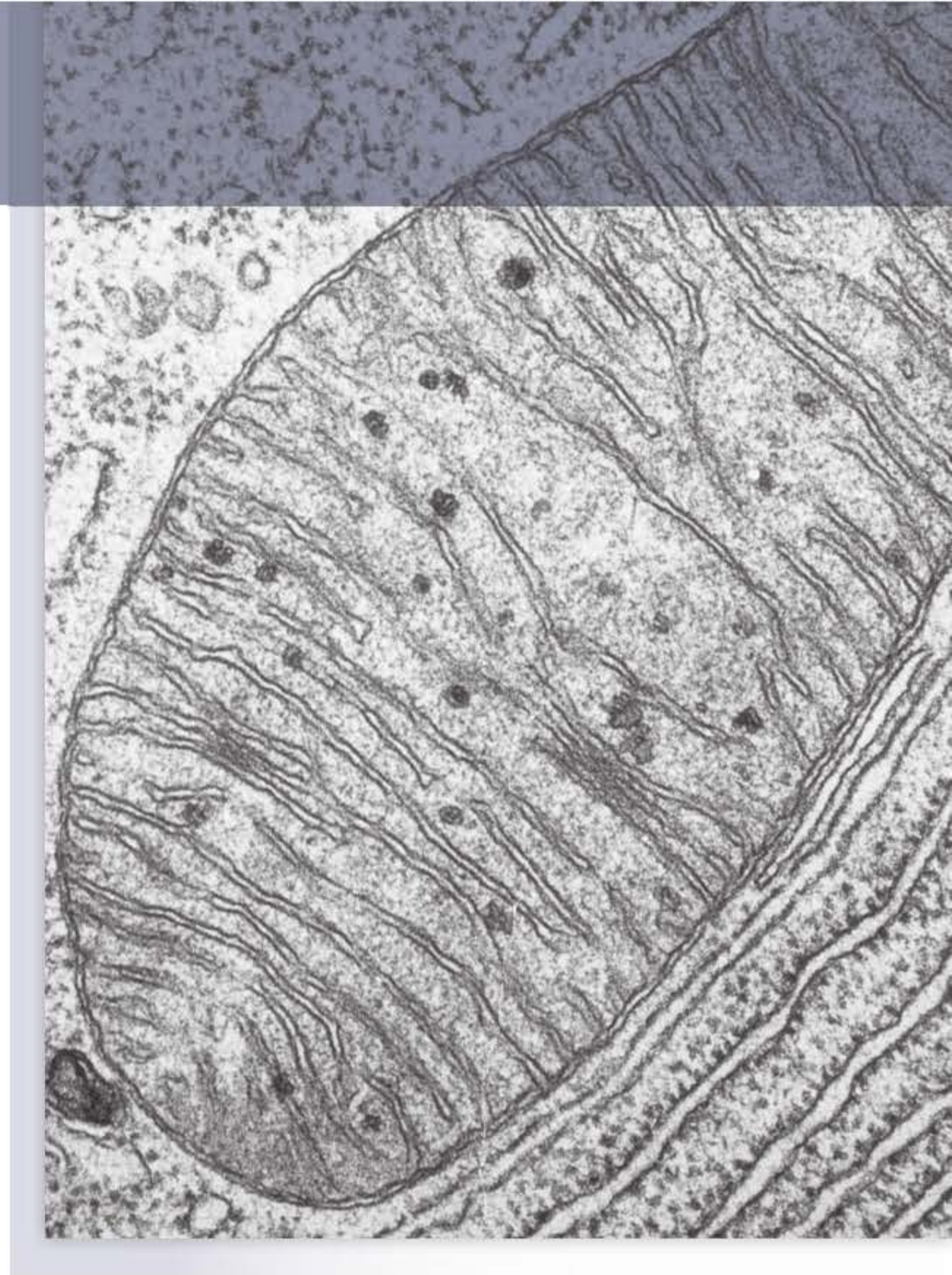


# CHAPITRE 5

## Les membranes

### Aperçu du chapitre

- 5.1 La structure des membranes
- 5.2 Les phospholipides, bases des membranes
- 5.3 Les protéines, composants aux fonctions multiples
- 5.4 Transport passif à travers les membranes
- 5.5 Transport actif à travers les membranes
- 5.6 Transport de masse par endocytose et exocytose



### Introduction

La cellule interagit avec son environnement dans un va-et-vient incessant d'échanges ; sans eux la vie ne pourrait se maintenir. Les cellules sont confinées dans une membrane lipidique imperméable à la plupart des molécules hydrosolubles. Les membranes comportent cependant des protéines qui permettent l'entrée et la sortie sélectives de molécules ainsi que l'échange d'informations entre la cellule et le milieu qui l'entoure. Les cellules eucaryotes contiennent en outre des membranes internes, comme celles des mitochondries et du réticulum endoplasmique figurées ci-dessus par exemple. La délicate enveloppe qui délimite la cellule est constituée de lipides et de protéines ; elle est appelée *membrane plasmique*. Le présent chapitre est consacré à la description de la structure et des fonctions remarquables des membranes.

### 5.1 La structure des membranes

#### Objectifs

1. Décrire les composants des membranes biologiques
2. Expliquer le modèle de la mosaïque fluide

Les membranes enveloppant toute cellule sont constituées de deux couches de phospholipides d'une épaisseur d'à peine 5 à 10 nm ; un empilement de 10 000 de ces membranes aurait juste l'épaisseur de cette page. Par des analyses biochimiques, les biologistes ont établi la composition de

ces membranes (faites de lipides mais aussi de protéines et d'autres molécules) mais l'organisation de ces composants restait à définir.

Nous commencerons par présenter les théories qui furent avancées à propos de la structure des membranes. Nous considérerons ensuite plus en détail ses composants individuels.

#### Le modèle de la mosaïque fluide présente des protéines incluses dans une bicouche fluide de lipides

Les lipides à la base de toutes les membranes cellulaires forment une bicouche de **phospholipides**, principalement de phosphoglycérides (figure 5.1) et de sphingolipides tels que la sphingomyéline (figure 5.2).

On notera que, si ces molécules se ressemblent superficiellement, elles sont construites sur des squelettes carbonés différents. On a longtemps cru que la composante protéique de la membrane couvrait les surfaces interne et externe de cette bicouche : la membrane était comparée à un sandwich constitué d'une bicouche de phospholipides intercalée entre deux couches de protéines globulaires.

En 1972 S. Jonathan Singer et Garth J. Nicholson suggérèrent une modification simple mais profonde de ce schéma : selon eux les protéines globulaires étaient *insérées* dans la bicouche lipidique, leurs segments apolaires se situant au contact de la zone interne, apolaire, de la bicouche, tandis que leurs segments polaires se disposaient à la périphérie de la membrane. Selon ce modèle, dénommé *modèle de la mosaïque fluide*, les protéines forment une mosaïque flottant dans ou sur la bicouche lipidique comme des barques sur un étang (figure 5.3).

On distingue aujourd'hui deux catégories de protéines membranaires : les protéines *intrinsèques*, encastrées dans la membrane, et les protéines *extrinsèques*, associées à la surface de la membrane.

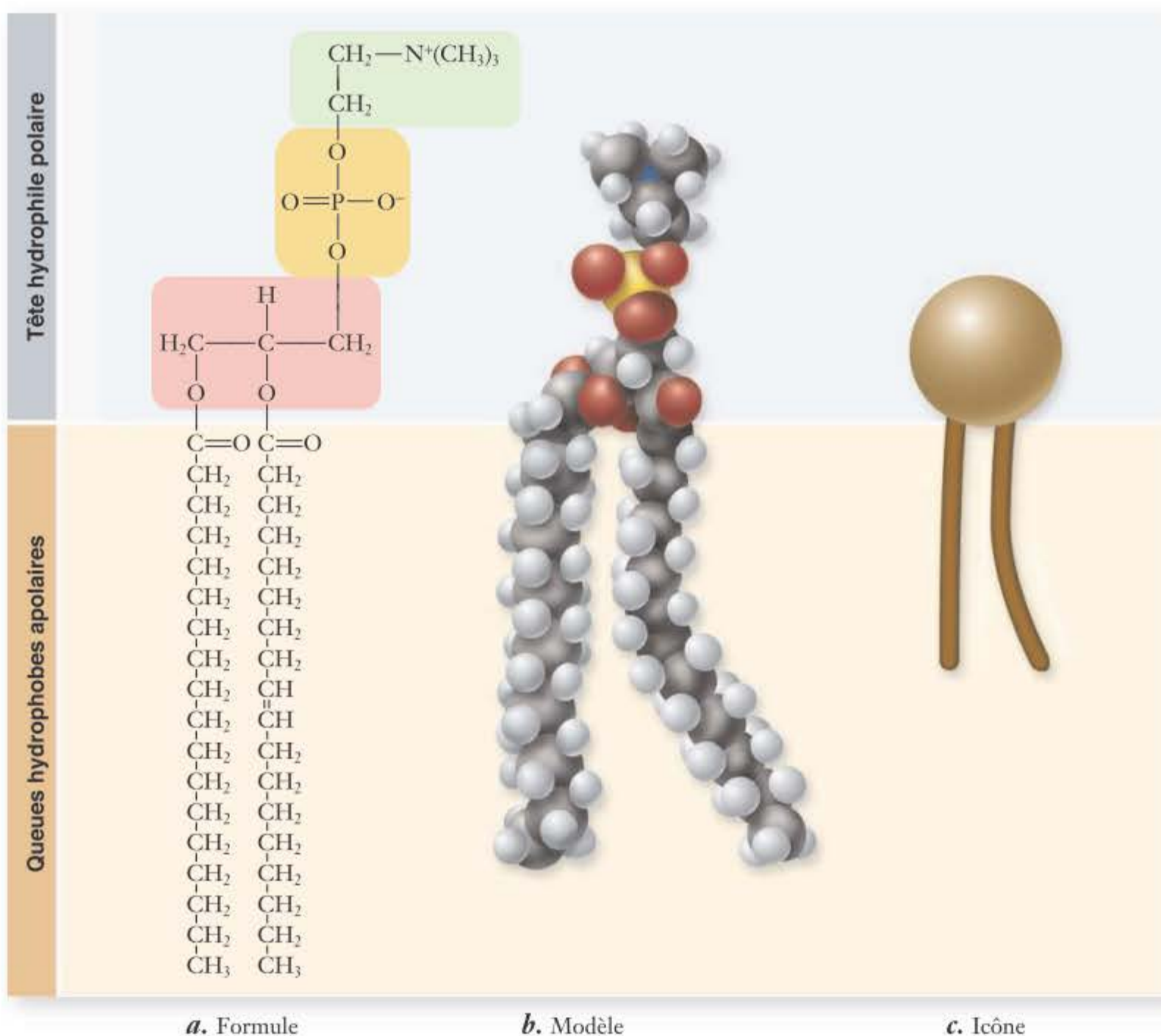
## Les membranes sont formées de quatre types de composants

Les cellules eucaryotes comportent diverses membranes ; bien que non identiques, elles partagent une même architecture de base. Les membranes cellulaires sont constituées de quatre composants (tableau 5.1) :

1. **Une bicouche de phospholipides.** Chaque membrane est composée d'une bicouche de phospholipides. Les autres composants sont enchâssés dans la bicouche, qui fournit une matrice flexible tout en constituant une barrière à la

perméabilité. Les membranes des cellules animales contiennent également du cholestérol, un stéroïde possédant un groupe hydroxyle ( $-\text{OH}$ ). Les cellules végétales possèdent d'autres stéroïdes, mais peu ou pas de cholestérol.

2. **Des protéines transmembranaires.** Composants essentiels de toute membrane, de nombreuses protéines flottent dans la bicouche lipidique, où elles exercent diverses fonctions parmi lesquelles le transport et la communication à travers la membrane. De nombreuses protéines transmembranaires n'occupent pas de position fixe ; elles peuvent circuler au sein de la bicouche, comme les phospholipides eux-mêmes. Certaines membranes sont bourrées de protéines tandis que d'autres en contiennent beaucoup moins.
3. **Un réseau de protéines intracellulaires.** Les membranes sont soutenues et leur forme stabilisée par un réseau de protéines disposées à leur face interne. Les érythrocytes par exemple doivent leur forme biconcave caractéristique à un échafaudage de protéines appelées spectrines. Celles-ci relient des protéines de la membrane à des microfilaments du cytosquelette. D'autres réseaux de protéines contrôlent les mouvements latéraux de certaines protéines membranaires importantes en les ancrant en des sites spécifiques.
4. **Des marqueurs de surface.** Comme on l'a vu au chapitre précédent, des portions de membrane s'assemblent au niveau du réticulum endoplasmique, d'où elles sont transférées à l'appareil de Golgi et de là à la membrane plasmique. Le RE ajoute des chaînes de glucides à des protéines et lipides membranaires, les convertissant en **glycoprotéines** et **glycolipides** ; ceux-ci diffèrent d'un type de cellule à l'autre et y servent de marqueurs d'identité.



**Figure 5.1** Différentes représentations de la structure des phospholipides.

Les phospholipides sont composés d'un glycérol (en rose) lié à deux acides gras et à un groupe phosphate. Le groupe phosphate (en jaune) peut fixer à son tour une molécule autre, par exemple la choline, chargée positivement, ici représentée (en vert). La phosphatidylcholine est fréquente dans les membranes ; (a) formule de structure, (b) modèle compact, (c) icône utilisée dans la plupart des figures du présent chapitre.

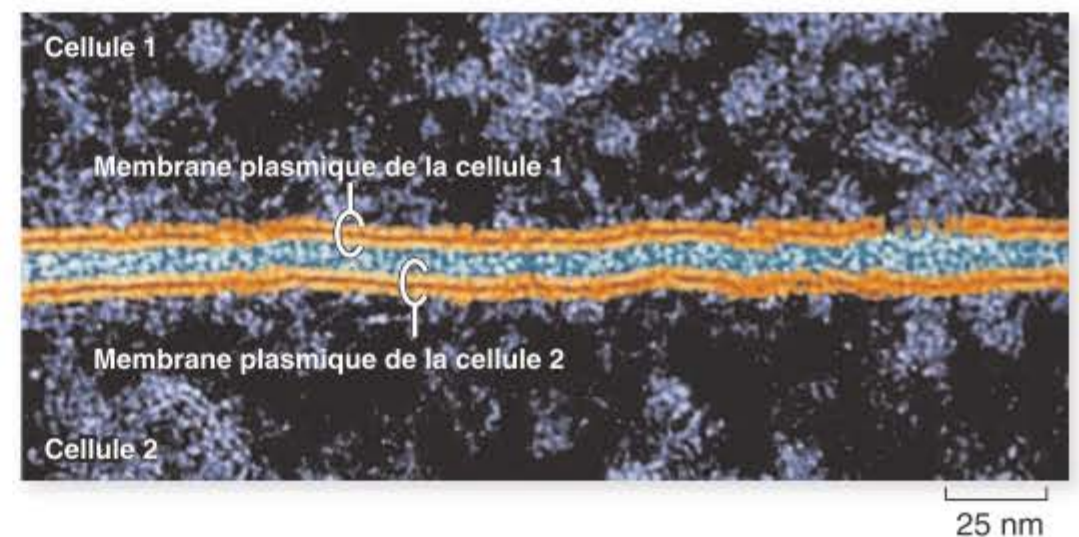


<b>TABLEAU 5.1 Composants de la membrane plasmique</b>				
<b>Composant</b>	<b>Composition</b>	<b>Fonction</b>	<b>Mode d'action</b>	<b>Exemple</b>
Bicouche de phospholipides	Phospholipides	Constitue une barrière imperméable et une matrice pour des protéines	Empêche le passage de molécules polaires à travers la zone interne apolaire de la bicouche	La bicouche est imperméable aux molécules hydrophiles d'une certaine taille, par exemple au glucose
Protéines transmembranaires	Transporteurs	Transports actif et passif de molécules à travers la membrane	Assiste les molécules dans leur traversée de la membrane, par des changements de conformation	Glycophorine; pompe sodium-potassium
	Canaux	Transport passif de molécules à travers la membrane	Crée un tunnel permettant le passage sélectif de molécules à travers la membrane	Canaux sodium et potassium dans les cellules nerveuses, cardiaques et musculaires
	Récepteurs	Transmission de l'information à la cellule	Des molécules d'adressage se fixent sur la portion externe du récepteur, modifiant ainsi la portion cytoplasmique de celui-ci, ce qui induit une réaction	Des récepteurs spécifiques fixent des hormones peptidiques et des neuromédiateurs
Réseau protéique interne	Spectrines	Contrôle la forme de la cellule	Constitue un échafaudage sous-jacent à la membrane qui relie la membrane et le cytosquelette	Érythrocytes
	Clathrines	Fixe certaines protéines en des sites spécifiques, en particulier à la surface externe de plages de la membrane plasmique impliquées dans l'endocytose médiée par récepteurs	Les protéines bordent les puits recouverts, où elles fixent des molécules spécifiques	Positionnement de lipoprotéines de faible densité dans les puits
Marqueurs de surface	Glycoprotéines	Reconnaissance du soi	Crée une chaîne glycoprotéique spécifique d'un individu	Complexe majeur d'histocompatibilité reconnu par le système immunitaire
	Glycolipide	Reconnaissance tissulaire	Crée une chaîne glycolipidique spécifique d'un tissu	Marqueurs des groupes sanguins A, B, O

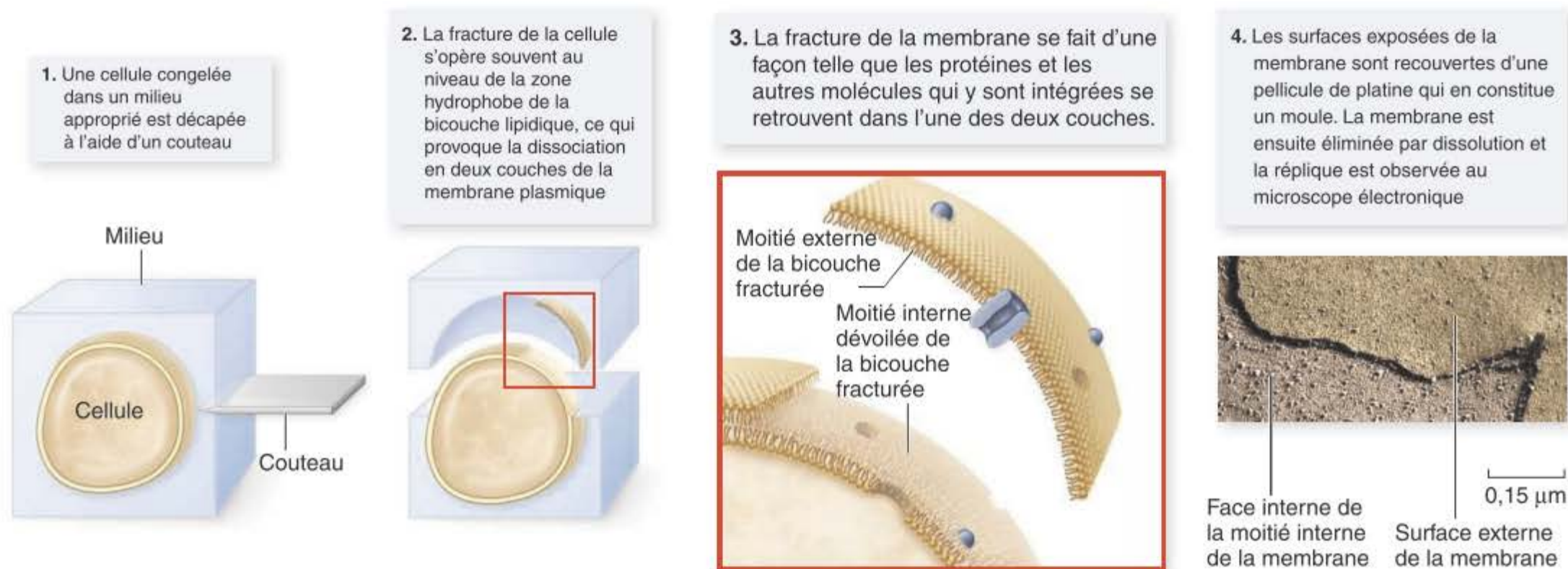
bloc de résine est ensuite coupé en tranches à l'aide d'un microtome, appareil muni d'un couteau très affûté permettant la réalisation de tranches d'époxy extrêmement minces (jusqu'à moins d'1 µm) et transparentes.

Ces coupes sont alors déposées sur une grille sur laquelle est focalisé un faisceau d'électrons produit à l'intérieur du microscope électronique à transmission. La haute résolution atteinte par celui-ci permet de mettre en évidence la double couche de la membrane. L'emploi de fausses couleurs permet d'accentuer les détails de la microphotographie.

Une autre technique est la cryofracture, qui permet d'observer l'intérieur de la membrane (figure 5.4). Le tissu est congelé brusquement dans l'azote liquide puis fracturé à l'aide d'un couteau ; c'est au niveau des zones de moindre résistance de l'objet que s'opère la fracture, c'est-à-dire au milieu de la bicouche lipidique des membranes. Toutes les structures associées à la membrane – protéines, glucides, puits, pores, canaux ou autres – se sépareront dès lors, restant fixées à



l'une ou l'autre face de la membrane dissociée. Une très mince couche de platine est alors vaporisée sur les surfaces de la fracture, dont elle constitue un moulage. Le tissu est ensuite dissous et c'est le moulage qui est observé au microscope électronique. Cette technique fournit de remarquables images tridimensionnelles de la membrane.



**Figure 5.4** Observation de membranes plasmiques par la technique de cryofracture

### Synthèse 5.1

Les membranes cellulaires comportent quatre composants : (1) une bicouche de phospholipides, (2) des protéines transmembranaires, (3) un réseau de protéines intracellulaires fournissant un support structural et (4) des marqueurs de surface constitués de glycoprotéines et de glycolipides. Le modèle de la mosaïque fluide rend compte à la fois de la nature fluide de la membrane et de la disposition en mosaïque des protéines flottant dans la bicouche de phospholipides. Les microscopies électroniques à transmission et à balayage ont permis de confirmer le modèle.

- Si la membrane plasmique n'était constituée que d'une bicouche phospholipidique, en quoi ses fonctions seraient-elles affectées ?

## 5.2 Les phospholipides, base des membranes

### Objectifs

1. Décrire les composants des phospholipides
2. Expliquer la formation spontanée des membranes
3. Décrire les facteurs impliqués dans la fluidité des membranes

La lipidomique, champ de recherche portant sur le nombre et la fonction biologique des lipides, révèle une grande diversité de lipides membranaires. On en a identifié plus de 1000, qu'on peut regrouper en trois classes : les phosphoglycérides (voir figure 5.1), les sphingolipides (voir figure 5.2) et les stérols tels le cholestérol. La bicouche lipidique des membranes est constituée d'une combinaison de phosphoglycérides

et de sphingolipides. Les phosphoglycérides y sont les plus diversifiés ; leur tête peut porter simultanément une charge positive et une charge négative (zwitterion) ou une charge négative. La longueur et la composition des acides gras constitutifs sont aussi variés ainsi que leur caractère saturé ou *cis*-insaturé (voir section 3.5). La chaîne hydrocarbonée des sphingolipides est généralement saturée. Ces composants ne sont pas distribués uniformément dans les membranes, et diffèrent selon les compartiments cellulaires considérés, comme on le verra dans cette section.

### Les phospholipides forment spontanément des bicouches

C'est la structure amphipathique des phospholipides qui permet la formation spontanée de bicouches ; les têtes polaires sont hydrophiles tandis que les queues apolaires sont hydrophobes. Les deux chaînes d'acides gras, apolaires, s'orientent plus ou moins parallèlement l'une vis-à-vis de l'autre dans une direction, le groupe alcool, polaire, dans l'autre direction. Cette structure caractéristique est souvent représentée sous forme d'une « tête » polaire portant deux « queues » apolaires (figure 5.1c).

Qu'advient-il de molécules de phospholipides dispersées dans l'eau ? Les molécules d'eau, polaires, à la recherche de partenaires avec lesquels réaliser des ponts hydrogène, rejettent les longues queues apolaires des phospholipides, qui se trouvent donc regroupées. Chaque molécule de phospholipide oriente par contre sa tête polaire vers l'eau. Lorsque deux couches de phospholipides disposent leurs queues apolaires face à face, celles-ci ne sont plus en contact avec l'eau et la structure qui en résulte est dénommée bicouche phospholipidique. Ces bicouches se forment spontanément en raison de la tendance qu'ont les molécules d'eau à former un nombre maximum de liaisons hydrogène.

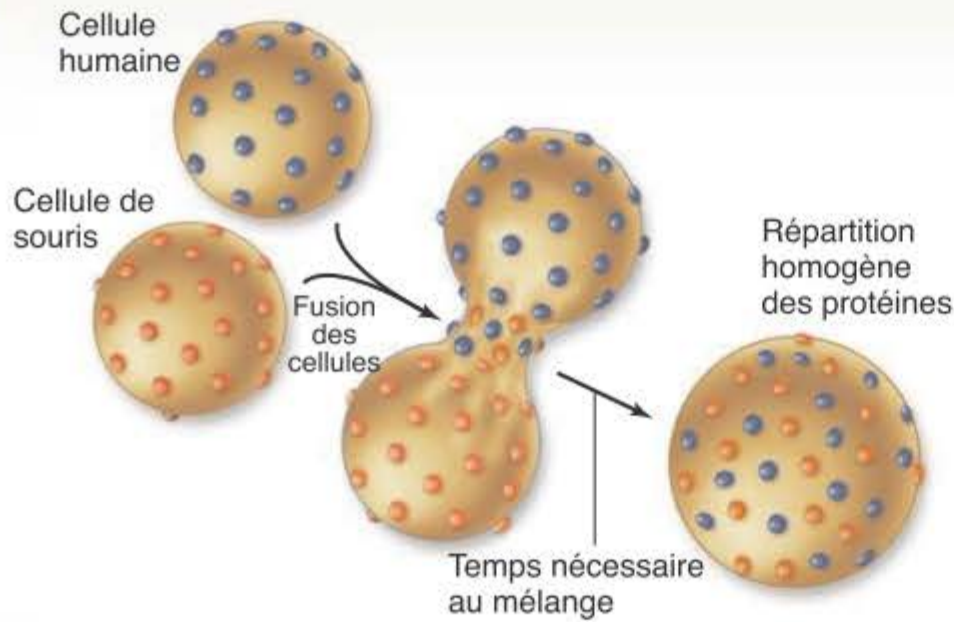
La zone interne de la bicouche, apolaire, empêche le passage de substances hydrophiles à travers la membrane de la même façon qu'une couche d'huile empêche le passage d'une goutte d'eau (huile et eau ne se mélangent pas). Cette barrière au passage de substances hydrophiles constitue une propriété fondamentale des membranes.

## DÉMARCHE SCIENTIFIQUE

**Hypothèse :** la membrane plasmique est fluide.

**Prédiction :** si la membrane est fluide, les protéines membranaires doivent pouvoir diffuser latéralement.

**Test :** fusionner une cellule humaine et une cellule de souris dont des protéines ont été marquées spécifiquement ; observer ensuite la distribution des protéines membranaires.



**Résultat :** la cellule hybride présente un mélange progressif des protéines marquées des deux origines.

**Conclusion :** Certaines protéines au moins peuvent diffuser dans le plan de la membrane.

**Expériences complémentaires :** est-il possible d'envisager une autre explication à ces observations ? Que se passerait-il si des protéines membranaires nouvellement synthétisées étaient insérées au cours de l'expérience ? Comment pourrait-on utiliser ce protocole expérimental de base pour exclure cette explication ou toute autre explication ?

**Figure 5.5** Test de fluidité des membranes

## La bicouche de phospholipides est fluide

C'est l'affinité de l'eau pour les liaisons hydrogène qui est responsable de la stabilité des bicouches lipidiques. De même que la cohésion d'une bulle de savon, constituée de liquide, est assurée par la tension de surface, c'est l'affinité de l'eau pour les liaisons hydrogène qui stabilise la bicouche lipidique. Si l'eau est responsable de la configuration en bicouche des phospholipides, elle n'a par contre aucun effet sur la mobilité de ces molécules ni sur celle des composants non lipidiques de la bicouche. Puisque les phospholipides interagissent relativement peu entre eux, ils sont relativement libres de se déplacer les uns par rapport aux autres au sein de la bicouche. Il en va de même des protéines membranaires intrinsèques ; les expériences de fusion de cellules qui permettent d'observer le réassortiment des protéines membranaires (figure 5.5) le démontrent remarquablement.

## La fluidité des membranes dépend de leur composition en lipides

Le degré de fluidité des membranes dépend de leur composition. De même que les triglycérides sont solides ou liquides à température modérée selon la composition de leurs acides gras, la fluidité des membranes dépend de la composition de leurs lipides.

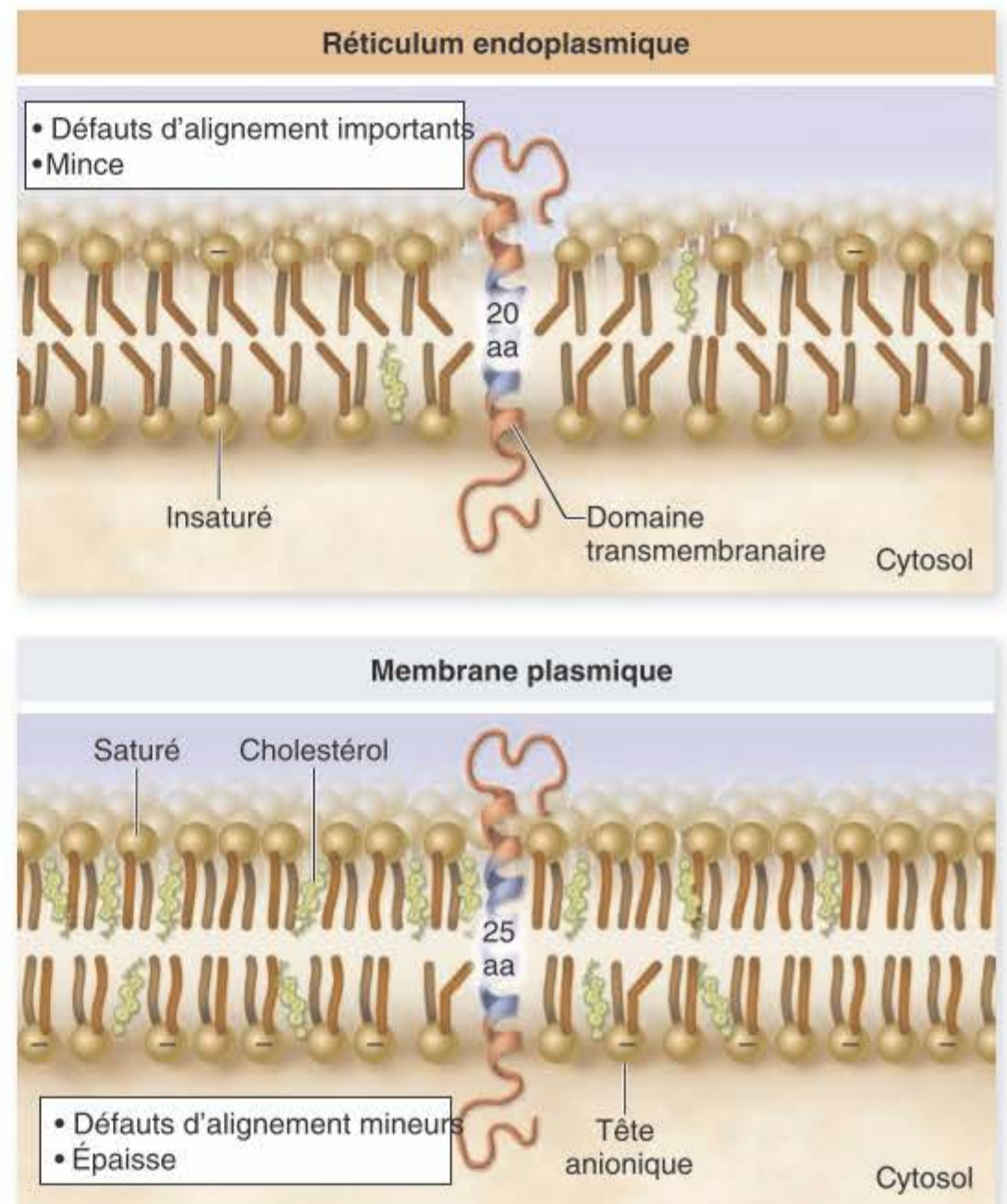
Les phosphoglycérides saturés et mono *cis*-insaturés, qui s'alignent étroitement, diminuent la fluidité des membranes, de même que les sphingolipides.

Des variations de l'environnement peuvent avoir des effets marqués sur les membranes des organismes unicellulaires comme les bactéries. Les bactéries ont développé des mécanismes stabilisant la fluidité de leurs membranes en dépit de variations de température. Certaines bactéries produisent des *désaturases*, enzymes capables d'introduire des liaisons doubles dans les acides gras des membranes. Des travaux de génétique comportant soit l'inactivation des saturases présentes dans des bactéries soit l'introduction de ces enzymes dans des bactéries qui en sont normalement dépourvues, ont démontré que ces enzymes confèrent la résistance au froid. Aux basses températures, les doubles liaisons produites par ces désaturases fluidifient la membrane, contrecarrant ainsi les effets de ces basses températures.

## La composition en phospholipides affecte la structure des membranes

Bien que la plupart des lipides soient synthétisés dans le RE, les membranes du RE, de l'appareil de Golgi et la membrane plasmique ont des compositions différentes, et ce malgré les traffics réalisés entre ces composants de la cellule. Ces différences de composition en lipides influencent la structure et la fonction de chacun des compartiments cellulaires (figure 5.6).

La membrane plasmique a une forte concentration en phosphatidylcholine et en sphingomyéline, molécules présentant une forme cylindrique et conférant à la membrane un aspect de gel dense. La fluidité de cette membrane est assurée par l'incorporation de cholestérol, qui interagit avec les queues apolaires. Ce cholestérol est par ailleurs plus abondant



**Figure 5.6** Comparaison du RE et de la membrane plasmique. Les structures des membranes plasmiques et du RE diffèrent en raison de leurs compositions respectives en lipides. La membrane plasmique est plus épaisse et moins perméable que la membrane du RE ; celle-ci forme en outre des tubes et des citernes et est plus dynamique.

dans la couche externe de la membrane que dans celle tournée vers le cytosol. Les chaînes insaturées confèrent une épaisseur plus importante aux membranes comme le montre la longueur moyenne du domaine transmembranaire des protéines membranaires, qui comporte environ 25 acides aminés. La membrane plasmique a donc une structure fluide mais relativement rigide, constituant une excellente barrière.

La membrane du RE contient principalement des phospholipides insaturés, qui rendent la membrane plus fluide et introduisent des courbures par le fait qu'ils tendent à former des cônes ou des cônes inversés plutôt que des cylindres. La membrane du RE ne comporte que peu, ou pas de cholestérol ; elle est aussi plus mince que la membrane plasmique, ce qui se reflète dans la longueur des domaines des protéines transmembranaires, qui comportent des chaînes d'environ 20 acides aminés.

### Synthèse 5.2

Les membranes biologiques comportent des phosphoglycérides, des sphingolipides et des stérols. Dans l'eau les phospholipides forment spontanément une bicouche, les groupes phosphate tournés vers l'eau et les queues hydrophobes se faisant face, ce qui les met à l'abri de l'eau. La fluidité des membranes dépend de leur composition et des conditions du milieu : l'insaturation des chaînes d'acides gras perturbe leur alignement, ce qui rend la membrane plus fluide, au même titre que les températures élevées. Les divers compartiments cellulaires diffèrent par la composition en phospholipides de leurs membranes malgré que ceux-ci puissent migrer de l'un à l'autre.

- Les phospholipides formeraient-ils des bicouches s'ils se trouvaient dans un solvant apolaire ?

## 5.3 Les protéines, composants aux fonctions diverses

### Objectifs

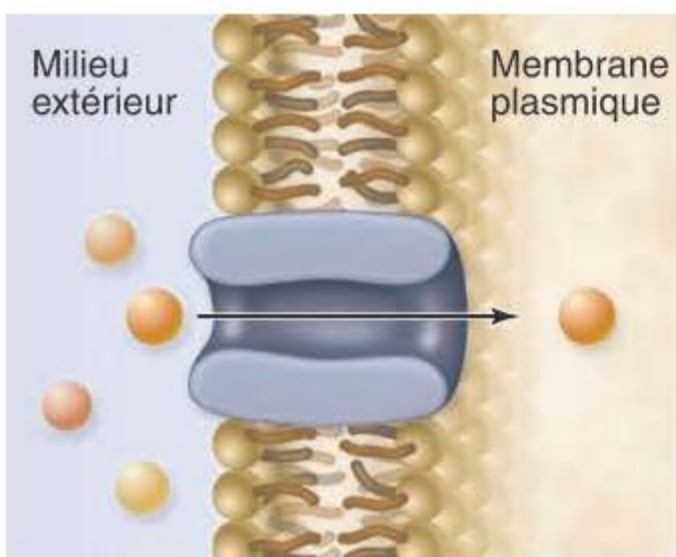
1. Illustrer les fonctions des protéines membranaires
2. Expliquer comment les protéines s'associent aux membranes
3. Identifier un domaine transmembranaire

Les membranes sont composées d'un assemblage complexe de protéines imbriquées dans un tapis fluide de molécules de phospholipides. Cette structure remarquablement flexible permet une grande variété d'interactions avec le milieu, les protéines membranaires y jouent souvent un rôle direct.

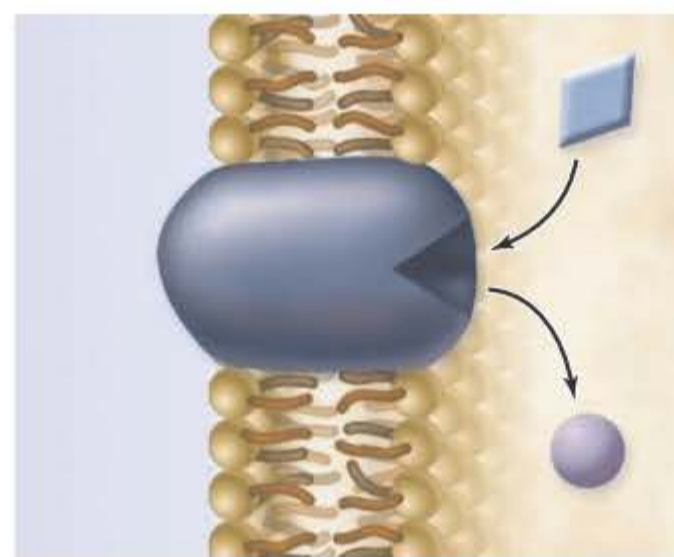
### Les protéines et les complexes de protéines exercent des fonctions essentielles

Les interactions de cellules avec leur environnement par le biais de leur membrane plasmique sont très variées. On se limitera dans ce chapitre et dans le chapitre 9 à la description de six classes de protéines membranaires (figure 5.7).

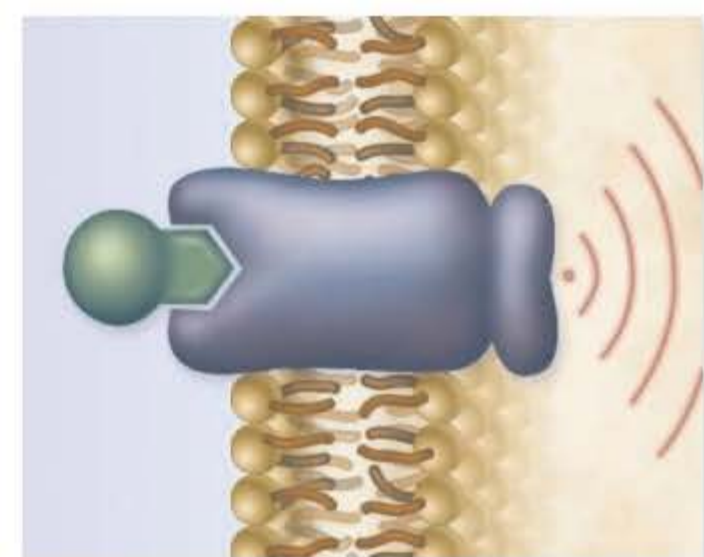
1. **Transporteurs.** Certaines substances ne peuvent entrer ou sortir de la cellule qu'à l'intervention de protéines transmembranaires très sélectives de deux types, les canaux et les protéines transporteuses.



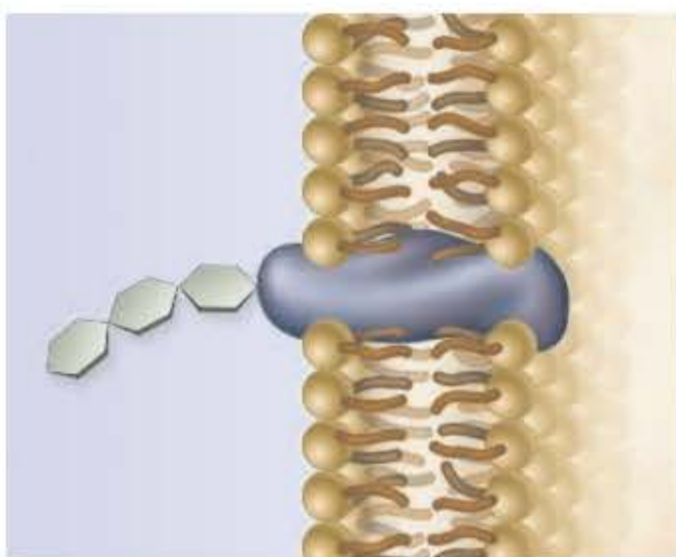
Transporteur



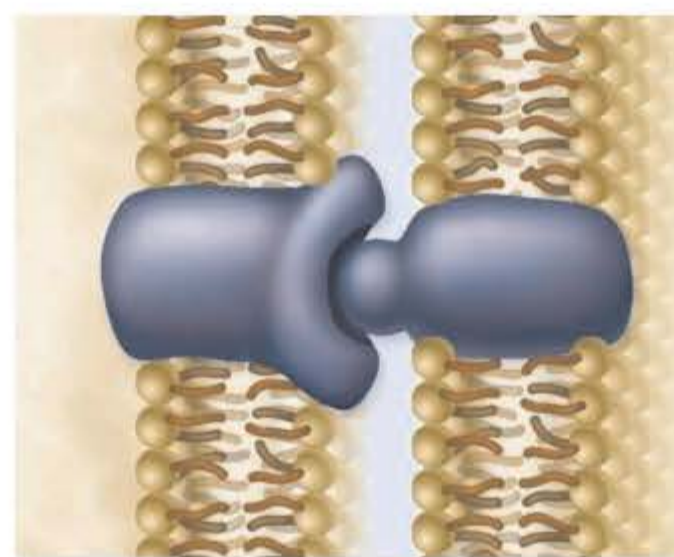
Enzyme



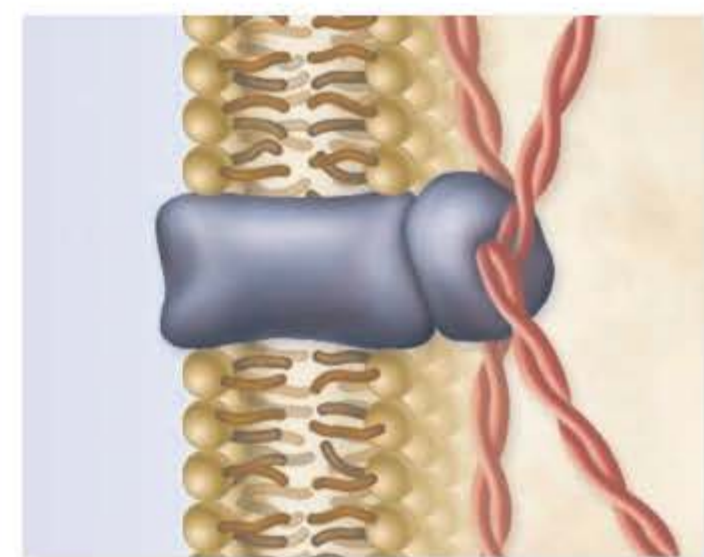
Récepteur de surface



Marqueur de surface



Adhérence cellulaire



Fixation au cytosquelette

**Figure 5.7** Fonctions des protéines de la membrane plasmique. Les protéines membranaires agissent comme transporteurs, enzymes, récepteurs de surface, marqueurs de surface, ou encore elles sont responsables de l'adhérence de cellules aux cellules voisines ou de la fixation du cytosquelette à la membrane.

- 2. Enzymes.** De nombreuses réactions de la cellule sont effectuées par des enzymes fixées à la face interne de la membrane plasmique.
- 3. Récepteurs de surface.** Les membranes sont remarquablement sensibles à des messages chimiques grâce à des protéines réceptrices disposées à leur surface.
- 4. Marqueurs de surface.** Les cellules portent, à la surface externe de leur membrane plasmique, des marqueurs de surface les distinguant d'autres cellules. La plupart des types cellulaires possèdent leur carte d'identité sous forme d'une combinaison spécifique de protéines de surface, en particulier de glycoprotéines.
- 5. Protéines d'adhérence.** Les cellules utilisent des protéines spéciales leur permettant d'adhérer les unes aux autres. Certaines d'entre elles réalisent des interactions momentanées tandis que d'autres constituent des liens plus permanents (voir chapitre 4).
- 6. Protéines de fixation au cytosquelette.** Les protéines de surface qui interagissent avec des cellules voisines sont souvent fixées au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines de liaison.

## Les caractéristiques structurales des protéines membranaires sont liées à leurs fonctions

Comme on vient de le voir, les protéines membranaires exercent des fonctions diverses, en relation avec leur structure ; la diversité de ces fonctions est liée à la diversité de structure de ces protéines, qui possèdent par ailleurs certaines caractéristiques structurales communes liées à leur rôle en tant que constituants des membranes.

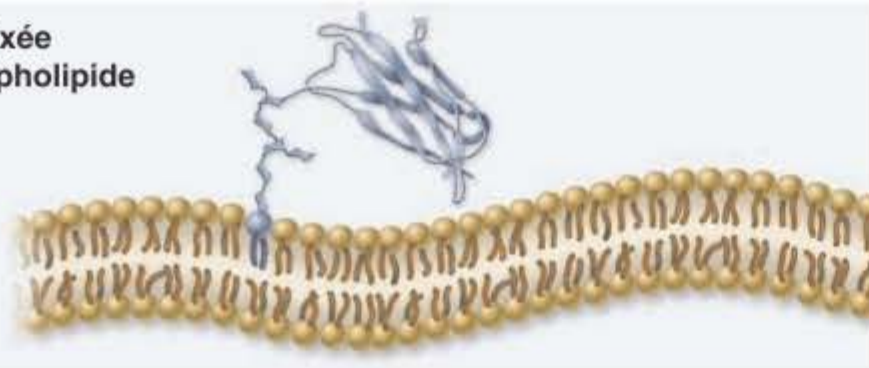
### L'ancrage de protéines dans la bicouche

Certaines protéines membranaires, dites périphériques ou extrinsèques, sont fixées à la membrane par des molécules spécifiques qui s'associent fermement aux phospholipides. À l'image de navires amarrés à un dock flottant, ces protéines sont libres de se déplacer à la surface de la membrane,



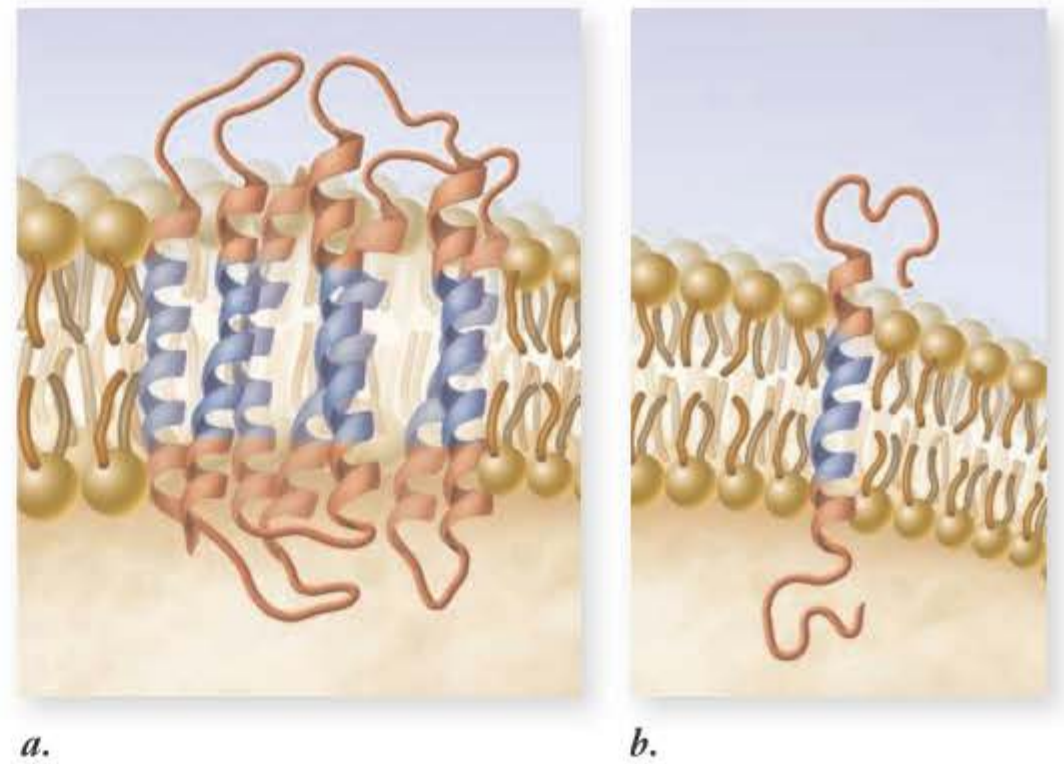
**Question** D'après le modèle de la mosaïque fluide, la cohésion des membranes est assurée par des interactions hydrophobes. Compte tenu des forces que peuvent subir certaines cellules, comment expliquer que leurs membranes ne se cassent pas à chaque mouvement qu'effectue un animal ?

Protéine fixée à un phospholipide



ancrées à une molécule de phospholipide. Ces molécules d'ancrage sont des lipides modifiés possédant (1) des régions apolaires s'insérant dans la partie interne de la bicouche et (2) des régions se liant directement à la protéine.

D'autres protéines par contre traversent la membrane de part en part. Ces protéines transmembranaires, encore appelées protéines intrinsèques, possèdent des régions constituées d'acides aminés apolaires disposées en hélices  $\alpha$  ou en feuilles plissées  $\beta$  (voir chapitre 3). L'eau évitant les acides aminés apolaires autant que les chaînes lipidiques apolaires, il en résulte que les portions apolaires de la protéine sont retenues



**Figure 5.8 Domaines transmembranaires.** Des protéines intrinsèques possèdent au moins un domaine transmembranaire hydrophobe (en bleu) qui ancre la protéine dans la membrane. *a.* Récepteur de surface possédant sept domaines transmembranaires. *b.* Protéine à un domaine unique.

à l'intérieur de la bicouche. Les extrémités polaires de la molécule quant à elles font saillie de part et d'autre de la membrane. Tout déplacement de la protéine tendant à l'extraire de la membrane, d'un côté ou de l'autre, met les régions apolaires de la molécule en contact avec l'eau, qui les repousse vers l'intérieur. Ces forces empêchent les protéines transmembranaires de s'échapper de la membrane.

### Les domaines transmembranaires

Les membranes contiennent une grande variété de protéines transmembranaires qui diffèrent par la manière dont elles traversent la bicouche de phospholipides. Une première différence réside dans le nombre de fois que la protéine traverse la membrane. Chaque segment de la protéine traversant la membrane est appelé **domaine transmembranaire**. Ces domaines sont constitués d'acides aminés hydrophobes, généralement organisés sous forme d'hélices  $\alpha$  (figure 5.8).

Il suffit d'un seul domaine transmembranaire pour qu'une protéine se fixe dans la membrane, mais de nombreuses protéines en possèdent plusieurs. Un exemple de protéine à domaine transmembranaire unique est la protéine qui fixe le réseau de spectrines du cytosquelette sur la face interne de la membrane plasmique.

Certains types de récepteurs sont classés en fonction du nombre de domaines transmembranaires qu'ils présentent ; c'est le cas des récepteurs liés à une protéine G, qui possèdent sept domaines transmembranaires (chapitre 9). Ces récepteurs répondent à des molécules externes, telles l'épinéphrine, initiant ainsi une cascade d'événements dans la cellule.

Un autre exemple est la bactériorhodopsine, une des protéines transmembranaires essentielles dans le processus de photosynthèse des archées halophiles. La bactériorhodopsine contient sept segments hélicoïdaux apolaires qui traversent la membrane, en y créant une structure qui permet le passage de protons lors du pompage de ceux-ci à l'aide de l'énergie lumineuse.

### Les pores

Certaines protéines transmembranaires possèdent d'importants segments apolaires disposés en feuillets plissés  $\beta$  et non selon la conformation secondaire hélicoïdale  $\alpha$  (chapitre 3). Les feuillets  $\beta$  se disposent les uns par rapport aux autres en un cercle, formant un motif caractéristique en tonnelet dont chaque douve serait représentée par un feuillet. Cette disposition en

tonnelet  $\beta$  ouvert à ses deux extrémités est caractéristique des porines, classe de protéines présentes dans la membrane externe de certaines bactéries ; elle permet le passage de molécules à travers la membrane.

### Synthèse 5.3

Les protéines des membranes sont responsables des principales différences entre les membranes de cellules différentes. Elles exercent diverses fonctions : transport, action enzymatique, réception de signaux extracellulaires, identification des cellules, adhérence entre cellules. Les protéines extrinsèques peuvent être fixées à la membrane par des lipides modifiés. Les protéines intrinsèques traversent la membrane grâce à une ou plusieurs régions hydrophobes, appelées domaines transmembranaires.

■ Pourquoi les domaines transmembranaires sont-ils hydrophobes ?



**Question** Comment peut-on reconnaître une protéine transmembranaire sur base de sa séquence d'acides aminés ?

## 5.4 Transport passif à travers les membranes

### Objectifs

1. Comparer diffusion simple et diffusion facilitée
2. Distinguer protéines de canal et protéines transporteuses
3. Prévoir la direction du mouvement d'eau par osmose

De nombreuses substances traversent la membrane plasmique sans dépense d'énergie. Ce type de mouvement est appelé **transport passif**. Certains ions et molécules traversent la membrane assez facilement, en raison d'un gradient de concentration, c'est-à-dire d'une différence de concentration entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Certaines substances par contre ne peuvent réaliser cette opération que via des canaux spécifiques formés de protéines de la membrane.

## Certains transports se font par simple diffusion

Les molécules et ions dissous dans l'eau sont en mouvement aléatoire constant, ce qui a pour conséquence le mouvement net de ces substances depuis les régions où elles sont le plus concentrées vers celles où elles le sont le moins, un phénomène dénommé **diffusion** (figure 5.9). Ce mouvement net actionné par la diffusion se poursuit jusqu'à égalisation des concentrations dans tout le système. On peut observer le phénomène de diffusion en déposant une goutte d'encre dans un flacon rempli d'eau. Au bout d'un certain temps les molécules d'encre se seront dispersées dans l'ensemble du flacon, par le phénomène de diffusion. En ce qui concerne les cellules, on est généralement confronté à des différences de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique et à la question de savoir avec quelle facilité une substance donnée peut traverser la membrane.

La principale barrière est constituée par l'intérieur hydrophobe de la membrane, qui repousse les molécules polaires mais non les molécules apolaires. Si la concentration d'une molécule apolaire dans le milieu extérieur à la cellule et dans le cytoplasme diffère, la molécule pourra traverser la membrane jusqu'à égalisation des concentrations externe et interne ; à partir de ce moment, des passages de la substance se poursuivront, dans les deux directions et donc sans changement net de concentrations externe et interne. Le dioxygène et des molécules organiques apolaires comme les hormones stéroïdes se comportent de cette façon.

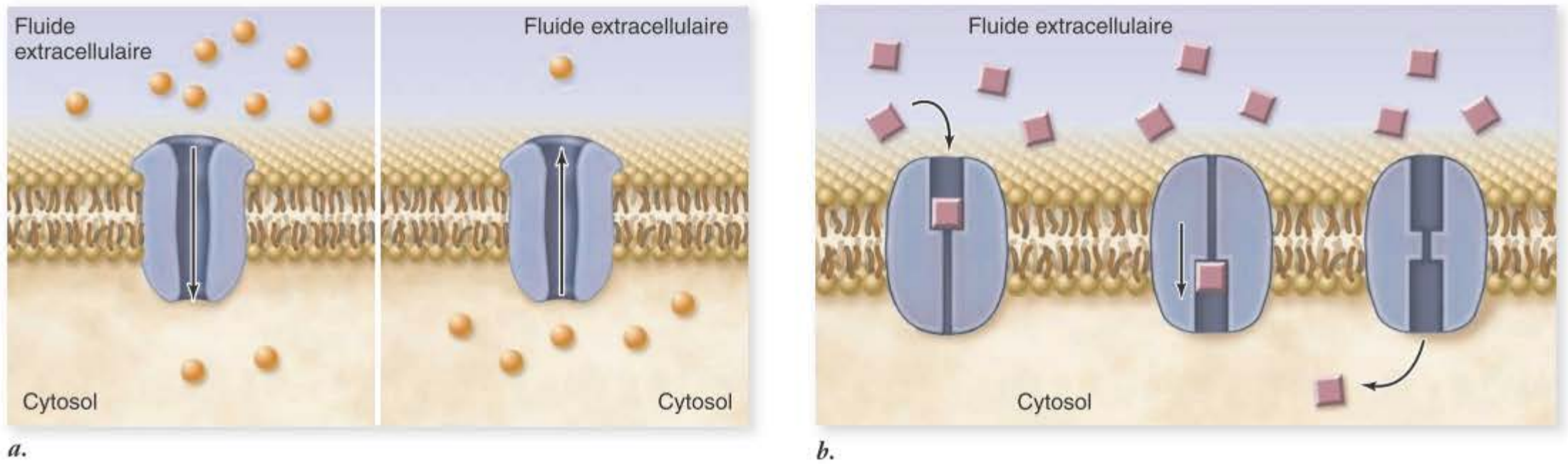
La membrane présente une perméabilité limitée à l'égard des molécules polaires de faible taille, mais elle est très peu perméable aux molécules plus grandes et aux ions. Le mouvement de l'eau, l'une des molécules polaires les plus importantes, sera discuté spécifiquement plus loin.

## Des protéines permettent une diffusion sélective

De nombreuses molécules importantes pour les cellules ne traversent que difficilement la membrane plasmique ; elles peuvent cependant diffuser à travers elle, par des canaux protéiques spécifiques ou par des transporteurs protéiques intégrés dans la membrane, tant qu'un gradient de concentration existe. On parle dans ce cas de **diffusion facilitée**. La surface intérieure des **protéines de canal** est hydrophile, ce qui autorise le passage de molécules polaires quand le canal est ouvert. Contrairement aux canaux, les **protéines transporteuses** fixent une molécule donnée, un peu comme une enzyme se lie à son substrat. Ces canaux et transporteurs sont généralement sélectifs pour un type de molécule, on dit que la membrane possède une **perméabilité sélective**.



**Figure 5.9** Diffusion. Si on dépose une goutte d'encre dans un verre d'eau (a), ses molécules se dissolvent (b) et diffusent (c). La diffusion aboutit progressivement à une distribution homogène des molécules d'encre dans l'eau (d).



**Figure 5.10 Diffusion facilitée.** La diffusion peut être facilitée par des protéines membranaires. a. Illustration du mouvement d'ions à travers un canal ; à gauche, la concentration externe est plus élevée que celle du cytosol et les ions migrent vers celui-ci ; à droite, la situation est inversée. Dans les deux cas le transport se poursuit jusqu'à ce que les concentrations interne et externe soient égales ; à partir de ce moment, les ions continuent à se déplacer dans les deux directions, mais sans modification du mouvement net. b. Une protéine transporteuse fixe spécifiquement la molécule qu'elle transporte. Ici, la concentration initiale est supérieure dans le milieu externe, de sorte que c'est à la surface externe de la membrane que la protéine fixe la molécule. La conformation de la protéine change, permettant à la molécule de traverser la membrane. Ce processus est réversible de sorte que le mouvement se poursuit jusqu'à égalisation des concentrations externe et interne.

### Diffusion facilitée des ions par des canaux

On a vu au chapitre 2 que les ions sont des solutés (substances dissoutes) possédant un nombre inégal de protons et d'électrons. Ceux dont le nombre de protons est en excès sont chargés positivement et sont appelés *cations*. Les ions qui au contraire possèdent plus d'électrons que de protons et sont donc chargés négativement sont appelés *anions*.

Puisqu'ils sont chargés, les ions interagissent bien avec les molécules polaires telles que l'eau mais sont par contre repoussés par la zone interne apolaire de la bicouche de phospholipides. Ils ne peuvent donc passer du cytoplasme au fluide extracellulaire, et inversement, sans l'assistance de protéines membranaires spécialisées.

Les membranes sont percées de **canaux ioniques** dont l'intérieur est hydraté ; les ions peuvent y circuler dans les deux directions selon leur gradient de concentration (figure 5.10). Certains canaux s'ouvrent et se ferment en réponse à un stimulus, physique pour certains, chimique pour d'autres ; on les appelle *canaux contrôlés*.

La direction du mouvement net des ions est déterminée par trois facteurs : (1) les concentrations relatives de part et d'autre de la membrane, (2) la différence de voltage de part et d'autre de la membrane et, pour les canaux contrôlés, (3) l'état (ouvert ou fermé) du canal. Une différence de voltage est une différence de potentiel électrique entre les deux côtés de la membrane, on parle de *potentiel de membrane*. La transmission de signaux dans le système nerveux et quelques autres tissus est basée sur des variations du potentiel de membrane (on reviendra en détail sur ce phénomène au chapitre 43). La plupart des canaux sont spécifiques pour un ion donné, par exemple pour l'ion calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) ou sodium ( $\text{Na}^+$ ) ou potassium ( $\text{K}^+$ ) ou encore chlore ( $\text{Cl}^-$ ) ; certains canaux permettent cependant le passage de quelques ions différents. Les canaux à ions jouent un rôle essentiel dans la transduction des signaux au niveau du système nerveux.

### Diffusion facilitée par protéines transporteuses

Les protéines transporteuses assistent non seulement le transport d'ions à travers les membranes, mais également celui d'autres solutés, comme les sucres et les acides aminés. Ce mode de transport est aussi un cas particulier de diffusion et requiert donc une différence de concentration des deux côtés de la membrane. Ici, la protéine transporteuse doit fixer

la molécule dont elle a la charge, de sorte que la relation entre concentration et vitesse de transport diffère du cas de la diffusion simple. Lorsque la concentration augmente, la vitesse de diffusion simple augmente linéairement ; lors de la diffusion par transporteurs par contre, si la concentration augmente, il arrive un moment où tous les transporteurs sont chargés et la vitesse de transport se stabilise : il y a *saturation* des transporteurs.

On peut comparer cette situation à celle d'un stade (la cellule) où la foule doit passer par un tourniquet pour entrer. Tant qu'il y a des tourniquets disponibles, on peut entrer sans attendre ; lorsqu'ils sont tous occupés, on fait la file. Lorsque les spectateurs passent à la vitesse maximale, il n'est plus possible d'accélérer le mouvement, quelle que soit la file d'attente.

### La diffusion facilitée dans les érythrocytes

L'analyse de la membrane plasmique des érythrocytes (ou globules rouges) des vertébrés permet de mettre en évidence plusieurs exemples de diffusion facilitée. Un transporteur protéique d'érythrocyte est par exemple responsable du mouvement de deux ions, chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), dans des directions opposées. Au chapitre 48 nous verrons le rôle de cette protéine dans le transport du dioxyde de carbone par le sang.

La diffusion facilitée du glucose à travers la membrane de l'érythrocyte fait appel à un autre transporteur. C'est grâce à un tour de passe-passe chimique que l'érythrocyte maintient sa concentration en glucose à un niveau faible : dès qu'une molécule de glucose entre dans la cellule, elle y est convertie, par adjonction d'un phosphate, en glucose phosphate, molécule fortement chargée non prise en charge par la protéine transporteuse de glucose et incapable de traverser la membrane. Cette opération assure le maintien d'un fort gradient en glucose libre qui favorise l'entrée de celui-ci dans la cellule.

Ce n'est pas en créant un canal dans la membrane que le transporteur impliqué ici fonctionne ; en fixant une molécule de glucose il change de forme d'une façon telle qu'il entraîne celle-ci à travers la bicouche jusqu'à la face interne de la membrane, où le glucose est libéré dans le cytoplasme. Le transporteur une fois délesté reprend sa forme initiale et est à nouveau prêt à fixer une nouvelle molécule de glucose du milieu extérieur.

## L'osmose est le mouvement de l'eau à travers les membranes

Le cytoplasme contient des ions et des molécules (sucres, acides aminés...) dissous dans l'eau. L'ensemble constitué par l'eau et les substances qui y sont dissoutes porte le nom de *solution aqueuse* ; l'eau est le **solvant**, les substances qui y sont dissoutes s'appelant **solutés**. Tant l'eau que les solutés tendent à diffuser des régions où elles sont fort concentrées vers des régions où elles le sont moins.

Que se passe-t-il si deux régions sont séparées par une membrane ? Cela dépend de la capacité qu'ont les solutés de la traverser librement. Il se fait que la plupart des solutés, entre autres les ions et les sucres, ne sont pas solubles dans les lipides et sont par conséquent incapables de traverser la bicouche lipidique de la membrane. C'est le gradient de concentration de ces solutés qui détermine le mouvement de l'eau.

### L'osmose

Les molécules d'eau interagissent avec les molécules de solutés chargées, en formant une coquille d'hydratation autour de ces dernières. Lorsqu'une membrane sépare deux solutions de concentrations différentes, la

concentration en eau *libre* de chaque côté de la membrane diffère. Dans le compartiment à forte concentration en soluté, de nombreuses molécules d'eau sont en effet liées aux molécules de soluté et il y en a donc moins qui sont libres.

La conséquence de cette différence est que les molécules d'eau libres migrent vers la solution la plus concentrée en soluté. C'est cette diffusion nette d'eau à travers une membrane vers le compartiment présentant la plus forte concentration en soluté qu'on appelle **osmose** (figure 5.11).

C'est la concentration de l'ensemble des solutés qui détermine la **concentration osmotique** de la solution. Lorsque deux solutions diffèrent par leur concentration osmotique, la solution la plus concentrée est dite **hypertonique**, la moins concentrée est **hypotonique**. Deux solutions de même concentration osmotique sont **isotoniques**.

### Les aquaporines, des canaux à eau

Le transport d'eau à travers la membrane est complexe. Des expériences sur des membranes artificielles montrent que, malgré sa polarité, l'eau peut les traverser, mais avec un débit limité. Pour les cellules, le flux d'eau est facilité par des **aquaporines**, canaux spécialisés dans le transport d'eau.

On peut le démontrer par une expérience simple. Si on place un oeuf d'amphibien dans de l'eau de source hypotonique (la concentration en solutés de la cellule est supérieure à celle de l'eau), l'oeuf ne gonfle pas. Si on injecte ensuite dans l'oeuf de l'ARNm responsable de la synthèse d'aquaporine, de l'eau diffuse dans l'oeuf, qui gonfle, suite à la présence d'aquaporine dans la membrane.

On a découvert au moins 11 aquaporines différentes dans les mammifères ; on y distingue deux classes : celles qui sont spécifiques pour l'eau et celles qui permettent en outre le passage d'autres petites molécules hydrophiles comme le glycérol ou l'urée. Ce sont les aquaporines de la deuxième classe qui expliquent comment certaines membranes permettent un passage aisé de petites substances hydrophiles.

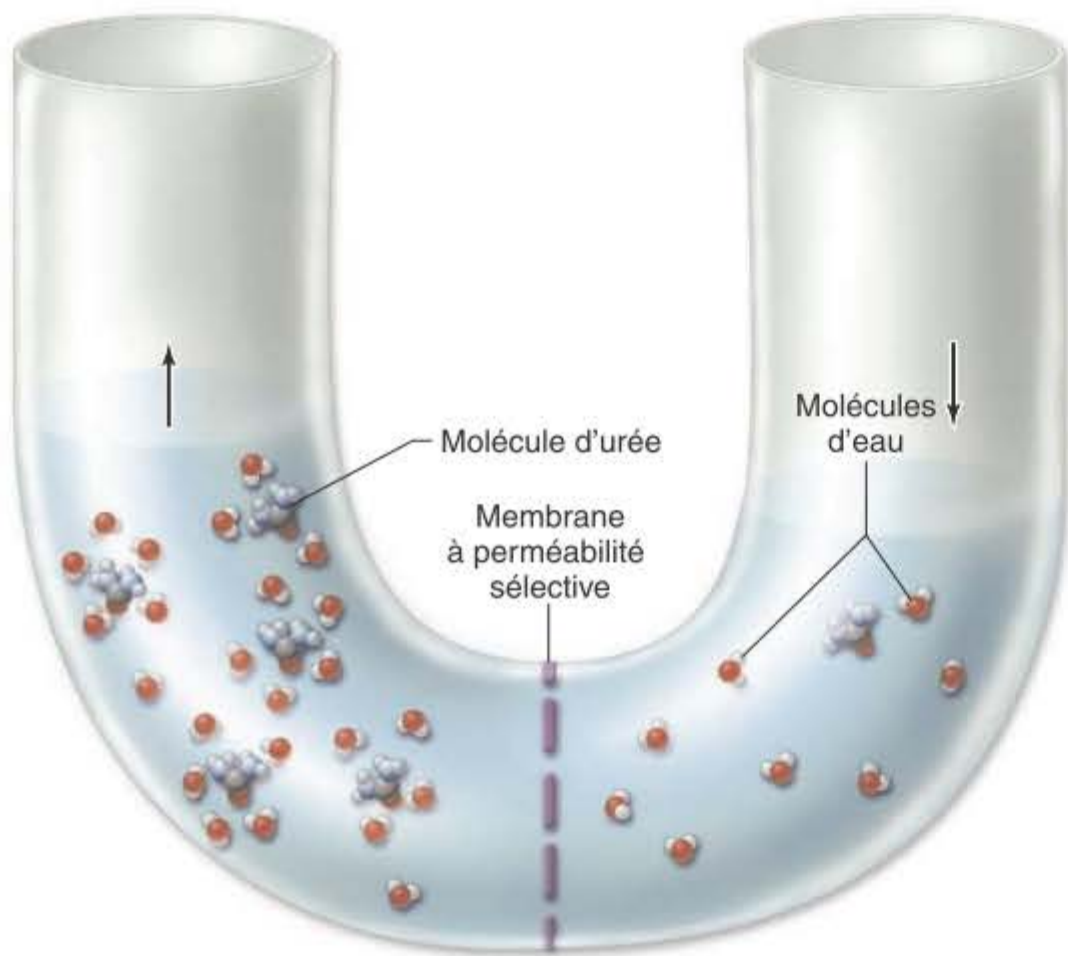
C'est le non-fonctionnement d'une aquaporine qui est responsable d'une maladie humaine héréditaire, le diabète insipide néphrogénique, maladie qui cause l'excrétion de grandes quantités d'urine diluée ; ceci illustre l'importance des aquaporines pour notre physiologie.

### Pression osmotique

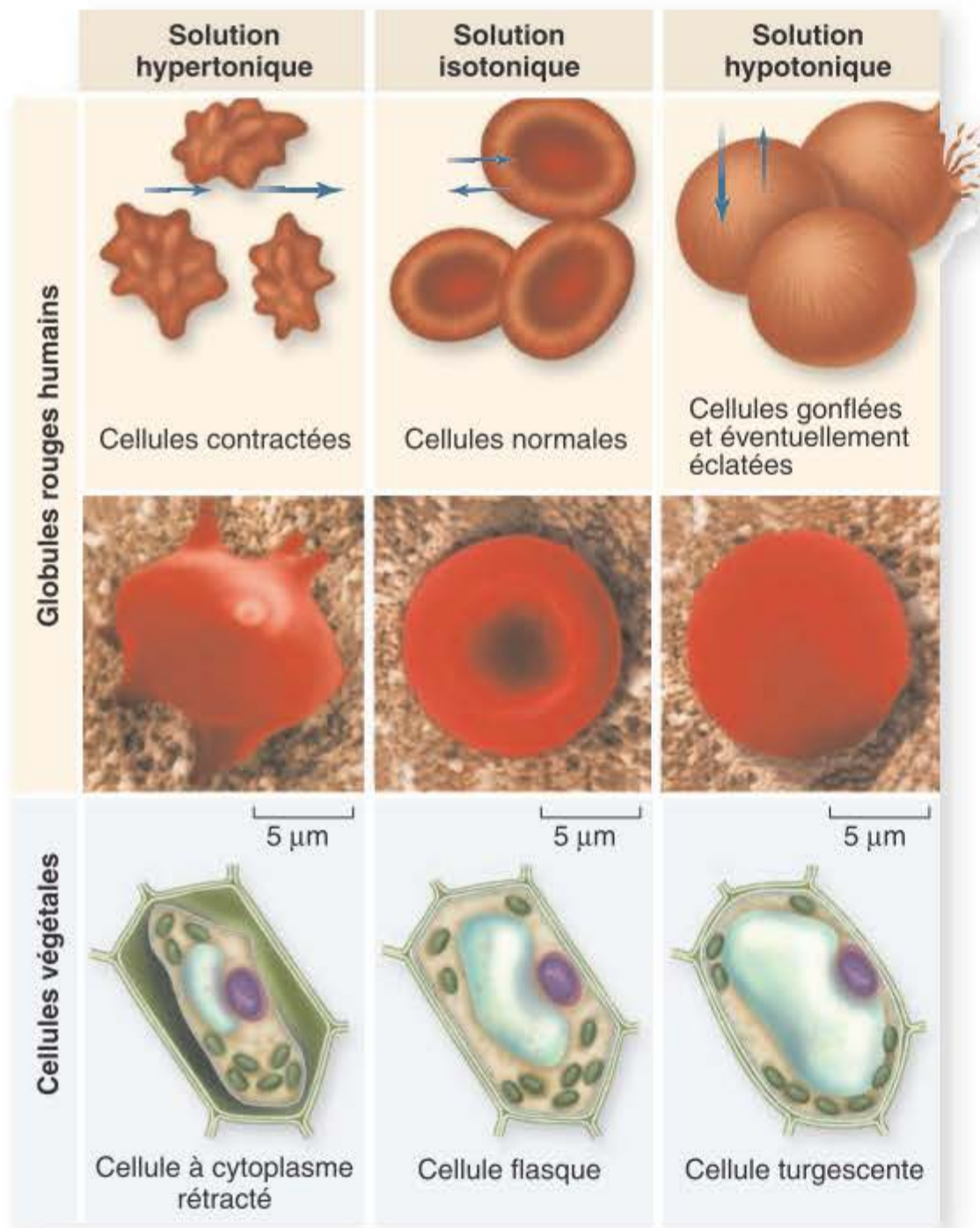
Que se passe-t-il si le cytoplasme est hypertonique par rapport au fluide extracellulaire ? L'eau diffuse de l'extérieur vers la cellule, qui gonfle. La pression ainsi exercée par le cytoplasme sur la membrane, dite **pression hydrostatique**, augmente. La **pression osmotique** quant à elle, définie comme la pression qu'il faut appliquer pour arrêter le flux d'eau à travers une membrane, entre également en jeu.

Si la membrane est suffisamment résistante, la cellule atteindra un équilibre au moment où la pression osmotique, qui tend à provoquer l'entrée d'eau dans la cellule, sera exactement contrebalancée par la pression hydrostatique qui tend elle à faire sortir l'eau de la cellule. Les membranes ne peuvent cependant pas supporter des pressions internes importantes de sorte que dans ces conditions une cellule isolée éclatera comme un ballon de baudruche trop gonflé (figure 5.12).

Les cellules animales, dépourvues de paroi, doivent donc impérativement maintenir un équilibre osmotique. Les cellules des procaryotes, des champignons, des plantes et de nombreux protistes par contre peuvent résister à des pressions internes élevées sans exploser, grâce à la paroi résistante qui les entoure.



**Figure 5.11 Osmose.** Des différences de concentration de molécules chargées ou polaires qui ne peuvent traverser une membrane à perméabilité sélective entraînent un mouvement d'eau qui, elle, peut traverser la membrane. Les molécules d'eau forment des liaisons hydrogène avec les molécules chargées ou polaires, créant une coquille d'hydratation autour de ces dernières dans la solution. Une concentration plus élevée de molécules polaires (ici l'urée) dans le compartiment de gauche entraîne l'agglutination de molécules d'eau autour de chaque molécule d'urée. Celles-ci ne sont plus libres de diffuser à travers la membrane : le soluté polaire a réduit la concentration en eau libre, ce qui crée un gradient. Ce gradient a pour conséquence un mouvement net de l'eau par diffusion du compartiment de droite vers celui de gauche, ce qui élève le niveau du liquide à gauche et l'abaisse à droite.



**Figure 5.12** Création d'une pression osmotique par les solutés. Plongée dans une solution hypertonique, une cellule se contracte suite à la diffusion vers le milieu extérieur d'une partie de l'eau qu'elle contient. Dans une solution isotonique, la vitesse de diffusion est identique dans les deux directions et le volume cellulaire ne varie donc pas. Dans une solution hypotonique, il y aura un mouvement net de l'eau du milieu extérieur vers la cellule. La direction et la quantité du déplacement de l'eau sont figurées par des flèches bleues. C'est en raison de la pression osmotique due à la concentration en solutés élevée à l'intérieur de la cellule que l'eau pénètre dans celle-ci. La pression osmotique est mesurée comme la force nécessaire pour arrêter l'osmose. Dans les cellules végétales, la paroi résistante peut supporter la pression hydrostatique et empêcher la rupture des cellules ; ce n'est pas le cas pour les cellules animales.

### Maintien de l'équilibre osmotique

Divers mécanismes ont été mis en œuvre par les organismes pour résoudre le problème posé par le caractère hypertonique de leurs cellules, qui provoque une entrée d'eau constante par osmose.

**Expulsion.** Certains eucaryotes unicellulaires d'eau douce, parmi lesquels la *paramécie*, un protiste, possèdent un organe dénommé vacuole contractile dont la fonction est d'évacuer l'excès d'eau qui entre dans la cellule par osmose. Cette vacuole prélève constamment de l'eau du cytoplasme ; en se contractant périodiquement, elle la rejette dans le milieu externe par un petit pore qui s'ouvre vers l'extérieur de la cellule.

**Ajustement de la concentration osmotique interne.** Certains organismes marins ajustent leur concentration interne en solutés de manière à la rendre égale à celle de l'eau de mer ; étant isotoniques par rapport à leur environnement leurs cellules ne subissent donc ni entrée ni sortie nette d'eau. De nombreux animaux terrestres résolvent le problème de la même façon : ils font circuler dans leur corps un fluide qui baigne leurs cellules dans une solution isotonique. Notre sang par exemple, grâce à sa teneur élevée en une protéine appelée albumine, possède une concentration en solutés égale à celle du cytoplasme de nos cellules.

**Turgescence.** La majorité des cellules végétales sont hypertoniques par rapport à leur environnement, par le fait que leurs vacuoles contiennent des solutés en concentration élevée. La pression hydrostatique interne qui en résulte, dénommée pression de turgescence, repousse fermement la membrane plasmique contre la paroi, ce qui rigidifie la cellule. La pression de turgescence des cellules végétales affecte la forme des plantes, qui fanent lorsqu'elles manquent d'eau.

### Synthèse 5.4

Le transport passif se fait par diffusion et requiert donc un gradient de concentration. Des molécules hydrophobes peuvent diffuser directement à travers les membranes (diffusion simple). Les molécules polaires et les ions peuvent aussi diffuser à travers la membrane, mais uniquement à l'aide de canaux ou de protéines transporteuses (diffusion facilitée). Les protéines de canal forment un passage hydrophile à travers la membrane, tandis que les protéines transporteuses fixent la molécule dont elles assurent le transport. En réponse à des différences de concentration en solutés interne et externe, de l'eau traverse la membrane par diffusion simple mais aussi par les aquaporines. Ce passage d'eau est appelé osmose.

- Quelle doit être la concentration en solutés d'une injection intraveineuse compte tenu des cellules du sang ?

## 5.5 Transport actif à travers la membrane

### Objectifs

1. Distinguer transport actif et diffusion
2. Décrire le fonctionnement d'une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$
3. Expliquer l'aspect énergétique du transport couplé

Alors que diffusion, diffusion facilitée et osmose sont des processus de transport passif qui concernent des déplacements de substances conformément au gradient de concentration, les cellules sont également capables de transporter des substances à travers les membranes à l'encontre du gradient de concentration. Un tel phénomène, qui requiert une dépense d'énergie, provenant normalement de l'ATP, est dès lors appelé **transport actif**.

## Le transport actif utilise de l'énergie pour déplacer des substances à l'encontre d'un gradient de concentration

De même que la diffusion facilitée, le transport actif fait intervenir des transporteurs protéiques hautement spécifiques dans la membrane. Ces transporteurs fixent la substance à transporter, qui peut être un ion, une molécule simple comme un sucre ou un acide aminé ou encore un nucléotide. Ces transporteurs sont dénommés **uniports** s'ils transportent un seul type de molécules, **symports** s'ils transportent simultanément deux types de molécules dans la même direction et **antiports** s'ils transportent deux types de molécules dans des directions opposées. Ces termes peuvent aussi être utilisés pour décrire les transporteurs impliqués dans la diffusion facilitée.

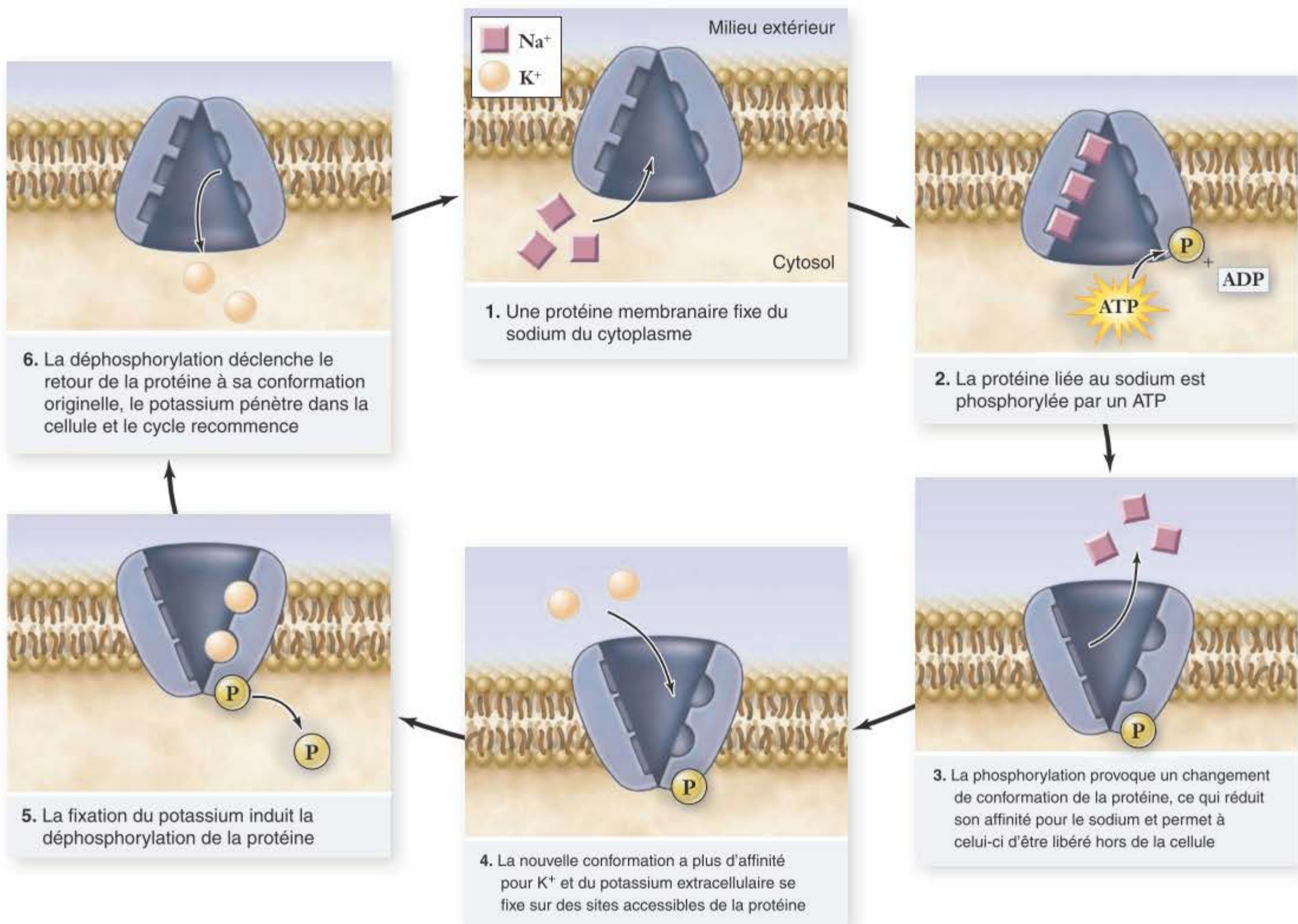
Le transport actif constitue une fonction particulièrement importante de la cellule. Il permet à celle-ci de prélever, dans le milieu extérieur, des molécules dont la concentration interne est déjà plus élevée que celle du fluide extracellulaire. Le transport actif permet par ailleurs de transférer dans le fluide extracellulaire des substances qui s'y trouvent cependant en concentration plus élevée que dans la cellule.

L'utilisation de l'énergie de l'ATP pour effectuer le transport actif peut être directe ou indirecte. Considérons d'abord l'utilisation directe d'ATP pour transporter des ions à l'encontre de leur gradient de concentration.

### La pompe à $\text{Na}^+/\text{K}^+$ utilise l'ATP de manière directe

De toute l'énergie dépensée par une cellule animale qui n'est pas en phase de division active, plus d'un tiers est consacré au transport actif des ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et potassium ( $\text{K}^+$ ). La plupart des cellules animales ont une concentration interne en  $\text{Na}^+$  inférieure à celle du milieu extérieur, l'inverse étant vrai pour  $\text{K}^+$ . Ce résultat est obtenu par un pompage actif de  $\text{Na}^+$  hors de la cellule et de  $\text{K}^+$  dans celle-ci.

C'est une protéine remarquable, appelée **pompe sodium-potassium** (pompe à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), qui assure le transport de ces deux ions à travers la membrane (figure 5.13) ; l'énergie provenant de l'ATP sert à changer la conformation du transporteur, ce qui modifie son affinité pour  $\text{Na}^+$  ou pour  $\text{K}^+$ . Il s'agit d'une excellente illustration de l'importance d'un léger changement de structure d'une protéine pour sa fonction.



**Figure 5.13 La pompe sodium-potassium.** Le transporteur dénommé pompe sodium-potassium transporte les ions sodium et potassium à travers la membrane plasmique. Pour trois  $\text{Na}^+$  quittant la cellule, il y a deux  $\text{K}^+$  qui y entrent. C'est l'hydrolyse de l'ATP qui alimente la pompe en énergie. L'affinité de la pompe pour  $\text{Na}^+$  et pour  $\text{K}^+$  est modifiée par l'addition ou la soustraction du groupe phosphate (P), qui change la conformation de la protéine

Le caractère remarquable de la pompe à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  est qu'elle transporte les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  de régions où leurs concentrations sont faibles vers des régions où elles sont élevées, grâce à un processus de transport actif. Un tel type de transport est opposé à celui, passif, opéré par diffusion ; il ne peut se réaliser que moyennant une dépense constante d'énergie métabolique. Le fonctionnement de la pompe à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  comporte six étapes impliquant des changements de conformation de cette protéine intrinsèque ; ces étapes sont schématisées à la figure 5.13.

1. Trois ions  $\text{Na}^+$  se lient à la protéine du côté du cytoplasme, ce qui entraîne un changement de sa conformation.
2. La nouvelle conformation de la protéine lui permet de fixer une molécule d'ATP, qui se dissocie en adénosine diphosphate (ADP) et phosphate inorganique ( $\text{P}_i$ ). Le groupe phosphate reste lié de manière covalente à la protéine, qui est dès lors dite phosphorylée, tandis que l'ADP est libéré.
3. Cette phosphorylation induit un nouveau changement de conformation de la protéine tel que les trois  $\text{Na}^+$  se trouvent exposés au milieu extérieur à la cellule. Dans cette nouvelle conformation la protéine n'a en outre que peu d'affinité pour  $\text{Na}^+$ , et les trois ions sont donc libérés dans le fluide extracellulaire.
4. La nouvelle conformation a par ailleurs une forte affinité pour  $\text{K}^+$  et la protéine en fixe deux dès qu'elle s'est débarrassée des trois  $\text{Na}^+$ .
5. La fixation de  $\text{K}^+$  provoque un nouveau changement de conformation de la protéine, avec pour conséquence la dissociation du groupe phosphate.
6. Ainsi délestée du groupe phosphate la protéine retrouve sa conformation originelle, exposant maintenant les deux  $\text{K}^+$  au cytoplasme. Comme dans cette conformation la protéine a peu d'affinité pour ceux-ci, ils sont libérés et diffusent à l'intérieur de la cellule, tandis que trois nouveaux ions  $\text{Na}^+$  prennent place, initiant un nouveau cycle.

À chaque cycle trois  $\text{Na}^+$  quittent donc la cellule tandis que deux  $\text{K}^+$  y entrent. La rapidité des changements de conformation est telle que chaque pompe peut transporter au moins 300  $\text{Na}^+$  par seconde. Il semble que toutes les cellules animales possèdent des pompes à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , bien que leur nombre soit variable.

## Le transport couplé utilise l'ATP indirectement

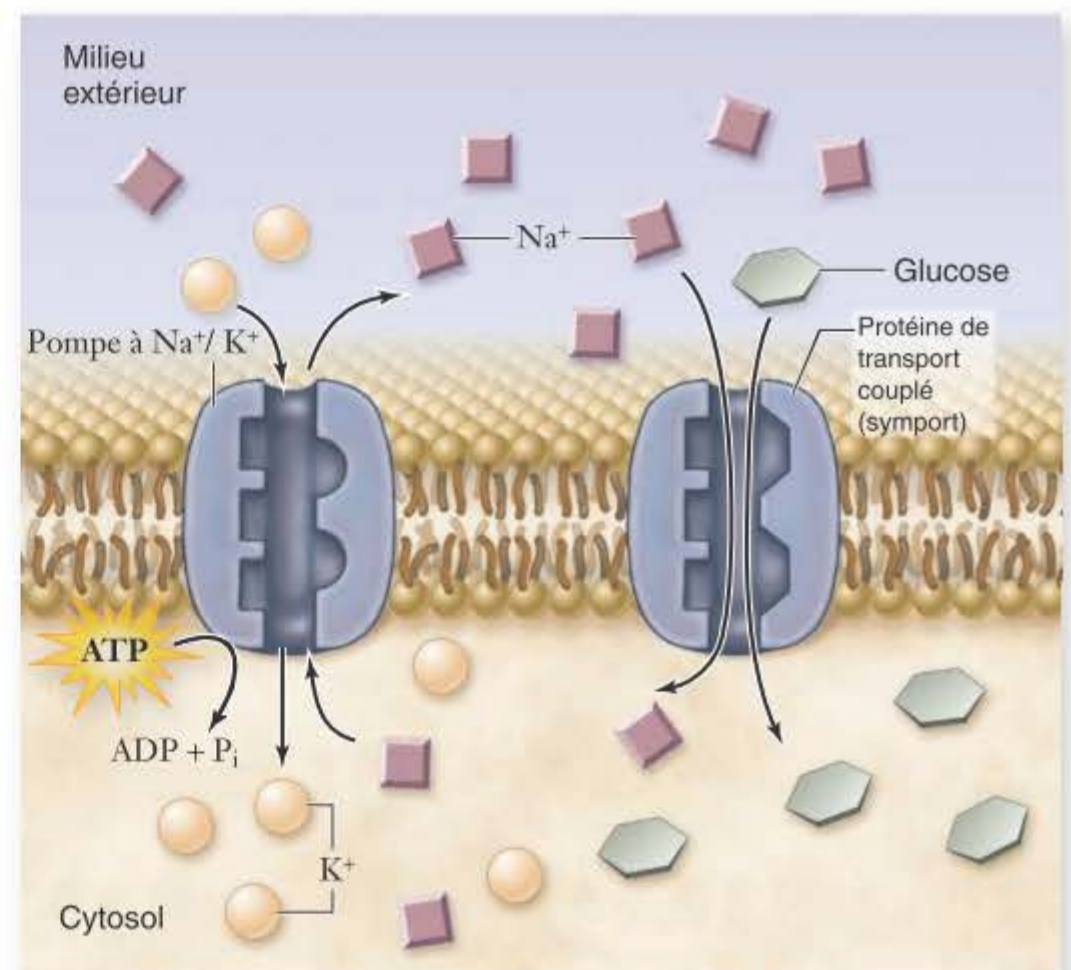
C'est en utilisant l'énergie stockée dans un gradient de concentration d'une molécule que d'autres molécules sont déplacées, à l'encontre de leur propre gradient de concentration. Dans ce processus, appelé *transport couplé*, c'est l'énergie libérée par le mouvement d'une molécule suivant son gradient qui est captée et utilisée pour déplacer une autre molécule à l'encontre de son gradient. Comme on vient de le voir, l'énergie stockée dans les molécules d'ATP peut être utilisée pour créer un gradient de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{K}^+$  de part et d'autre d'une membrane. De tels gradients peuvent ensuite fournir l'énergie nécessaire au transport d'autres molécules à travers la membrane.

À titre d'exemple, considérons le transport actif du glucose à travers la membrane plasmique d'une cellule animale. Le glucose est si important qu'il existe plusieurs transporteurs de cette molécule, dont l'un a été mentionné à propos du transport passif. Les cellules épithéliales de l'intestin ont une concentration en glucose plus élevée que le

milieu extérieur et ces cellules doivent donc être capables de transporter le glucose à l'encontre de son gradient de concentration. Ceci requiert de l'énergie et un transporteur différent de celui utilisé pour la diffusion facilitée du glucose.

C'est en utilisant comme source d'énergie le gradient de  $\text{Na}^+$ , créé par la pompe à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que le transporteur de glucose fonctionne. Dans ce système, glucose et  $\text{Na}^+$  se fixent à la protéine de transport ; celle-ci laisse passer  $\text{Na}^+$  suivant son gradient de concentration tout en capturant l'énergie ainsi libérée et en l'utilisant pour transporter le glucose dans la cellule. Dans ce type de transport couplé, où les deux molécules impliquées se déplacent dans la même direction, le transporteur est dénommé *symport* (figure 5.14).

Dans un processus apparenté, l'entrée de  $\text{Na}^+$  dans la cellule est couplée à la sortie d'une autre substance, par exemple  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{H}^+$ . Comme dans le cas précédent, les deux substances se fixent à un même transporteur protéique, mais dans ce cas sur les faces opposées de la membrane (d'où le nom d'*antiport*) et elles migrent dans des directions opposées. La cellule utilise ici l'énergie, libérée par le déplacement du  $\text{Na}^+$  vers le cytoplasme suivant son gradient, pour transporter l'autre substance hors de la cellule à l'encontre de son gradient. Qu'il s'agisse de symports ou d'antiports, c'est l'énergie potentielle d'un gradient de concentration d'une molécule qui est utilisée pour transporter une autre molécule à l'encontre de son gradient de concentration. Les deux systèmes ne diffèrent que par la direction du déplacement des deux molécules.



**Figure 5.14** Transport couplé (ici, un symport). Une protéine transmembranaire transporte  $\text{Na}^+$  dans la cellule en suivant son gradient de concentration ; simultanément, elle introduit une molécule de glucose dans la cellule. C'est le gradient provoquant l'entrée de  $\text{Na}^+$  qui permet l'introduction du glucose à l'encontre de son gradient propre. Le gradient de  $\text{Na}^+$  quant à lui est maintenu par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . ADP = adénosine diphosphate ; ATP = adénosine triphosphate ;  $\text{P}_i$  = phosphate inorganique

## Synthèse 5.5

Le transport actif nécessite une protéine transporteuse ainsi que de l'énergie, généralement sous forme d'ATP, pour transporter une molécule contre son gradient de concentration. La pompe sodium-potassium utilise l'ATP pour transporter  $\text{Na}^+$  dans une direction et  $\text{K}^+$  dans la direction opposée, créant et maintenant ainsi des différences de concentration de ces deux ions. Lors de transport couplé, un gradient de concentration d'une molécule est utilisé pour transporter une autre molécule contre son gradient ; c'est le cas par exemple du transport du glucose grâce au  $\text{Na}^+$ .

- Une protéine de canal peut-elle être impliquée dans le transport actif ? Pourquoi ?

## 5.6 Transport en vrac par endocytose et exocytose

### Objectifs

1. Distinguer endocytose et exocytose
2. Illustrer la façon dont l'endocytose peut être spécifique

La nature lipidique de la membrane plasmique pose un problème à la cellule : les substances qui lui sont nécessaires sont pour la plupart grandes et polaires et ne peuvent donc traverser la barrière hydrophobe de la bicouche lipidique. Comment ces substances entrent-elles donc dans la cellule ? Inversément certaines substances produites par la cellule doivent en sortir (voir par exemple la figure 4.12). Deux processus sont impliqués dans ces **transports en vrac** : l'*endocytose* et l'*exocytose*.

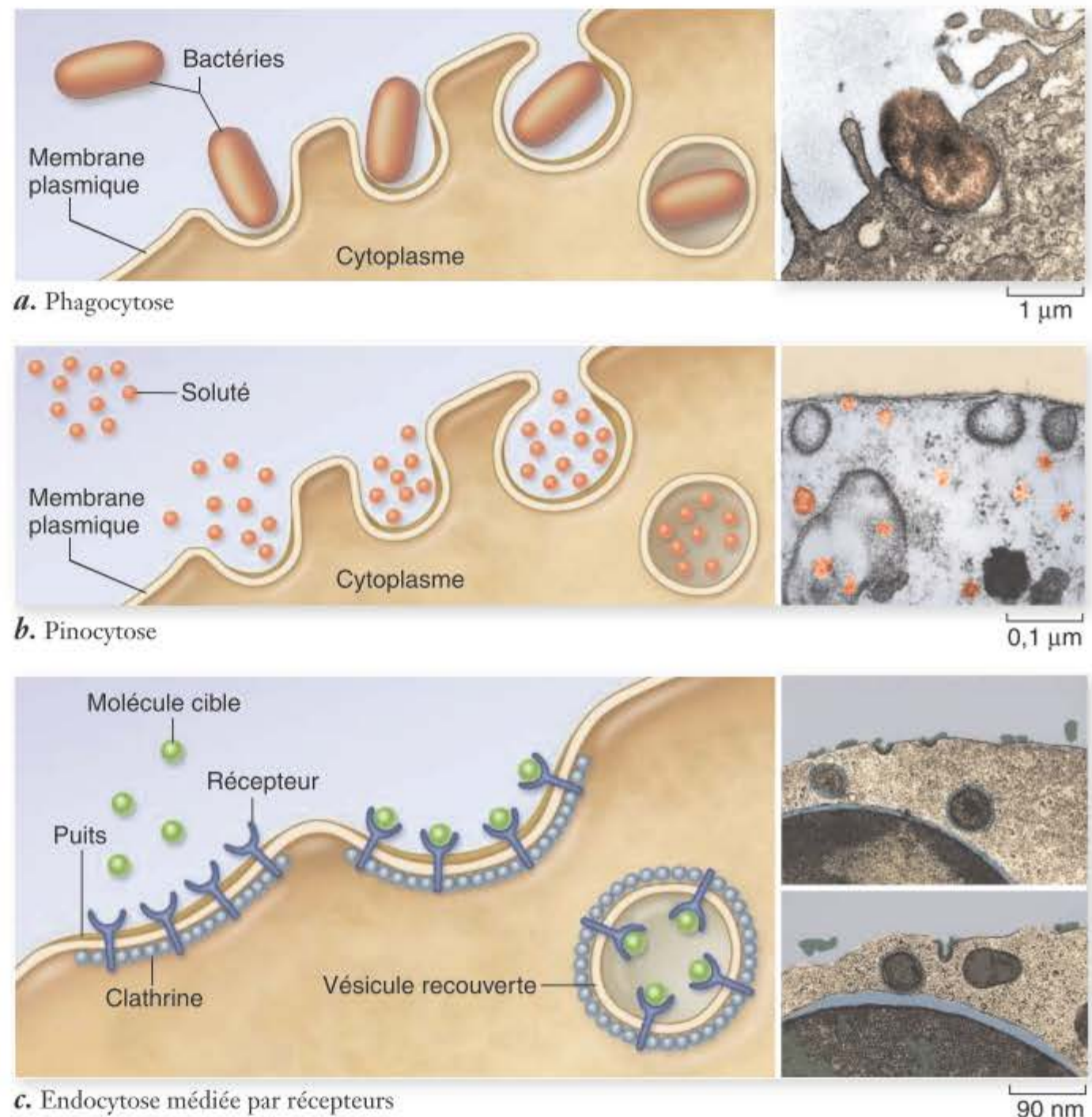
### C'est dans des vésicules que le matériel entre en vrac

Dans l'**endocytose**, la membrane plasmique enveloppe des particules nutritives et des fluides. Les cellules utilisent trois sortes d'endocytose : phagocytose, pinocytose et endocytose médiée par récepteur (figure 5.15). De même que le transport actif, l'endocytose requiert une dépense d'énergie.

#### Phagocytose et pinocytose

Selon que le matériel introduit dans la cellule est de type particulaire (cellule, fragment de matière organique...) (figure 5.15a) ou dissous (figure 5.15b), on parle de **phagocytose** ou de **pinocytose**. La pinocytose est fréquente chez les cellules animales. Les œufs de mammifères par exemple sont nourris par des cellules voisines ; celles-ci sécrètent des substances nutritives que l'œuf en développement absorbe par pinocytose. Pratiquement toutes les cellules eucaryotes font constamment appel à l'un ou l'autre type d'endocytose, capturant particules et fluide extracellulaire

**Figure 5.15 Endocytose.** La phagocytose (a) et la pinocytose (b) sont deux formes d'endocytose. Dans l'endocytose médiée par récepteur (c) la membrane plasmique présente des puits recouverts sur leur face interne d'une protéine, la clathrine ; la membrane y comporte également des protéines transmembranaires, les récepteurs. C'est à ce niveau que le processus d'endocytose est initié lorsque les récepteurs se sont liés à leurs molécules cibles. Illustrations photographiques obtenues en MET (des fausses couleurs ont été ajoutées pour mieux distinguer les structures) : (a) phagocytose d'une bactérie, *Rickettsia tsutsugamuchi*, par une cellule mésothéliale du péritoine d'une souris. La bactérie entre par phagocytose dans le cytoplasme de la cellule de l'hôte, où elle se multipliera. (b) Pinocytose dans une cellule de muscle lisse. (c) Apparition d'une dépression de la membrane plasmique d'un œuf en développement ; la surface interne de la dépression est couverte d'une assise de protéines. Lorsque la dépression est suffisamment chargée, son invagination s'accroît jusqu'à se refermer sur elle-même en formant une vésicule.



dans des vésicules et les ingérant. L'activité endocytotique varie fortement d'un type cellulaire à l'autre ; elle peut être étonnamment rapide : certains globules blancs ingèrent 25 % de leur volume par heure !

### Endocytose médiée par récepteur

L'incorporation de molécules spécifiques dans la cellule est souvent effectuée par endocytose médiée par récepteur. Les molécules concernées se fixent d'abord sur des **récepteurs spécifiques de la membrane plasmique** ; seules les molécules ayant une forme complémentaire de celle du récepteur peuvent s'y fixer. Chaque type de cellule possède une batterie de récepteurs spécifiques disposés dans sa membrane plasmique, chacun d'eux pouvant prendre en **charge une molécule déterminée**.

Les récepteurs possèdent un segment qui s'insère dans des zones de la membrane formant une dépression ou puits, tapissé, sur sa face interne, d'une protéine dénommée *clathrine*. Le puits fonctionne comme une trappe à souris moléculaire, se fermant sur lui-même et formant ainsi une vésicule interne lorsque les molécules appropriées y sont présentes (figure 5.15c). C'est la fixation appropriée des molécules sur leur récepteur qui déclenche le processus d'endocytose, processus hautement spécifique et rapide, qui aboutit donc à la présence, dans le cytosol, d'une vésicule contenant sa cargaison.

Parmi les molécules incorporées par endocytose médiée par récepteur, on citera les lipoprotéines de faible densité (LDL), molécules qui apportent du cholestérol aux cellules dans les membranes desquelles il sera incorporé. Le cholestérol joue un rôle clé dans la rigidité des membranes. Une maladie génétique, dénommée hypercholestérolémie, est liée au fait que le récepteur de LDL est dépourvu du segment responsable de sa fixation à la membrane au niveau du puits à clathrine et n'est donc jamais introduit dans la cellule. Le cholestérol reste donc dans le système sanguin des individus affectés, où il forme des dépôts dans les artères, provoquant des risques d'attaques cardiaques.

Il faut remarquer que l'endocytose n'introduit pas les substances directement dans le cytosol puisque le matériel incorporé reste séparé de celui-ci par la membrane de la vésicule.

### Du matériel peut quitter la cellule par exocytose

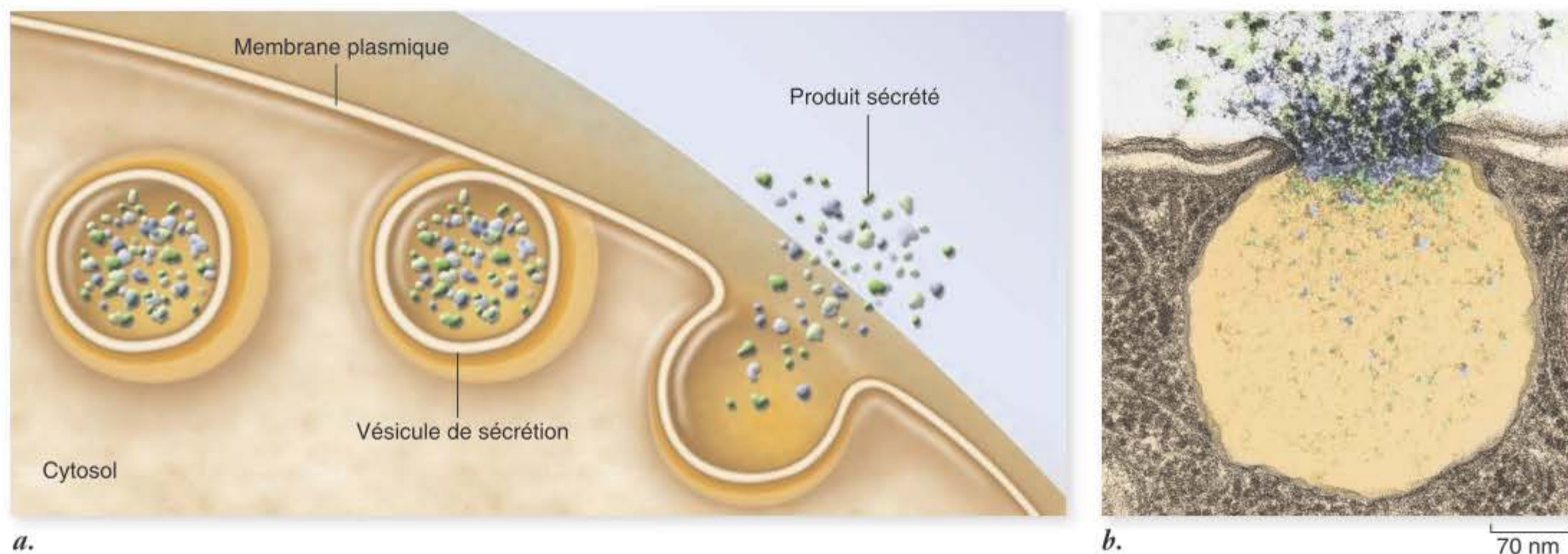
L'**exocytose** est l'inverse de l'endocytose, c'est le déchargement de matériel à la surface de la cellule par des vésicules (figure 5.16). Pour les cellules végétales, l'exocytose joue un rôle important dans l'exportation de matériaux nécessaires à la formation de la paroi. La décharge de vacuoles contractiles par certains protistes est une forme d'exocytose. Dans les cellules animales, l'exocytose est impliquée dans la sécrétion d'hormones, de neurotransmetteurs, d'enzymes digestives et d'autres substances.

Les mécanismes de transport à travers les membranes sont résumés à la table 5.2.

#### Synthèse 5.6

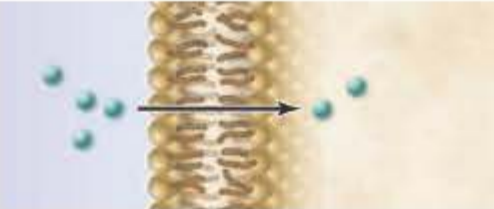
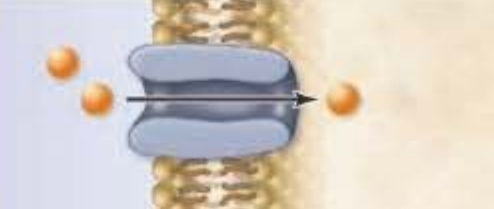
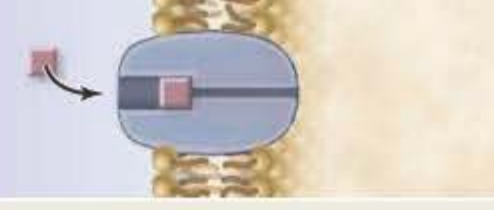


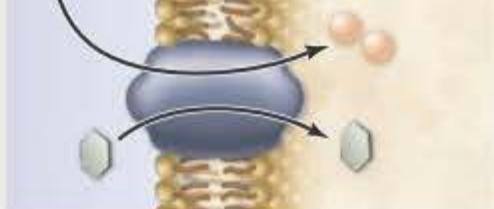
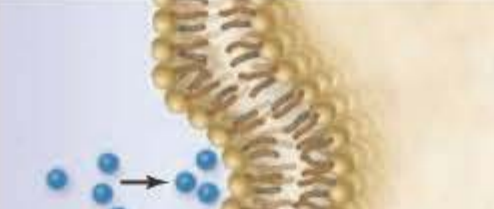


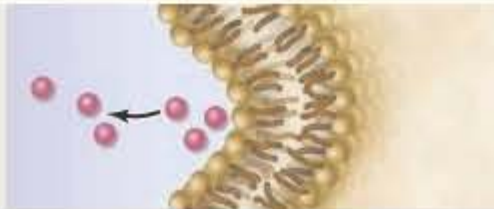
Des molécules de grande dimension et d'autres matériaux volumineux peuvent entrer et sortir des cellules par endocytose et exocytose, processus requérant de l'énergie. Certains types d'endocytose font appel à des récepteurs protéiques spécifiques présents dans la membrane plasmique, dont le chargement déclenche la formation des vésicules.

- Quels sont les caractères unissant transport par endocytose médiée par récepteur, transport par protéine transporteuse et catalyse enzymatique ?



**Figure 5.16 Exocytose.** (a) Des protéines ainsi que d'autres molécules sont sécrétées par des cellules dans des vésicules dont la membrane fusionne avec la membrane plasmique, libérant ainsi leur contenu dans le milieu externe. (b) Micrographie (MET) montrant (en fausses couleurs) un phénomène d'exocytose.

**TABEAU 5.2 Mécanismes de transport à travers la membrane plasmique**

Processus		Mode d'action	Exemple
<b>PROCESSUS PASSIFS</b>			
<b>Diffusion</b>			
Directe		Le mouvement aléatoire des molécules provoque une migration nette des molécules polaires vers la région la moins concentrée	Mouvement du dioxygène dans les cellules
<b>Diffusion facilitée</b>			
Canal protéique		Des molécules polaires ou des ions traversent un canal protéique; le mouvement net se fait vers la région de faible concentration	Entrée et sortie d'ions
Transporteur protéique		Une molécule se fixe sur un transporteur protéique transmembranaire qui lui fait traverser la membrane, le mouvement net étant orienté vers la région la moins concentrée	Entrée et sortie du glucose
<b>Osmose</b>			
Aquaporines		Diffusion d'eau à travers une membrane par osmose; requiert un gradient osmotique	Entrée d'eau dans des cellules placées dans une solution hypotonique
<b>PROCESSUS ACTIFS</b>			
<b>Transport actif</b>			
<b>Transporteur protéique</b>			
Pompe à Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>		Le transporteur dépense de l'énergie pour déplacer une substance à travers la membrane à l'encontre de son gradient de concentration	Transport de Na <sup>+</sup> et de K <sup>+</sup> à l'encontre de leurs gradients de concentration
Transport couplé		Le passage d'une molécule à travers la membrane à l'encontre de son gradient de concentration est assuré par un transport couplé de cette molécule avec un ion sodium ou un proton se déplaçant dans le sens de leur gradient de concentration	Transport du glucose à l'encontre de son gradient de concentration
<b>Endocytose</b>			
<b>Vésicule de membrane</b>			
Phagocytose		Une particule est entourée par une membrane qui se referme sur elle en formant une vésicule	Ingestion d'une bactérie par un globule blanc
Pinocytose		Des gouttelettes de fluide extracellulaire sont introduites dans une invagination de la membrane qui se referme sur elle en formant une vésicule	Alimentation des œufs de mammifères
Endocytose médiée par récepteur		Endocytose induite par un récepteur spécifique, formant des vésicules couvertes de clathrine	Absorption de cholestérol
<b>Exocytose</b>			
Membrane vesicle		Les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et leur contenu est sécrété hors de la cellule	Sécrétion de mucus; libération de neuromédiateurs; sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire

## 5.1 La structure des membranes

**Le modèle de la mosaïque fluide présente des protéines insérées dans une bicouche fluide de lipides.**

Les membranes sont des feuillettes constituées de bicouches de lipides associées à des protéines (figure 5.3). Les régions hydrophobes de la membrane sont orientées vers l'intérieur et les régions hydrophiles vers l'extérieur de la membrane. Selon le modèle de la mosaïque fluide, les protéines sont disposées sur ou dans la bicouche lipidique.

**Les membranes cellulaires comportent quatre groupes de composants.**

Les membranes des cellules eucaryotes sont faites de quatre composants : une bicouche de phospholipides, des protéines transmembranaires (protéines intrinsèques), un réseau de protéines internes et des marqueurs de surface. Le réseau de protéines internes est constitué de filaments du cytosquelette et de protéines extrinsèques, qui sont associées, mais non intégrées aux membranes. Les surfaces des membranes contiennent des glycoprotéines et des glycolipides qui agissent comme marqueurs d'identité des cellules.

Cholestérol et sphingolipides peuvent s'associer pour former des microdomaines dans la membrane plasmique, dont les deux faces ne sont par ailleurs pas identiques.

**La microscopie électronique confirme la structure proposée par le modèle de la mosaïque fluide.**

Les microscopies électroniques à transmission et à balayage confirment la structure proposée par le modèle de la mosaïque fluide.

## 5.2 Les phospholipides, bases des membranes

Les phospholipides sont constitués de deux acides gras et d'un groupe phosphate liés au glycérol, molécule à trois carbones.

**Les phospholipides forment spontanément des bicouches.**

Le groupe phosphate du phospholipide est polaire et hydrophile ; les acides gras y sont apolaires et hydrophobes et s'écartent de la tête polaire. La région interne apolaire de la bicouche fait barrière au passage de l'eau et des substances solubles dans l'eau.

**La bicouche phospholipidique est fluide.**

Les liaisons hydrogène des molécules d'eau maintiennent l'organisation en bicouche de la membrane ; les phospholipides et les protéines membranaires sont cependant relativement libres de mouvement dans le plan de la bicouche.

**La fluidité des membranes varie en fonction de leur composition en lipides.**

La fluidité des membranes dépend de la composition des acides gras qui les composent. S'ils sont insaturés, la fluidité de la membrane tend à augmenter, en raison des coudes produits par leurs doubles liaisons. La fluidité est également affectée par la température.

**La composition en phospholipides affecte la structure des membranes.**

Les membranes des divers compartiments de la cellule diffèrent par leur composition en phospholipides, ce qui affecte tant leur structure que leur fonction ; ces différences se maintiennent malgré les trafics de phospholipides entre membranes.

## 5.3 Les protéines, molécules aux fonctions multiples

**Les protéines et les complexes protéiques exercent des fonctions essentielles.**

Les transporteurs sont des protéines intrinsèques transférant des molécules spécifiques de part et d'autre des membranes. Des enzymes sont souvent présentes sur la face interne des membranes. Des récepteurs cellulaires de surface répondent à des messages chimiques externes en provoquant des modifications dans le milieu interne. Des marqueurs cellulaires de surface permettent aux cellules de se reconnaître entre elles. Des protéines d'adhérence lient les cellules les unes aux autres. Des protéines de surface lient les cytosquelettes de cellules voisines.

**Les caractéristiques structurales des protéines membranaires sont liées à leurs fonctions.**

Les protéines de surface sont fixées sur la membrane par des régions polaires s'associant à des régions polaires des phospholipides. Les protéines

transmembranaires traversent la bicouche une ou plusieurs fois, chacune des régions traversant la membrane étant dénommée domaine transmembranaire. Ces domaines sont composés d'acides aminés hydrophobes, le plus souvent organisés en hélice  $\alpha$ . Dans certaines protéines cependant, des feuillettes  $\beta$  forment dans la membrane un passage dont la surface est polaire ; les porines en sont un exemple.

## 5.4 Transport passif à travers les membranes

**Certains transports se réalisent par simple diffusion.**

La diffusion simple est le passage passif d'une substance le long d'un gradient chimique ou électrique. Les membranes biologiques représentent une barrière pour les molécules polaires, hydrophiles, alors qu'elles permettent le libre passage de substances hydrophobes.

**Des protéines assurent une diffusion sélective à travers les membranes.**

Les ions, de même que les molécules hydrophiles d'une certaine taille, ne peuvent traverser la bicouche lipidique, si ce n'est à l'aide de canaux ou de protéines transporteuses ; on parle alors de diffusion facilitée. Les canaux permettent la diffusion d'ions spécifiques à travers la membrane en y formant des pores aqueux. Les protéines transporteuses fixent les molécules qu'elles transportent, un peu comme le font les enzymes ; la vitesse de transport par ces protéines est limitée par le nombre de celles-ci dans la membrane.

**L'osmose est le mouvement de l'eau à travers les membranes.**

La direction du mouvement de l'eau dans le contexte de l'osmose dépend de la concentration de soluté de part et d'autre de la membrane (figures 5.11 et 5.12). Les solutions peuvent être isotoniques, hypotoniques ou hypertoniques. Des cellules placées dans une solution isotonique s'y trouvent en équilibre osmotique ; plongées dans une solution hypotonique, les cellules absorberont de l'eau, tandis que dans une solution hypertonique elles en perdront. Les aquaporines sont des canaux facilitant la diffusion de l'eau.

## 5.5 Transport actif à travers la membrane

**Le transport actif utilise de l'énergie pour transférer des substances à l'encontre d'un gradient de concentration.**

Le transport actif fait appel à des protéines transporteuses spécialisées qui couplent le transport à une source d'énergie. On les classe en fonction du nombre de molécules transportées et de la direction du transport. Les uniports transfèrent une substance donnée dans une direction, les symports transfèrent deux substances dans la même direction, les antiports en transportent également deux mais dans des directions opposées.

**La pompe sodium/potassium emploie directement l'ATP.**

La pompe sodium/potassium transporte  $\text{Na}^+$  hors de la cellule et  $\text{K}^+$  dans celle-ci à l'encontre de leurs gradients de concentration. Lors de chaque cycle, trois  $\text{Na}^+$  quittent la cellule tandis que deux  $\text{K}^+$  y entrent. Cette pompe semble omniprésente dans les cellules animales.

**Les transports couplés utilisent l'ATP de manière indirecte.**

Le transport couplé utilise le gradient de concentration d'une molécule pour transporter une autre molécule contre son gradient de concentration. Lorsque les deux molécules se déplacent dans la même direction on parle de symport, dans le cas contraire, d'antiports.

## 5.6 Transport en vrac par endocytose et exocytose

Le transport en vrac transfère de grandes quantités de substances incapables de traverser les membranes.

**Le matériel concerné pénètre dans la cellule dans une vésicule.**

Dans le processus d'endocytose, la membrane plasmique s'invagine, entourant du matériel du milieu extérieur ; elle l'isole dans une vésicule, qu'elle libère dans le cytoplasme. Dans le cas d'endocytose médiée par récepteur, ce sont des molécules spécifiques qui se fixent sur des récepteurs de la membrane plasmique.

**Le matériel peut quitter la cellule par exocytose.**

Dans l'exocytose, du matériel cellulaire est enclos dans une vésicule et déchargé dans le milieu extérieur lors de la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique.

## COMPRÉHENSION

- Le modèle de la mosaïque fluide décrit la membrane comme
  - contenant une quantité appréciable d'eau
  - composée de phospholipides fluides à l'extérieur et de protéines à l'intérieur
  - composée de protéines à l'extérieur et de phospholipides fluides à l'intérieur
  - composée de protéines et de lipides pouvant se mouvoir librement
- Quelle caractéristique chimique l'intérieur de la bicouche lipidique possède-t-elle ?
  - elle est hydrophobe
  - elle est hydrophile
  - elle est polaire
  - elle est saturée
- Le domaine transmembranaire d'une protéine intrinsèque
  - est composé d'acides aminés hydrophobes
  - forme souvent des hélices  $\alpha$
  - peut traverser plusieurs fois la membrane
  - présente à la fois les caractères a, b, et c
- La fonction spécifique d'une membrane de la cellule est déterminée par
  - le degré de saturation de ses acides gras constitutifs
  - la localisation de la membrane dans la cellule
  - la présence de radeaux lipidiques et de cholestérol
  - le type et le nombre de protéines membranaires
- Le mouvement d'eau à travers une membrane dépend
  - de la concentration du solvant
  - de la concentration de soluté
  - de la présence de protéines transporteuses
  - du potentiel de membrane
- Si on plonge une cellule dans un environnement isotonique
  - la cellule gonflera par absorption d'eau
  - il n'y aura pas de passage d'eau à travers la membrane
  - la cellule se contractera par perte d'eau
  - il y aura toujours osmose, mais sans gain ni perte d'eau
- Lequel des quatre processus ne constitue-t-il PAS un mécanisme permettant l'entrée de matériel dans la cellule ?
  - l'exocytose
  - l'endocytose
  - la pinocytose
  - la phagocytose

## APPLICATIONS

- Une cellule bactérienne capable d'altérer la composition des acides gras insaturés de ses lipides membranaires est adaptée à un environnement froid. Si cette bactérie est transférée dans un environnement plus tempéré elle réagira en
  - accroissant la quantité de cholestérol dans sa membrane
  - altérant le nombre de protéines de sa membrane
  - accroissant le degré de saturation des acides gras de sa membrane
  - accroissant le pourcentage d'acides gras insaturés dans sa membrane
- Quelle(s) variable(s) influence(nt)-t-elle(s) la capacité de passage d'une molécule apolaire par diffusion passive ?
  - la structure de la bicouche de phospholipides
  - la différence de concentration de la molécule de part et d'autre de la membrane
  - la présence de protéines de transport dans la membrane
  - les trois variables ci-dessus

- La perméabilité sélective des membranes n'est PAS influencée par
  - la spécificité des protéines transporteuses de la membrane
  - la sélectivité des protéines de canal de la protéine
  - la barrière hydrophobe de la bicouche phospholipidique
  - la formation de liaisons hydrogène entre l'eau et les groupes phosphate
- En quoi transport actif et transport couplé sont-ils liés ?
  - tous deux utilisent l'ATP pour déplacer des molécules
  - le transport actif établit un gradient de concentration, contrairement au transport couplé
  - le transport couplé utilise un gradient de concentration établi par un transport actif
  - le transport actif transporte une molécule, le transport couplé en transporte deux
- Une cellule peut utiliser le processus de diffusion facilitée pour
  - concentrer une molécule, le glucose par exemple, dans la cellule
  - évacuer une molécule toxique hors de la cellule
  - transporter des ions ou des molécules polaires de grande taille à travers la membrane quelle que soit la concentration
  - transporter des ions ou des molécules polaires de grande taille d'une région de concentration élevée vers une région de faible concentration

## RÉVISION

- La figure 5.5 décrit une expérience classique démontrant la capacité qu'ont des protéines de se déplacer dans le plan de la membrane plasmique. Le tableau suivant résume trois expériences différentes utilisant la fusion de cellules humaines et de souris marquées.

Expérience	Conditions	Température (°C)	Résultat
1	Fusion de cellules humaine et de souris	37	Protéines membranaires mélangées
2	Fusion de cellules humaine et de souris en présence d'inhibiteurs de l'ATP	37	Protéines membranaires mélangées
3	Fusion de cellules humaine et de souris	4	Protéines membranaires non mélangées

Quelles conclusions pouvons-nous tirer concernant le mouvement de ces protéines ?

- Chaque compartiment du système endomembranaire d'une cellule est en relation avec la membrane plasmique. Présentez un schéma d'une cellule comportant le RER, l'appareil de Golgi, une vésicule et la membrane plasmique. En commençant par le RER, utilisez deux couleurs pour représenter les parties interne et externe de la bicouche lipidique de chacune de ces membranes. Qu'observez-vous ?
- La distribution des lipides dans la membrane du RE est symétrique, c'est-à-dire la même dans les deux couches de la membrane. La distribution des lipides membranaires n'est pas symétrique dans l'appareil de Golgi ni dans la membrane plasmique. Par quel processus pourrait-on expliquer ces observations ?