnelle de transfert.

Le **potentiel électrochimique** μ_s d'un soluté chargé S caractérise son énergie potentielle. Il s'exprime de la façon suivante :

$$\mu_s = \mu_{s0} + R.T.\ln C_s + z.F.V \quad (7.1)$$

- μ_{s0} : potentiel électrochimique défini dans les conditions standards qui ne sont pas celles des cellules (pH = 0, température = 298 K, pression atmosphérique et concentrations de 1 mol.L⁻¹)
- Le terme R.T. ln C_s représente la **part chimique** du potentiel. R, constante des gaz parfaits (R = 8,31 J.K⁻¹.mol⁻¹) ; T, température (en K) ; ln le logarithme népérien (soit 2,3 log₁₀) ; C_s, concentration de S (en mol.L⁻¹)
- Le terme z.F.V représente la **part électrique** du potentiel. z, valeur algébrique de la charge de l'ion ; F, constante de Faraday (F = 96 500 C.mol⁻¹) ; V, potentiel électrique du milieu (en V).

La **variation d'enthalpie libre ou ΔG'** du flux sortant de la substance S (car on se réfère à un pH de 7) est égale à la différence de potentiel électrochimique mise en jeu lors du passage de S du cytoplasme (i) vers le milieu extracellulaire (e). La relation 7.1 conduit ainsi à écrire :

$$\Delta G'_{i \rightarrow e} = \mu_e - \mu_i = R.T.\ln (C_{se}/C_{si}) + z.F.(V_e - V_i) \quad (7.2)$$

C_{se} et C_{si} : concentrations molaires du soluté S dans chaque milieu

E_e et E_i : potentiels électriques (en V) de chaque face de la membrane.

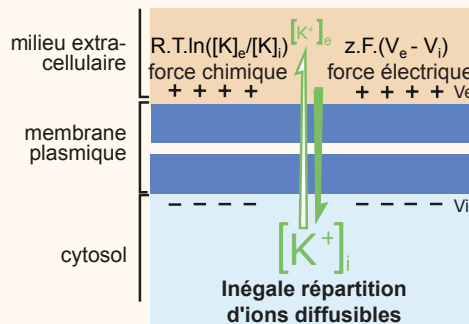
Le premier terme, R.T.ln(Ce/Ci), est l'énergie du transfert liée à la différence de potentiel chimique ; le second, z.F.(Ve - Vi), est lié à la différence de potentiel électrique.

- Si ΔG'_{i→e} < 0, le transfert de S vers l'extérieur de la cellule est exergonique (**transport passif**).
- Si ΔG'_{i→e} > 0, S ne peut sortir que par un **transport actif**.

Pour un soluté non chargé, le raisonnement est le même ; le calcul de la variation d'enthalpie libre du transfert est basé sur la formule (7.2) avec une contribution électrique nulle.

$$\Delta G'_{i \rightarrow e} = \mu_e - \mu_i = R.T.\ln (C_{se}/C_{si}) \quad (7.3)$$

Membrane perméable ou non à un ion : calcul du potentiel d'équilibre de l'ion



L'inégale répartition des ions de part et d'autre d'une membrane biologique, et l'existence d'une ddp électrique (potentiel de membrane) entraîne un gradient électrochimique pour les ions. Par exemple, les ions K^+ sont alors soumis à deux composantes opposées : une force, de nature chimique et l'autre, de nature électrique. Si ces deux forces sont exactement opposées, un état d'équilibre est instauré : le flux net de K^+ est nul et une ddp transmembranaire stable est établie. Appelée **potentiel d'équilibre de l'ion** considéré, ici K^+ , elle est notée E_{K^+} .

En utilisant les données ci-dessus relatives au potentiel électrochimique (noté μ), on peut caractériser la situation d'équilibre par la relation $\mu_i - \mu_e = 0$ et déduire de la relation 7.2 la valeur du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ :

$$E_{K^+} = (V_e - V_i)_{eq} = \frac{-R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[K]_e}{[K]_i} \quad (7.4)$$

C'est l'**équation de Nernst** qui permet de calculer la valeur du potentiel d'équilibre pour un ion, indépendamment de tous les autres. Plus le potentiel de membrane est proche du potentiel d'équilibre d'un ion, plus la membrane est perméable à cet ion. Le flux passif d'un ion à travers une membrane se fait dans le sens qui permet de rapprocher le potentiel de membrane du potentiel d'équilibre. Ainsi pour K^+ , si le potentiel de repos d'une cellule est $\Delta V \approx -70$ mV, et le potentiel d'équilibre $E_{K^+} \approx -80$ mV, le flux passif de K^+ est sortant (un efflux de charges positives diminue le potentiel de membrane).

Si le potentiel de membrane est différent du potentiel d'équilibre d'un ion donné, et s'il existe dans la membranes des canaux perméables à cet ion, alors il s'établit un courant de cet ion, dont l'intensité i_{ion} est donnée par la relation : $i_{ion} = g_{ion} (\Delta V_m - E_{ion})$ avec ΔV_m , potentiel de membrane et E_{ion} , potentiel d'équilibre de l'ion (tous les deux en V).

g_{ion} est la **conductance** de la membrane à l'ion considéré (inverse de la résistance électrique).

Si les concentrations de n ions de part et d'autre d'une membrane demeurent stables, alors le potentiel de membrane peut se calculer par la relation :

$$\Delta V_m = \frac{\sum g_{ion(n)} \cdot E_{ion(n)}}{\sum g_{ion(n)}} \quad (7.5)$$

ZOOM 3

Protéines et échanges membranaires de l'entérocyte

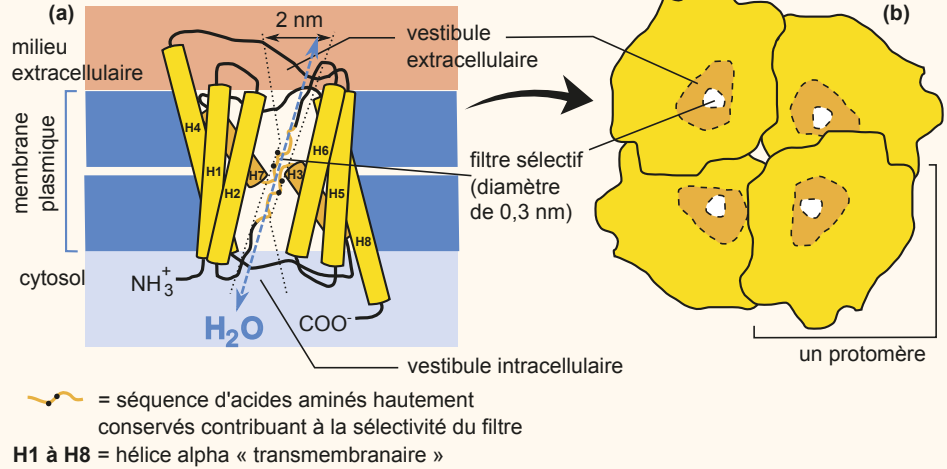
Les caractéristiques de ces différentes protéines membranaires sont liées aux modalités des échanges et expliquent leur sélectivité.

Les aquaporines : diffusion facilitée de l'eau à travers des canaux

Les flux d'eau se font dans le sens des potentiels hydriques décroissants. Les aquaporines sont des protéines de la membrane de l'entérocyte constituées de 4 sous-unités. Chaque sous-unité présente un filtre de sélectivité ménageant un pore de diamètre légèrement supérieur au diamètre des molécules d'eau (0,15 nm). Les molécules d'eau circulent en « file indienne » en établissant des liaisons H avec les acides aminés de sélectivité.

Sur la face cytosolique, des sites de phosphorylation permettent un contrôle du flux par modification de l'ouverture du canal.

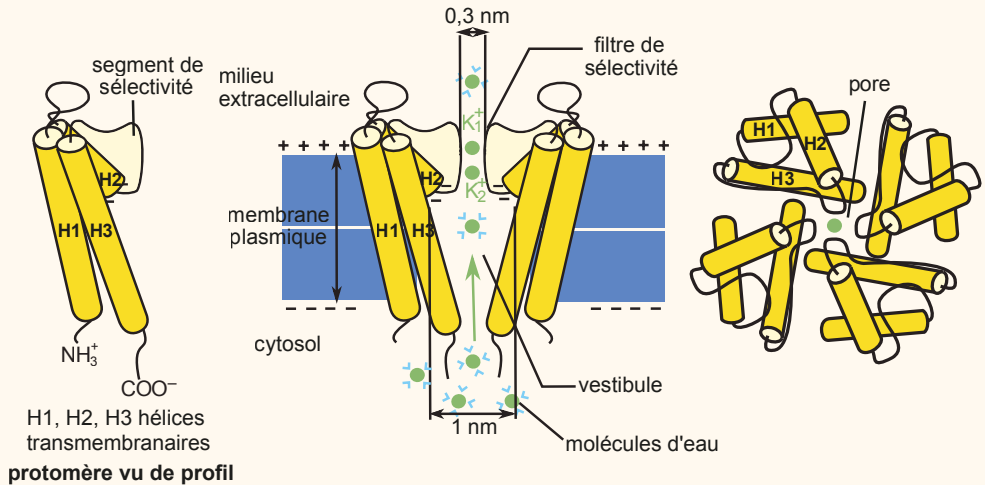
(a) organisation en « sablier » d'un protomère (vu de profil) ;
 (b) tétramère d'aquaporine de type AQP 1 (vue de dessus)



Modèle d'organisation d'une aquaporine.

Les canaux de fuite de K^+ : diffusion facilitée des ions

Les flux d'ions se font dans le sens qui rapproche le potentiel de membrane de leur potentiel d'équilibre (flux sortant pour K^+). Ces canaux sont 10 000 fois plus perméables à K^+ qu'à Na^+ .

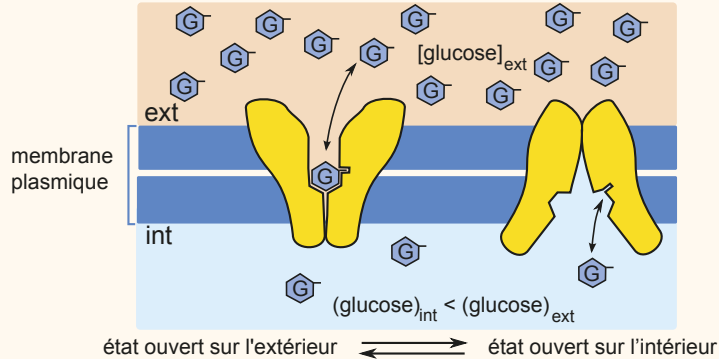


Modèle d'organisation d'un canal de fuite à K^+ .

Les 4 sous-unités de ces protéines ménagent un vestibule intramembranaire dont les surfaces sont tapissées de radicaux anioniques qui attirent les ions K^+ sous leur forme hydratée. Attirés ensuite par les charges négatives des segments de sélectivité et désolvatés, ils passent à l'état anhydre dans la partie rétrécie du canal où il existe deux sites de liaison de K^+ . Lorsqu'un K^+ arrive depuis le vestibule (K_2^+ sur la figure), il chasse dans le pore celui qui se trouve déjà engagé (K_1^+), par simple répulsion électrique.

La perméase GLUT : diffusion facilitée du glucose

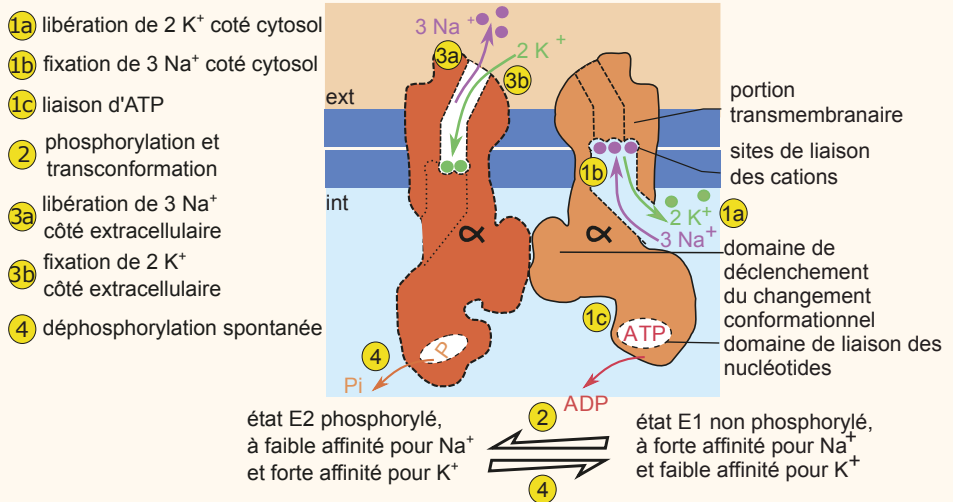
Les flux de glucose se font dans le sens des concentrations décroissantes. La perméase est une protéine de la membrane basale de l'entérocyte agencée en un cylindre dont le centre constitue un canal hydrophile. Elle fixe spécifiquement le glucose ce qui entraîne son changement de conformation (modèle de « ping-pong »). Une seule substance est transportée : c'est un **uniport**. Transport de vitesse modeste (de 100 à 1 000 molécules par perméase et par seconde) mais de très grande sélectivité.



Modèle de diffusion facilitée du glucose assurée par la protéine GLUT.

La pompe Na⁺/K⁺ ATP dépendante : transport actif primaire

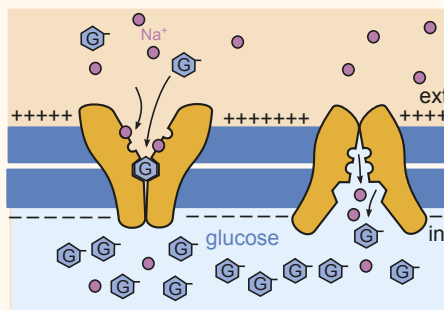
Le transport se fait contre un gradient électrochimique ; il est consécutif à un changement de conformation qui consomme de l'énergie (hydrolyse de l'ATP ; couplage chimiosmotique) : c'est un processus irréversible. Cette protéine des membranes latérales et basale de l'entérocyte est constituée de 4 sous-unités (2 α et 2 β qui servent essentiellement à stabiliser la pompe dans la membrane et ne sont pas représentées sur le schéma). Les deux sous-unités α passent d'un état non phosphorylé (E1, représenté à droite) à un état phosphorylé (E2, à gauche). Elles fixent spécifiquement 3 Na⁺ ou 2 K⁺ sur des sites de leur domaine transmembranaire. 3 Na⁺ sont échangés contre 2 K⁺ : c'est un **antiport**. Un domaine de phosphorylation module l'activité de la pompe.



Modèle de fonctionnement de la pompe Na⁺/K⁺ ATP dépendante.

Le symport Na⁺/glucose : transport actif secondaire

Cette protéine de la membrane apicale de l'entérocyte fixe spécifiquement Na⁺ et le glucose. Ces deux substances sont transportées ensemble vers l'intérieur de la cellule : c'est un **symport** résultat du couplage du flux entrant de Na⁺ selon son gradient électrochimique (flux exergonique) au flux entrant de glucose contre son gradient de concentration (flux endergonique). C'est un couplage osmochimique.



Modèle de fonctionnement du cotransport Na⁺/glucose.

Voir chapitre 1,
§ 2.5

Toutes les protéines membranaires présentées ici sont largement répandues dans les cellules animales. Seul le symporteur Na⁺/glucose est localisé de façon plus restreinte ; il existe aussi dans les cellules du tubule rénal des mammifères.

ZOOM 4**Importance des transports cytotiques****Exocytose**

On distingue deux grandes modalités d'exocytose.

- **L'exocytose constitutive**, processus spontané permanent, est observée dans toutes les cellules eucaryotes ; elle permet notamment l'entretien de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire. Les cellules végétales réalisent de l'exocytose lors de leur croissance par apposition de molécules sur la face interne de leur paroi.
- **L'exocytose contrôlée** correspond à une sécrétion exocrine (vers une cavité ouverte sur le milieu extérieur) ou endocrine (vers le sang). Elle est déclenchée par la stimulation des cellules par un messenger intercellulaire. C'est ainsi que les enzymes digestifs sont libérées dans la lumière du tube digestif lors du passage des aliments en cours de digestion. L'exocytose contrôlée contribue aussi à la communication intercellulaire : l'arrivée de l'influx nerveux à l'extrémité d'un neurone déclenche l'exocytose d'un neurotransmetteur, messenger chimique de proximité, qui agit sur la cellule cible du message nerveux.

Endocytose

L'endocytose au sens strict permet l'incorporation de grosses molécules dont le passage individuel par transport membranaire est impossible.

Voir ouvrage
de 2^e année

La **phagocytose** est une forme particulière d'endocytose qui permet l'incorporation de particules alimentaires pouvant atteindre 1 à 2 μm , par les organismes eucaryotes unicellulaires (paramécies, amibes). Ce processus fait intervenir les filaments d'actine placés juste sous la membrane, dans la capture de la particule. La vésicule endocytée, est ensuite associée à un lysosome, constituant un phagolysosome dont le contenu est digéré grâce aux hydrolases lysosomiales. Un processus semblable est engagé dans l'immunité (phagocytose réalisée par les macrophages).

Exocytose et endocytose associées

- L'endocytose compense l'augmentation de surface membranaire induite par l'exocytose constitutive ou provoquée et inversement.
- La transcytose, qui associe l'endocytose à un pôle de la cellule et l'exocytose à un autre, est un mode de transport courant dans les cellules endothéliales des capillaires, où il permet le transfert de grosses molécules entre le plasma et la lymphe interstitielle.
- L'exocytose comme l'endocytose permettent de contrôler le nombre de récepteurs présents sur la membrane plasmique et donc la réactivité d'une cellule cible à un message. Des vésicules proches de la périphérie cellulaire constituent des réserves de récepteurs de certains messagers hormonaux (insuline). Une exocytose rapide permet d'exposer ces récepteurs et de les rendre fonctionnels. Une endocytose impliquant le secteur de la plasmalemma dans lequel ils sont insérés les rend momentanément inactifs.

Voir ouvrage
de 2^e année

Réviser

Résumé

Classification simplifiée des principaux transports

Type de transport	Profil thermodynamique	Support moléculaire et modalité de transport (voir figure de synthèse)		Substances transportées (exemple de transporteur)
Transports individuels transmembranaires	Transport passif $\Delta G' < 0$ selon le gradient chimique ou électrochimique	Bicouche lipidique. Diffusion simple à cinétique linéaire (loi de Fick)		Gaz dissous Eau Molécules liposolubles
		Protéine transmembranaire Diffusion facilitée à cinétique hyperbolique	Protéine canal non saturable dans les conditions physiologiques	Eau (<i>aquaporine</i>) Ions (<i>canaux de fuite, canaux à porte</i>)
			Protéine porteuse saturable	Petites molécules polaires : oses (<i>GLUT</i>), acides organiques, ions
	Transport actif $\Delta G' > 0$ contre le gradient chimique ou électrochimique	Protéine membranaire porteuse saturable à cinétique hyperbolique		Petites molécules polaires : oses, acides organiques, ions (<i>pompe Na^+/K^+</i>)
Transports en masse par vésicules closes	Transports cytotiques : endocytose, exocytose et transcytose Leur mise en œuvre requiert toujours une dépense énergétique			Macromolécules

Attention

- En physique, le terme de transport désigne un transfert irréversible d'une entité physique (énergie, matière...) consécutif au caractère inhomogène du milieu.
- Les solutés neutres diffusent selon leur gradient de concentration mais, pour les solutés chargés, il faut évaluer le gradient électrochimique.
- Il n'y a pas de transports actifs d'eau.
- Lorsque vous évaluez la variation d'enthalpie libre associée au transfert d'une substance au travers d'une membrane, prenez soin alors d'identifier en indice le sens du transfert pour en déduire le sens spontané du transfert de cette substance.
- Sachez distinguer les transports individuels actifs et les transports diffusifs suivant des critères énergétiques.
- Sachez également distinguer différents types de transports diffusifs en fonction de leur cinétique.

S'entraîner

QCM de connaissances

- 1 Le cholestérol :
 - a. N'est présent que dans l'hémimembrane externe.
 - b. Est un facteur de contrôle de la fluidité membranaire.
 - c. Augmente la vitesse de diffusion latérale des lipides membranaires.
 - d. Diminue la vitesse de diffusion latérale des lipides membranaires.
- 2 La fluidité membranaire :
 - a. Est principalement due au fait que les phospholipides peuvent passer rapidement d'une couche lipidique à l'autre.
 - b. Est principalement due à la mobilité latérale des différents types de protéines qui s'y trouvent.
 - c. Est corrélée à la concentration en cholestérol d'une membrane riche en phospholipides à acides gras saturés.
 - d. Diminue quand la température augmente.
- 3 À propos de la perméabilité membranaire :
 - a. L'eau diffuse plus rapidement que les ions à travers la membrane plasmique.
 - b. Le transfert d'eau par des aquaporines est actif.
 - c. Un transport actif s'effectue dans le sens du potentiel électrochimique décroissant.
 - d. La valeur du potentiel hydrique est toujours inférieure ou égale à zéro.
- 4 Une perméase :
 - a. S'appelle aussi un canal ionique.
 - b. Est une protéine membranaire qui lie temporairement la substance transportée.
 - c. Permet des transferts indépendants du gradient électrochimique.
 - d. Assure une diffusion avec une cinétique saturable.

- 5 La valeur du potentiel de repos d'une cellule animale a été mesurée à la température de 37 °C : $V_{\text{rep}} = 90 \text{ mV}$. On connaît aussi les concentrations extracellulaire et intracellulaire de Na^+ : $[\text{Na}^+]_e = 150 \text{ mmol.L}^{-1}$ et $[\text{Na}^+]_i = 5 \text{ mmol.L}^{-1}$. On donne $\ln(30) \approx 3,5$. Quelles sont les affirmations exactes ?
- a. D'après la relation 7.2 du zoom 2, la variation d'enthalpie libre associée à la sortie de Na^+ vers le milieu extracellulaire est $\Delta G'_{i \rightarrow e} \approx -17,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$.
 - b. La sortie de Na^+ vers le milieu extracellulaire est endergonique.
 - c. L'entrée de Na^+ dans la cellule depuis le milieu extracellulaire est exergonique.
 - d. Certains des flux transmembranaires de Na^+ peuvent se faire par diffusion simple.
- 6 Utilisez les valeurs du **tableau 7.1** pour calculer les potentiels d'équilibre des ions Na^+ et K^+ . Pour un cation monovalent ($z = 1$), $\frac{RT}{zF} \approx 0,025 \text{ U.I.}$ et $\ln(x) \approx 2,3 \cdot \log_{10}(x)$.
- a. Les valeurs des potentiels d'équilibre sont données par la loi de Fick.
 - b. $E_{\text{Na}^+} \approx -60 \text{ mV}$ et $E_{\text{K}^+} = -90 \text{ mV}$.
 - c. $E_{\text{Na}^+} \approx +60 \text{ mV}$ et $E_{\text{K}^+} = -90 \text{ mV}$.
 - d. $E_{\text{Na}^+} \approx -60 \text{ mV}$ et $E_{\text{K}^+} = +90 \text{ mV}$.
 - e. $E_{\text{Na}^+} \approx +60 \text{ mV}$ et $E_{\text{K}^+} = +90 \text{ mV}$.
 - f. Aucune de ces valeurs n'est exacte.

QCM à partir de documents

- 1 Des ARNm codant une aquaporine des hématies (AQP1) sont injectés dans des ovocytes de xénope. Après quelques heures, la concentration du milieu est diminuée. On suit la vitesse du gonflement de l'ovocyte en fonction du temps (**figure 7.9**). La croix représente le moment où la rupture de la cellule est constatée. Deux autres expériences similaires sont réalisées, l'une sur des ovocytes ayant reçu le même traitement et préincubés en présence d'un agent dénaturant (HgCl_2) avant diminution de l'osmolarité du milieu, l'autre sur des ovocytes n'ayant pas reçu de l'ARNm codant l'AQP1 ($-AQP1$).

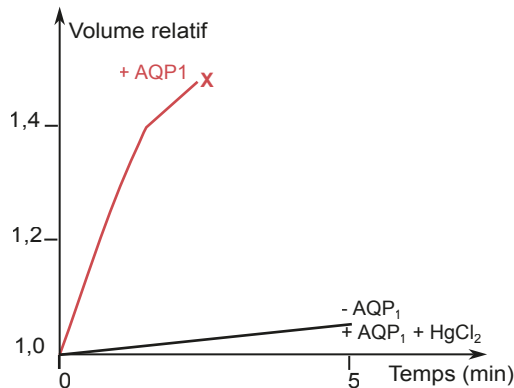


Figure 7.9 Gonflement d'ovocytes de xénope après diminution de l'osmolarité extracellulaire.

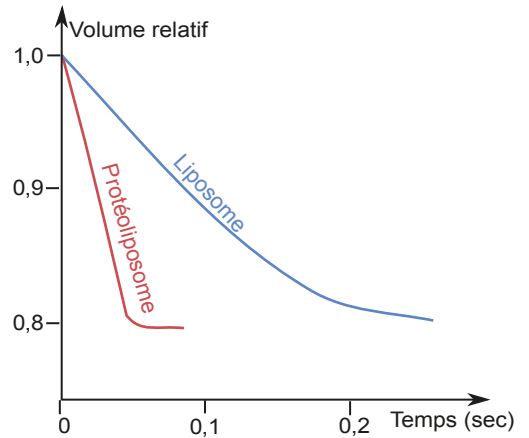
(d'après E. Schechter, *Biochimie et biophysique des membranes*, Dunod).

- Parmi les affirmations ci-dessous, lesquelles sont exactes ?
- a. La diminution de la concentration du milieu permet d'abaisser son potentiel hydrique.
 - b. Le protocole permet d'étudier l'influence de HgCl_2 sur la perméabilité membranaire.
 - c. Le lot ($-AQP1$) est un témoin négatif.
 - d. Le volume des ovocytes augmente à la suite d'une synthèse de composés membranaires.
 - e. L'injection d'ARNm codant l'aquaporine permet aux ovocytes d'exprimer cette protéine dans sa membrane plasmique.
 - f. L'aquaporine AQP1 non dénaturée augmente la diffusion de l'eau à travers la membrane des ovocytes.

- 2 La figure 7.10 traduit l'évolution du volume des liposomes et des protéoliposomes reconstitués avec la protéine AQP1 (aquaporine d'hématie) ayant subi un transfert dans une solution de potentiel hydrique bien plus faible que celui de leur contenu (choc hyperosmotique).

Figure 7.10 Évolution du volume de liposomes et de protéoliposomes après transfert en milieu hyperosmotique.

(d'après E. Schechter, *Biochimie et biophysique des membranes*, Dunod).



Parmi les affirmations ci-dessous, lesquelles sont exactes ?

- a. Le volume relatif s'exprime en cm^3 .
- b. Le protocole teste l'hypothèse d'une éventuelle interaction entre AQP1 et une autre protéine membranaire.
- c. Le volume relatif diminue à la suite de la diffusion de l'eau dans le sens des potentiels hydriques croissants.
- d. La perméabilité à l'eau des protéoliposomes est supérieure à celle des liposomes.
- e. L'aquaporine active une autre protéine membranaire, ce qui favorise les flux hydriques.

Question de synthèse courte

Importance des protéines dans les échanges membranaires.

Sujet sur documents (analyse et mise en relation)

La bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine que l'on trouve chez certaines archées vivant dans des eaux extrêmement salées, comme le genre *Halobacterium*. Elle est formée de trois sous-unités identiques.

- 1 a. Que représente un profil d'hydrophobicité ?
 b. Analysez les résultats de la figure 7.11 et formulez des hypothèses quant à la localisation cellulaire de la bactériorhodopsine.

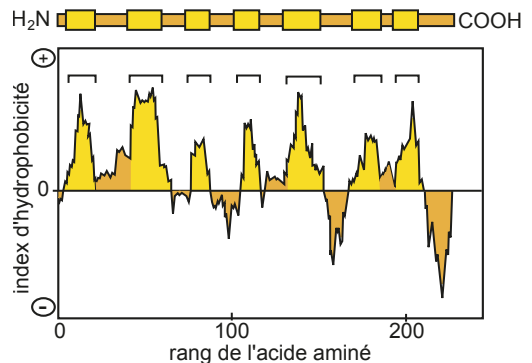


Figure 7.11 Profil d'hydrophobicité d'une des sous-unités de la bactériorhodopsine ;

(d'après B. Alberts & al., *Molecular biology of the cell*, 4th ed. 2002).

Voir chapitre 9, § 4.1

- 2 L'observation en microscopie électronique à haute résolution de la membrane plasmique d'une archée des milieux salés révèle des structures représentées sur la [figure 7.12](#) qui ne sont pas observées chez d'autres bactéries dépourvues de bactériorhodopsine. En intégrant l'interprétation donnée à la question 1, proposez un schéma d'une disposition de la bactériorhodopsine dans la membrane.

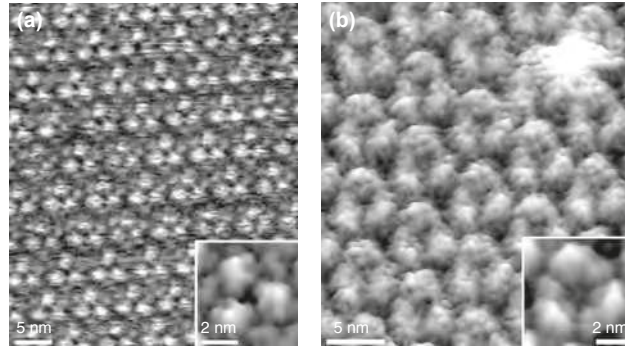


Figure 7.12 Observation en microscopie électronique à haute résolution de la membrane plasmique de *Halobacterium salinarum* : (b) face extracellulaire ; (c) face cytoplasmique. (Reproduit de D.J. Müller & A. Engel, *Nature Protocols* 2, 2191 – 2197, 2007).

- 3 Lorsque des cellules de *Halobacterium* sont placées à la lumière dans un milieu faiblement oxygéné, leur membrane devient pourpre. Interprétez cette observation à l'aide des résultats de la [figure 7.13](#).

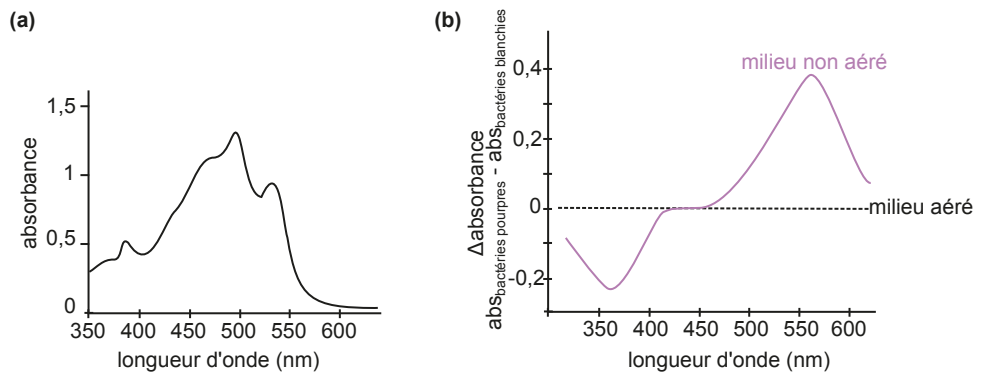


Figure 7.13. (a) Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine ; (b) différence entre l'absorbance de préparation de membranes de *Halobacterium halobium* pourpres ou non (blanchies) dans un milieu non aéré et bien aéré.

(D'après A. Danon et W. Stoeckenius, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* Vol. 71, No. 4, April 1974).

- 4 Des archées *Halobacterium* sont cultivées dans un milieu peu oxygéné. Dans ces conditions, le renouvellement de l'ATP cellulaire par la respiration aérobie n'est pas possible.
- Analysez l'effet de la lumière sur la teneur en ATP des cellules ([figure 7.14](#)).
 - Proposez un mécanisme à l'origine de ces variations en tenant compte des observations suivantes :
 - à la lumière, dans un milieu faiblement aéré, le milieu intracellulaire est 10 000 fois plus alcalin que le milieu extracellulaire ;

– l'ajout d'agents découplants (substances qui augmentent la perméabilité membranaire aux H^+) supprime l'effet de la lumière.

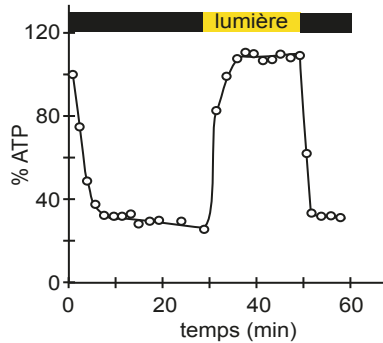


Figure 7.14 Contenu cellulaire en ATP chez *Halobacterium salinarum* dans un milieu peu oxygéné et dans différentes conditions d'éclairnement.

(D'après A. Danon et W. Stoeckenius, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, USA, 1974).

Le pourcentage d'ATP est égal à la quantité d'ATP au temps t rapportée à la quantité d'ATP à $t=0$.

- 2 Chaque monomère de bactériorhodopsine est lié par liaison covalente à une molécule de rétinol. Sous l'effet de certaines longueurs d'onde, cette molécule change de conformation et passe d'une forme tout trans protonée à une forme 13-cis protonée (figure 7.15). La forme 13-cis protonée du rétinol devient capable de céder un proton (lié au N^+) à un acide aminé (noté A85) de la bactériorhodopsine ; elle est alors reprotonée par un autre acide aminé (A96) de la bactériorhodopsine, puis retrouve sa conformation tout trans.
- L'acide aminé A85 expulse son proton vers l'extérieur de la cellule.
- L'acide aminé A96 récupère un proton de l'intérieur de la cellule.
- À l'aide de ces informations, précisez le rôle de la bactériorhodopsine dans la synthèse d'ATP.

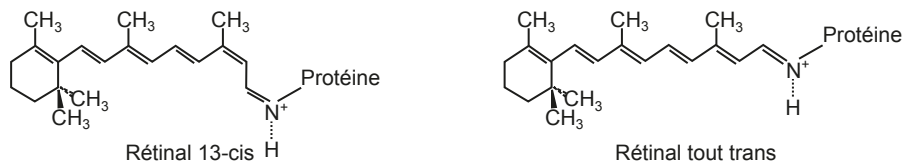


Figure 7.15 Le rétinol.

- 3 Résumez en quelques phrases ce que vous avez appris à l'aide de ces documents.

Observation de cellules aux microscopes

Activités pratiques

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Observation de cellules eucaryotes
- 2 Observation de cellules bactériennes
- 3 Observation d'interactions entre bactéries et cellules racinaires

INTRODUCTION

L'observation de la **structure** des tissus et des cellules se fait par la microscopie photonique ou optique (MO) à partir de montages réalisés durant les séances de travaux pratiques, ou de préparations du commerce. L'**ultrastructure** fait appel à la microscopie électronique à transmission et à balayage (MET/MEB) ; les observations sont alors réalisées à partir de clichés provenant de la littérature scientifique.

Ces deux échelles permettront de relier l'organisation des cellules eucaryotes ou bactériennes, avec leurs fonctions, et de mettre en évidence des interactions entre des bactéries et des cellules de la racine.

1 Observation de cellules eucaryotes

1.1 Au microscope photonique

a) Observer avec ou sans coloration

Les observations en microscopie photonique sont réalisées à partir de préparations (objets peu épais ou coupes) :

- montages réalisés par vos soins, entre lame et lamelle, après avoir été traités ou non par l'une des colorations usuelles (tableau 6.1) ;
- coupes histologiques du commerce, diversement colorées et fixées sur la lame.

Tableau TP6.1 Colorants principaux utilisés lors des TP de BCPST.

Types	Colorants	Structure(s) mise(s) en évidence
Colorants vitaux	Rouge neutre	Colore en rose la vacuole.
	Bleu de méthylène	Colore le noyau et le collagène des MEC en bleu.
Colorants non vitaux	Eau iodée ou Lugol	Colore en brun le glycogène et en violet l'amidon.
	Carmino-vert de Mirande	Colore en rose les parois pectocellulosiques, en vert les parois lignifiées et en jaune les parois cutinisées et subérisées.
	Vert de méthyl acétique	Colore en vert l'ADN des chromosomes.
	Pyronine	Colore en rose les ARN.
	Bleu coton lactique	Colore en bleu les parois renfermant de la chitine et de la callose.

Voir TP5, § 1.3

Sur une coupe non colorée, seuls sont observables les constituants cellulaires pigmentés (ou présentant un fort contraste) comme les chloroplastes de la [figure TP6.1a](#). Une coupe colorée donne davantage de critères d'identification des tissus, comme la nature des parois cellulaires pour la coloration au carmino-vert de Mirande des tissus végétaux. Ainsi une coloration est très souvent nécessaire pour distinguer les structures des tissus (membrane, noyau, caractéristiques du cytoplasme, des matrices extracellulaires) comme sur la [figure TP6.1b](#).

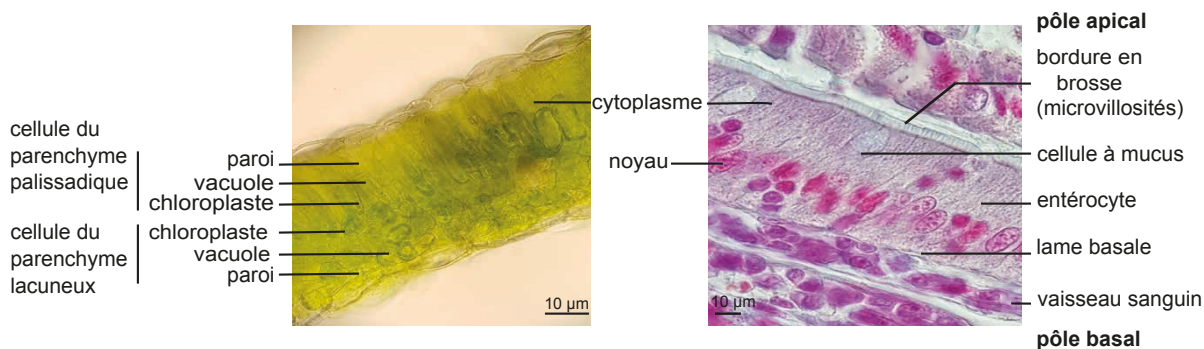


Figure TP6.1 (a) Observation des cellules du parenchyme chlorophyllien sur une coupe non colorée de feuille de luzerne (MO ×400) ; (b) observation des entérocytes sur une préparation du commerce de l'épithélium intestinal colorée au trichrome de Masson (MO ×1 000)

Ces préparations permettent de dégager les différences cytologiques accessibles à ce grossissement entre cellules animales et végétales.

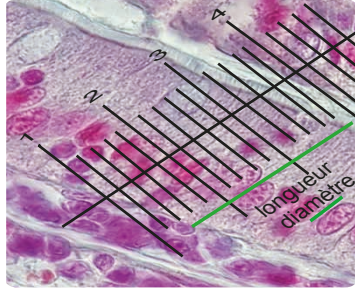
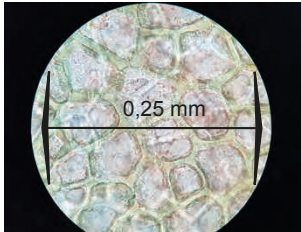
Tableau TP6.2 Comparaison d'un entérocyte et d'une cellule chlorophyllienne observés sur la figure TP6.1.

Points communs			
Volume délimité par une membrane. Cellules intégrées dans un tissu. Cytoplasme avec différents compartiments.		Caractères d'une cellule eucaryote.	
Différences			
Caractères visibles sur la figure TP6.1a		Caractères visibles sur la figure TP6.1b	
Paroi autour de la cellule de forme parallélépipédique.	Une cellule végétale	Lame basale	Une cellule animale
Cellule non polarisée avec des chloroplastes.	Une cellule photosynthétique	Cellule polarisée (pôle basal ; pôle apical)	Une cellule épithéliale
		Membrane apicale avec « bordure en brosse »	Cellule aux fonctions d'absorption

b) Évaluer les dimensions des objets observés

La seule connaissance du **grossissement au microscope** (produit du grossissement de l'oculaire par celui de l'objectif) ne permet pas de connaître les dimensions de l'objet observé. Celles-ci peuvent être estimées selon plusieurs méthodes ([tableau TP6.3](#)).

Tableau TP6.3 Les méthodes d'évaluation des dimensions des structures observables au microscope photonique.

Méthode 1. Utilisation de l'échelle d'une micrographie	
À partir d'un cliché avec une échelle, il faut mesurer la dimension de l'objet sur l'image et appliquer la règle de proportionnalité pour calculer la dimension réelle.	L'entérocyte mesure environ 4,5 cm de longueur sur la figure TP6.4b ; avec une échelle de 1 cm pour 10 μm , on en déduit que la cellule mesure environ 45 μm .
Méthode 2. Utilisation d'un oculaire micrométrique	
Il est possible d'équiper un microscope photonique d'un oculaire micrométrique (lentille du microscope au contact de l'œil comportant des graduations). Il doit être calibré en utilisant une lame micrométrique, qui donne la correspondance graduation-dimension. L'estimation des dimensions se fait alors par lecture directe.	<p>Dans l'exemple de la figure TP6.2, la calibration préalable au grossissement $\times 1\,000$, a montré que la distance entre deux graduations équivaut à 20 μm. L'épaisseur l de l'épithélium est de $2,5 \times 20$ soit 50 μm. Le diamètre d des noyaux est environ de $0,6 \times 20$ soit 12 μm.</p> 
Figure TP6.2 Estimation des dimensions avec un oculaire micrométrique	
Méthode 3 : Utilisation du diamètre du champ de l'oculaire	
En l'absence d'oculaire micrométrique, il est possible d'évaluer le diamètre du champ oculaire correspondant à chaque grossissement du microscope. Pour cela, on peut d'abord observer une règle graduée au faible grossissement. Si par exemple, le diamètre du champ oculaire au grossissement $\times 60$ mesure 2,5 mm, on peut estimer qu'au grossissement $\times 600$, le diamètre du champ oculaire est environ 10 fois plus faible (0,25 mm). Ainsi, ces cellules de l'épiderme de tomate ont un diamètre de l'ordre de $1/5$ de 0,25 soit 0,05 mm.	
Figure TP6.3 Estimation de la taille des cellules à partir du diamètre du champ oculaire (MO $\times 60$)	

c) Rendre compte des observations par un schéma

La réalisation de dessins légendés permet de rendre compte de l'interprétation des différentes structures. Il doit être accompagné d'une indication de son **grandissement** (rapport entre la dimension du dessin et la dimension réelle de l'objet) ou d'une échelle. Le grandissement des schémas de la [figure TP6.4](#) sont alors de $\times 333$ et $\times 1\,000$.

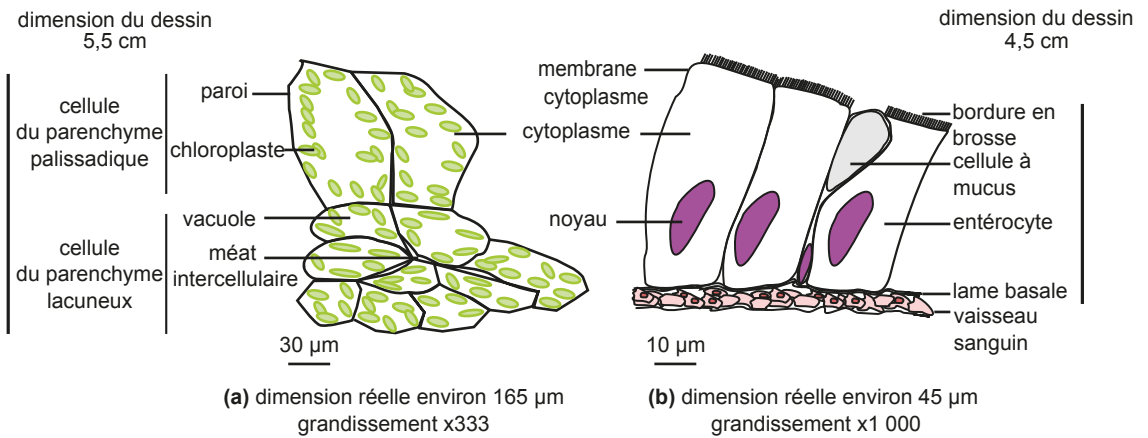


Figure TP6.4 Dessins d'interprétation et grandissement des micrographies de la figure TP6.1.

(a) Cellules chlorophylliennes de la feuille ; (b) cellules de l'épithélium intestinal.

d) Interpréter les observations des préparations

Les objectifs de l'étude microscopique sont très divers ; voici quelques exemples d'interprétation des observations de la figure TP6.1.

- **Identifier le tissu observé en (a)**, l'assise cellulaire d'une épaisseur estimée de 50 μm, composée de plusieurs catégories de cellules, majoritairement des entérocytes et des cellules à mucus forme un **épithélium** qui sépare la lumière de l'intestin et le milieu interne de l'organisme.
- **Identifier l'organe en (b)**, la présence de cellules chlorophylliennes dans un organe aplati nous indique qu'il s'agit d'une **feuille**.
- **Définir la position systématique de l'organisme en (b)**, le parenchyme chlorophyllien hétérogène constitué d'un mésophylle palissadique et d'un mésophylle lacuneux est caractéristique d'une **angiosperme dicotylédone**.
- **Relier les caractéristiques structurales des cellules à leurs fonctions en (a)**, les entérocytes sont jointives et forment une frontière qui empêche la circulation intercellulaire à travers l'épithélium. Le pôle apical présente une bordure en brosse, composée de microvillosités qui développent une très grande surface d'échange propice à l'**absorption des nutriments**.

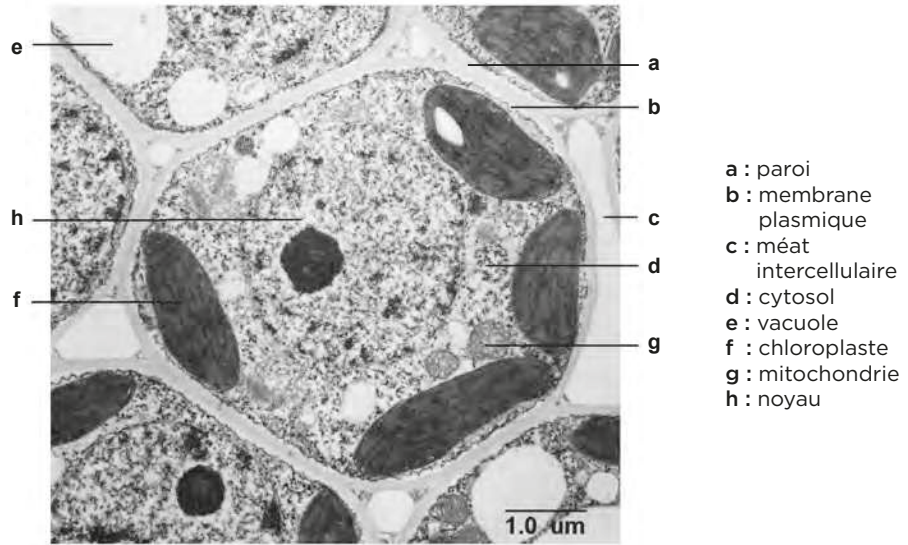
1.2 Au microscope électronique

Les observations au microscope électronique à transmission (MET) permettent de définir l'ultrastructure et de compléter l'étude de l'organisation des cellules. À partir de l'exemple de la figure TP6.5, une méthode d'étude peut être proposée.

a) Repérer les limites cellulaires

Différentes **limitantes** séparent les milieux intracellulaire et extracellulaire :

- la paroi (a) apparaît en épaisseur à l'extérieur de la cellule, en contact avec des méats intercellulaires (c) ;
- la membrane plasmique (b) simple trait noir à ce grossissement est plaquée contre la paroi et peut se décoller localement (artéfact), ce qui facilite sa mise en évidence ;
- le cytosol délimité par la membrane plasmique est hétérogène avec des polysomes (d).



- a : paroi
- b : membrane plasmique
- c : méat intercellulaire
- d : cytosol
- e : vacuole
- f : chloroplaste
- g : mitochondrie
- h : noyau

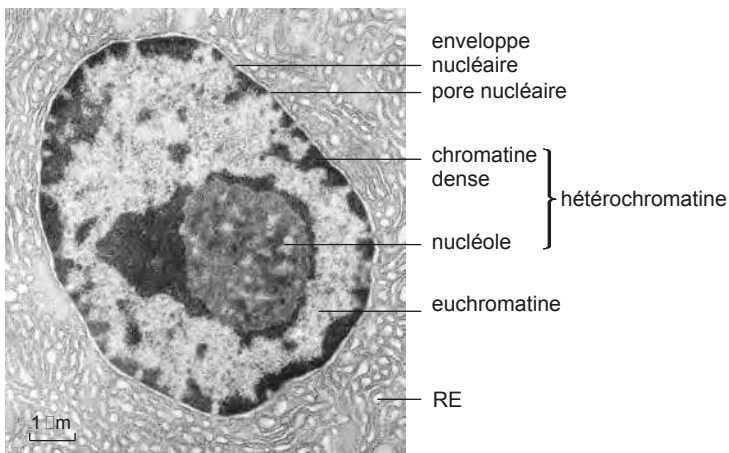
Figure TP6.5 Structures identifiables de la cellule chlorophyllienne observée au MET.

(Source : <https://www.sciencesource.com/archive/Image/Mesophyll-Cell--TEM--SS2385317.html>).

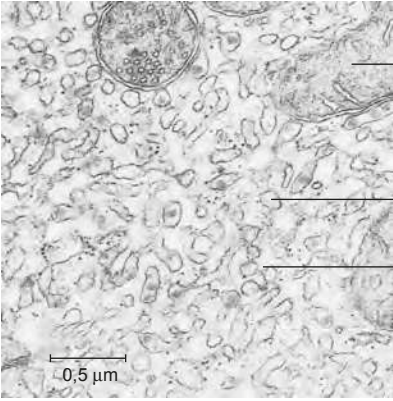
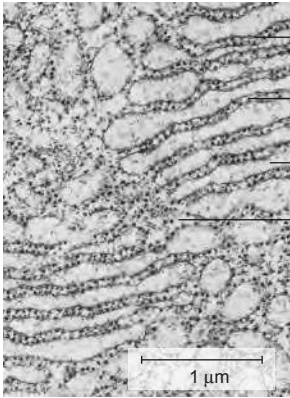
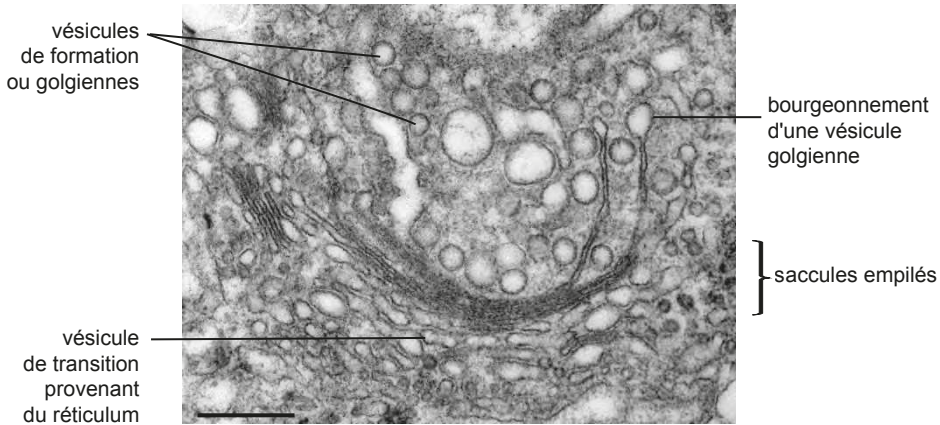
b) Identifier les organites

Dans le cytosol les organites sont identifiables par leur dimension, leur forme, la présence éventuelle de membrane (et leur nombre), leur hétérogénéité interne. Sur les clichés de la [figure TP6.6](#), on peut observer des organites qui étaient moins repérables à plus faible grossissement, et notamment :

- le noyau volumineux et hétérogène avec l'euchromatine peu dense et l'hétérochromatine dense ; le nucléole, très dense aux électrons est ici bien visible (a) ;
- les chloroplastes (f) denses et renfermant des thylakoïdes aplatis caractéristiques ;
- les mitochondries (g) reconnaissables par leurs crêtes dans la matrice ;
- la vacuole qui apparaît sous forme d'une grande zone claire (e).



(a) L'enveloppe nucléaire comprend deux membranes en continuité avec celle du RE ; elle sépare le cytoplasme du nucléoplasme.
(Cliché Labo. BG et BC4, Orsay, « Biologie cellulaire » J.-C. Callen 2^eéd Dunod, 2005).

 <p>mitochondrie</p> <p>réticulum endoplasmique lisse</p> <p>cytosol</p> <p>0,5 µm</p>	<p>(b) Réticulum endoplasmique lisse (REL) ; cavités tubulaires délimitées par une membrane dépourvue de ribosomes. (Cliché tiré de « Atlas de biologie cellulaire », S.-C. Roland, J.-Callen, A et D Szöllösi, 5e éd. Dunod, 2001)</p>
 <p>réticulum endoplasmique rugueux</p> <p>polysomes</p> <p>lumière du réticulum endoplasmique</p> <p>cytosol</p> <p>1 µm</p>	<p>(c) Réticulum endoplasmique rugueux (RER) : saccules aplatis dont la membrane est recouverte de ribosomes (polysomes). (Cliché Labo. BG et BC4, Orsay, « Biologie cellulaire » J.-C. Callen 2^e éd Dunod, 2005)</p>
<p style="text-align: center;">face de maturation ou face TRANS</p>  <p>vésicules de formation ou golgiennes</p> <p>bourgeonnement d'une vésicule golgienne</p> <p>saccules empilés</p> <p>vésicule de transition provenant du réticulum</p> <p>0,5 micromètre</p> <p style="text-align: center;">face de formation ou face CIS</p> <p>(d) Dictyosome : ensemble de saccules et de vésicules nettement polarisées (très nombreuses vésicules sur la face trans). (Cliché de Nacer Benmeradi, IBCG Toulouse)</p>	

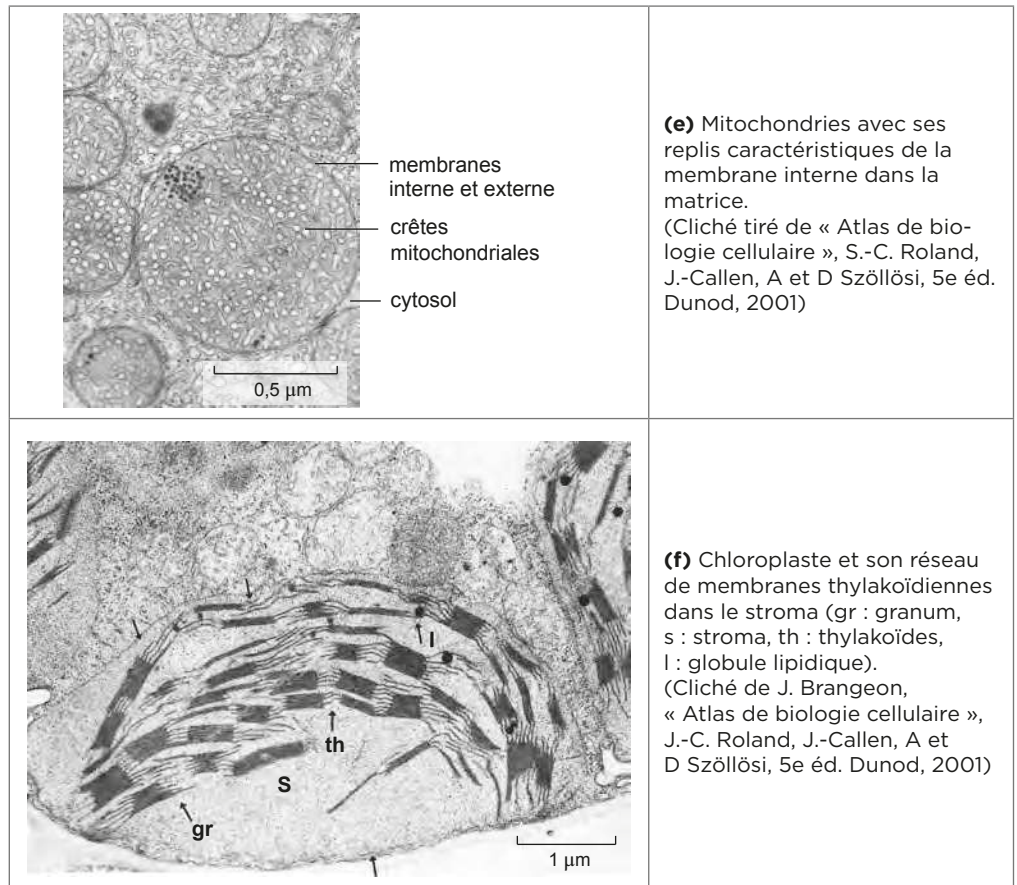


Figure TP6.6 Ultrastructure des principaux organites.

c) Relier l'ultrastructure au fonctionnement de la cellule

Les caractéristiques dégagées au MET permettent d'envisager par exemple :

- une **continuité fonctionnelle** entre compartiments qui suggère des échanges, comme au niveau des pores nucléaires qui mettent en relation le nucléoplasme et le cytoplasme ;
- des **flux par l'intermédiaire de vésicules**, comme entre réticulum et dictyosomes ;
- des **interactions entre les cellules et leur environnement** ; les méats intercellulaires des parenchymes permettent les échanges gazeux et la bordure en brosse de l'épithélium intervient dans l'absorption intestinale.

d) Comprendre l'ultrastructure des jonctions intercellulaires

Les jonctions entre les cellules épithéliales sont bien visibles au MET où elles apparaissent denses aux électrons ([figure TP6.7](#)) :

- elles se situent entre deux cellules voisines, il s'agit de **jonctions intercellulaires** ;
- elles se distinguent par leur position : apicale pour les jonctions serrées (a), subapicale pour la ceinture d'adhérence (b), plus proche du pôle basal pour les desmosomes qui sont ponctuels (c) ;
- deux de ces jonctions apparaissent liées à des éléments d'aspect fibrillaire (e et f) qui peuvent être interprétés comme du cytosquelette : probablement des faisceaux de filaments d'actine (e) avec la ceinture d'adhérence, et des filaments intermédiaires (f) avec les desmosomes ;

Voir chapitre 6, § 6

- une région non associée au cytosquelette (d) est aussi repérable, il s'agit de la zone où se concentrent les jonctions lacunaires ou jonctions gap (a), une observation à un plus fort grossissement serait nécessaire pour en comprendre l'organisation.

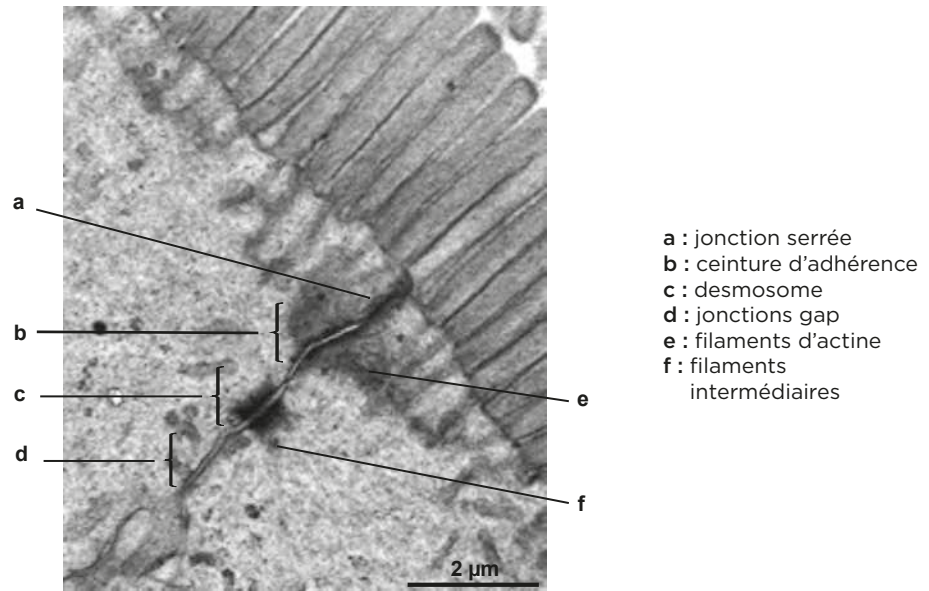


Figure TP6.7 Jonctions entre deux cellules de l'épithélium intestinal (MET $\times 50\,000$).
(Cliché de Nacer Benmeradi, IBCG Toulouse).

Les cellules des tissus végétaux (figure TP6.8) sont séparées par la paroi (d) et leurs membranes plasmiques (c et e) sont en continuité. Le RER (g) converge et traverse la paroi et forme les plasmodesmes (b). Il en résulte une continuité cytosolique entre les cellules voisines (voie symplasmique).

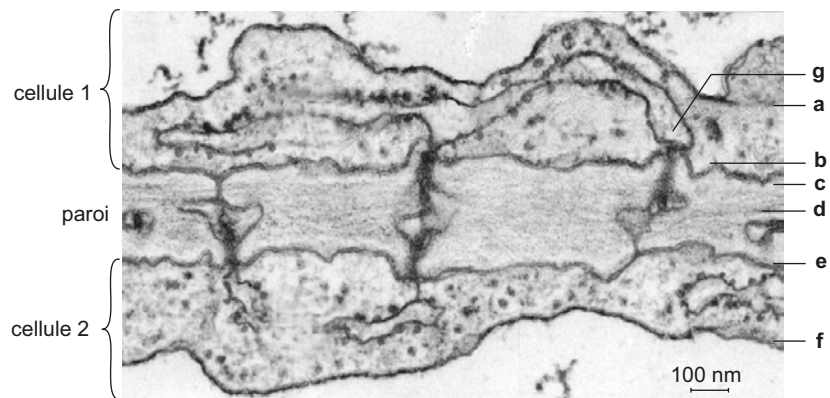


Figure TP6.8 Paroi végétale et plasmodesmes MET $\times 35\,000$.

a et f : cytoplasme des cellules voisines ; b : plasmodesmes ; c et e : membrane plasmique de chaque cellule ; d : paroi ; g : RER. (Clichés tiré de « Biologie cellulaire » J.-C. Callen 2^e éd Dunod, 2005).

2

Observation de cellules bactériennes

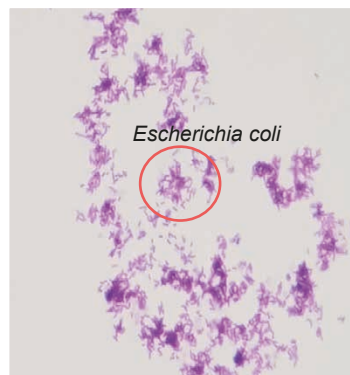
La taille des bactéries est de l'ordre du micromètre, ce qui rend leur observation difficile ; par conséquent l'étude en microscopie photonique n'apportera qu'une compréhension limitée de leur organisation. Néanmoins, il est possible de définir quelques caractéristiques cytologiques.

2.1 La forme et le regroupement de bactéries

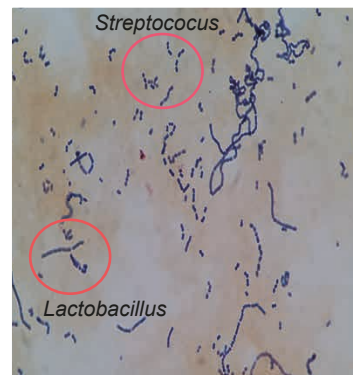
Lors des travaux pratiques, la réalisation d'un frottis, consistant à fixer les bactéries sur une lame, permet de distinguer :

- la **forme des cellules**, en bâtonnet ou en sphère (figure TP 6.9a et b) ;
- le mode de **regroupement** des cellules, isolées, en amas ou en chaînette ;
- les caractéristiques de la paroi mises en évidence par la coloration de Gram : les bactéries Gram⁺ sont colorées en violet et celles Gram⁻ en rose.

Voir chapitre 6, § 2



Forme : bâtonnet
Gram : négatif



Forme : *Lactobacillus* en bâtonnet et *Streptococcus* en sphère
Regroupement : chaînette
Gram : positif

Figure TP6.9 Diversité morphologique et de regroupement des bactéries.

(a) Frottis d'une culture d'*Escherichia coli* ; (b) frottis de yaourt renfermant plusieurs souches bactériennes.

2.2 L'ultrastructure des bactéries

La microscopie électronique permet d'aborder l'ultrastructure de la cellule bactérienne (figure TP6.10).

Ce cliché montre :

- une limitante externe composée de la paroi et de la membrane plasmique ;
- un cytosol dense aux électrons et riche en ribosomes et en inclusions ;
- une zone claire centrale, le nucléoïde où se trouve le chromosome ;
- l'absence de compartiments contrairement aux eucaryotes.

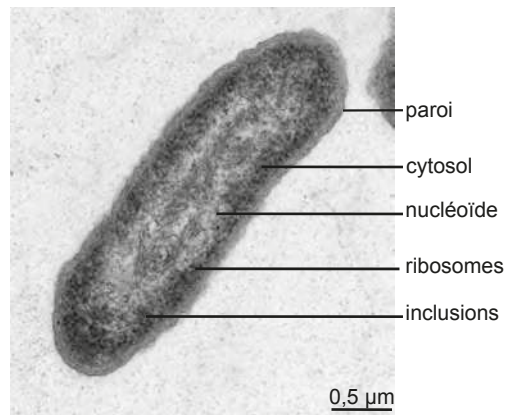


Figure TP6.10 Ultrastructure de *Xanthomonas campestris*.

(Cliché fourni par E. Lauber TRI-FRIA, Toulouse, CNRS).

3 Observation d'interactions entre bactéries et cellules racinaires

L'association symbiotique des nodosités illustre les relations cytologiques intimes qui s'établissent entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les tissus de la racine des fabacées. Il est possible de caractériser cette association à différentes échelles.

3.1 À l'échelle de la nodosité

Les nodosités apparaissent sous forme de petits renflements subsphériques ou allongés à la surface des racines des fabacées. Une coupe transversale montre la partie centrale rose riche en leghémoglobine (figure TP6.11a). La même coupe colorée au bleu de méthylène montre en microscopie (figure TP6.11b) :

- un cortex composé d'une couche subérimée teintée en bleu foncé, caractéristique du revêtement racinaire avec au-dessous un parenchyme cortical bleu clair ;
- un parenchyme médullaire central composé de grosses cellules bleu foncé qui constituent la zone active de l'association symbiotique, où les cellules racinaires sont colonisées par les bactéries appelées alors **bactéroïdes**.

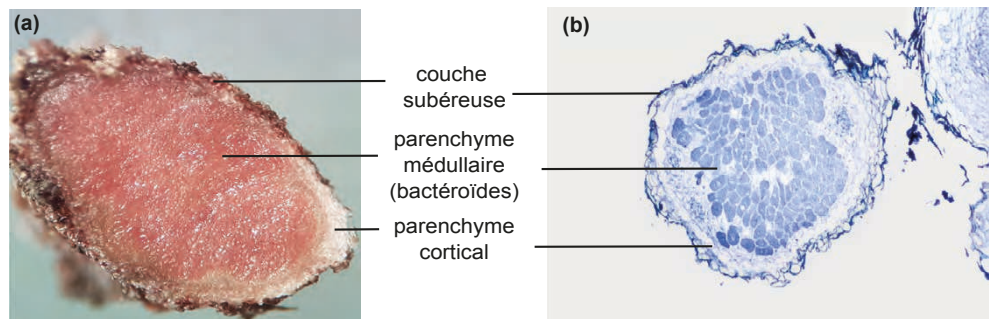


Figure TP6.11 Coupe transversale de nodosité.

(a) Observation à la loupe ($\times 20$) ; (b) préparation colorée au bleu de méthylène (MO $\times 100$) (Cliché Lab. Nublart).

3.2 À l'échelle cellulaire

Sur des images colorisées (figure TP6.12a), on constate que les bactéroïdes, en forme de bâtonnet sont très nombreux à l'intérieur des cellules racinaires.

Une observation d'un frottis coloré au bleu de méthylène au grossissement $\times 1\,000$ (en immersion), permet de voir des bactéroïdes de forme très variée (figure TP6.12b).

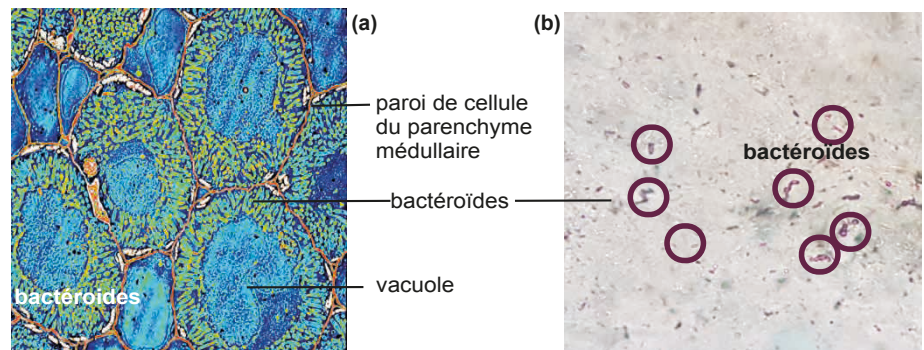


Figure TP6.12 (a) Image colorisée du parenchyme colonisé par les bactéroïdes (MO $\times 1\,200$) (cliché fourni par O. Catrice INRAe/CNRS) ; (b) frottis de bactéroïdes du parenchyme médullaire (MO $\times 1\,000$).

Les cellules du parenchyme observées au MET montrent la colonisation par de nombreuses bactéroïdes qui apparaissent plus denses sur le cliché (figure TP6.13). Elles sont séparées du cytoplasme des cellules racinaires d'une **membrane de séquestration**, délimitant une vésicule autour d'elles.

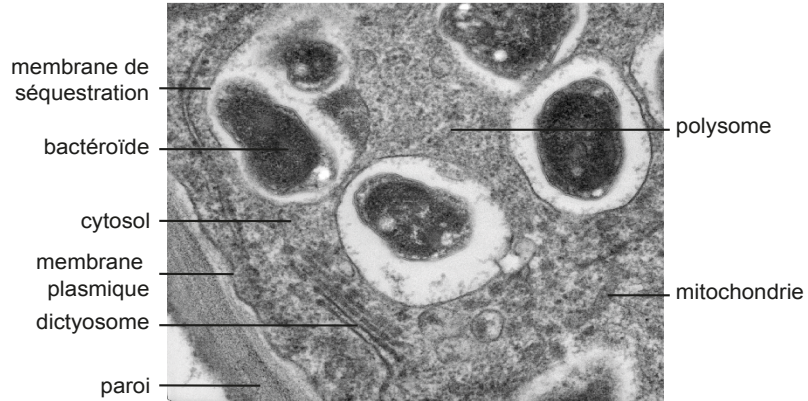
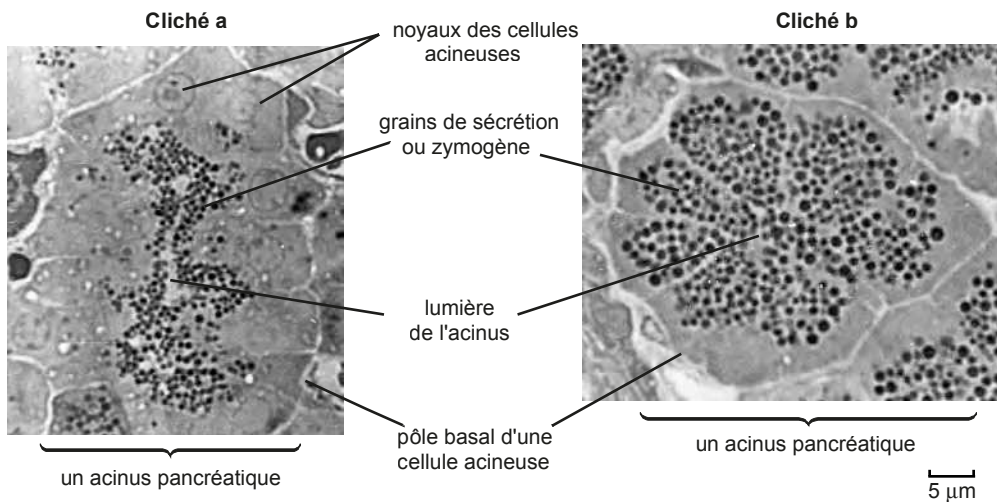


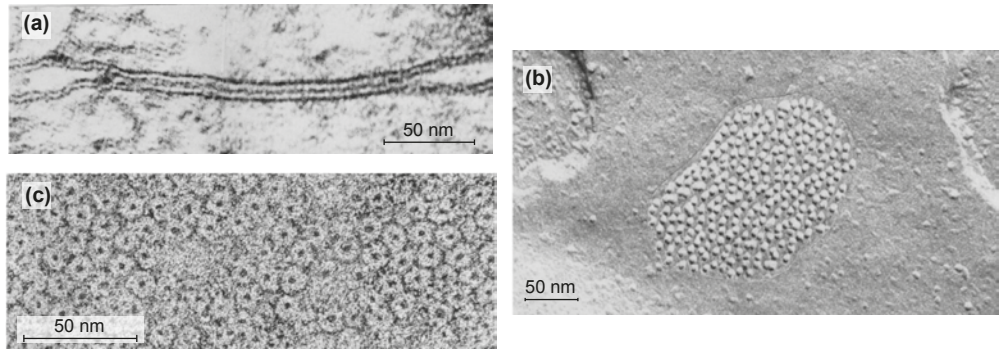
Figure TP6.13 Observation au MET de bactéroïdes dans le cytosol d'une cellule racinaire.

S'entraîner

- 1 Ces photos montrent l'observation à deux moments différents d'un acinus pancréatique. Déterminez la hauteur d'une cellule acineuse et le diamètre moyen d'un grain zymogène. Proposez une explication afin de rendre compte des changements observables au MO.

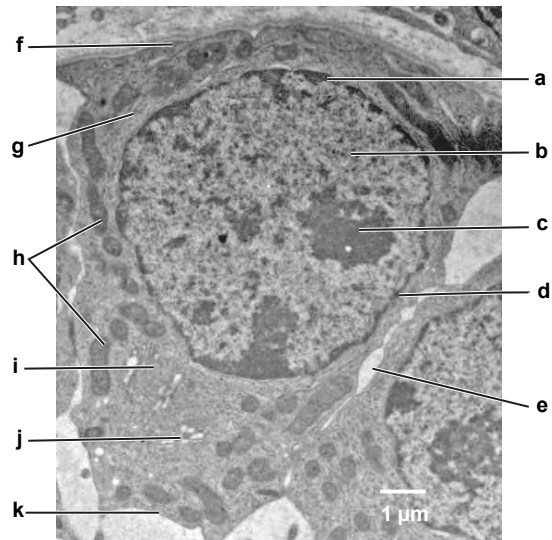


- 2 Attribuez une légende à chaque structure repérée par une lettre (a-h) sur les vues au MET (a et c) et au MEB (b) et présentez leur rôle dans le fonctionnement cellulaire.



(Clichés Labo. BG et BC4, Orsay, « Biologie cellulaire » J.-C. Callen 2^e éd. Dunod, 2005).

- 3 Légendez cette photo en vous appuyant sur des arguments cytologiques et identifiez les différents compartiments de cette cellule.



(Cliché Nacer Benmeradi, IBCG, Toulouse).