



# UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Faculté de Médecine

Département de Neurosciences fondamentales

## Transport Membranaire

(Cours du 2, 7, et 9 décembre 2005)

Professeur Alex J. Baertschi

*(Extraits révisés de l'ouvrage des Professeurs  
R.C. de Sousa et A.J. Baertschi de 2002-2003)*

<b>MEMBRANE PLASMIQUE ET ESPACES LIQUIDIENS</b>	2
Introduction	2
Les espaces liquidiens	2
<b>LES MEDIATEURS DU TRANSPORT MEMBRANAIRE</b>	4
Uniports, symports, antiports	4
Transport passif et transport actif	7
<b>BIOPHYSIQUE SIMPLE DU TRANSPORT MEMBRANAIRE</b>	7
<b>LES MECANISMES DU TRANSPORT MEMBRANAIRE</b>	8
<b>Transport passif par diffusion</b>	9
Diffusion simple	9
Electrodifusion	13
Diffusion facilitée	16
<b>Transport principalement actif</b>	20
Pompes ioniques	20
Autres pompes	25
Cinétique du transport actif ; épithélium et transport actif de sodium	25
<b>Transport secondairement actif</b>	27
Cotransport par symport	27
Cotransport par antiport	31
<b>Transport d'eau</b>	33
Tonicité et osmolarité	33
Canaux d'eau (aquaporines)	33
Osmose et biophysique du transport d'eau	33
Pression colloïdo-osmotique	34
Régulation du flux d'eau par la vasopressine	38

## INTRODUCTION

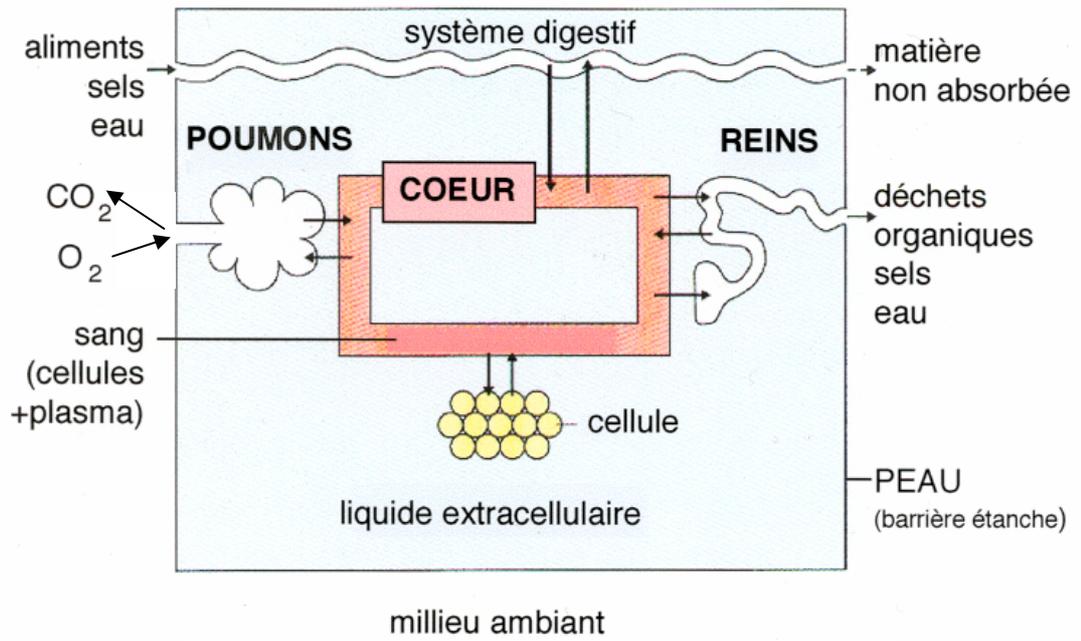
Bien que l'extérieur de l'organisme soit délimité par un tégument, la peau, plusieurs structures à l'*intérieur du corps* - revêtues par des épithélia - sont en contact direct avec le monde *extérieur* (**Fig. 1**): c'est le cas du tube digestif; de l'arbre respiratoire; de l'appareil urinaire; et de l'appareil reproducteur. Entre ces deux limites épithéliales, l'ensemble des membranes plasmiques des cellules sépare deux espaces : a) un espace *intracellulaire*, rempli d'un *liquide intracellulaire*; b) un espace *extracellulaire*, rempli d'un *liquide extracellulaire* (le "milieu intérieur" de Claude Bernard). Dans ce dernier espace, il convient de distinguer (**Fig. 2**): (i) un compartiment *intravasculaire*, rempli de *sang*; (ii) le *restant* du liquide extracellulaire, appelé *liquide interstitiel*, situé entre les cellules.

Pour subvenir à leurs besoins énergétiques, les cellules reçoivent un *flux continu de nutriment* par le tube digestif, *et un flux d'oxygène* par le système respiratoire (**Fig. 1**). Ces deux systèmes constituent donc deux portes d'entrée dans le milieu intérieur d'une importance capitale. Il faut ensuite acheminer ces différentes substances et l'oxygène vers toutes les cellules, ce qui est le fait du système *cardiovasculaire*. La raison d'être de ce système est claire: *l'organisme doit disposer d'un système de transport rapide par convection*. En effet, si les échanges entre le monde extérieur et les cellules dépendaient exclusivement d'un transport par diffusion, la lenteur de ce processus pour de **longues distances** est telle que la survie de l'organisme deviendrait tout simplement impossible. A noter cependant des phénomènes de diffusion cruciaux qui ont lieu sur **de très courtes distances** à travers les épithélia des alvéoles du poumon, et à travers les villosités de l'intestin, *vers* les capillaires sanguins de ces organes; d'autres transports par diffusion ont lieu depuis les capillaires sanguins de n'importe quel territoire de l'organisme *vers* les cellules respectives. Ainsi nourries, les cellules peuvent effectuer les réactions chimiques complexes de leur métabolisme, réactions qui produisent des déchets métaboliques (CO<sub>2</sub>, urée, acide urique, créatinine, etc.) dont la cellule doit se débarrasser en les transportant vers le milieu intérieur. Les déchets sont repris par le système circulatoire et acheminés vers le système *respiratoire*, pour l'élimination du CO<sub>2</sub>, et vers le système *urinaire* pour l'excrétion rénale de la plupart des autres déchets. Il faut ajouter l'élimination de certaines substances par l'appareil *digestif* via la *sécrétion biliaire*.

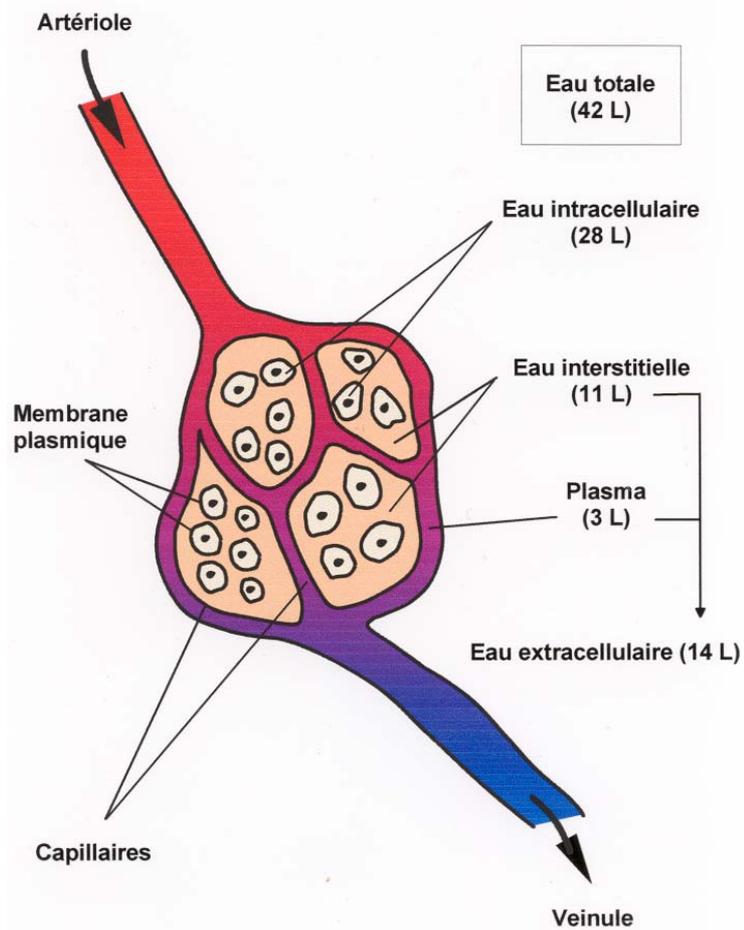
Quatre grands systèmes végétatifs sont donc essentiels à l'économie de l'organisme: les systèmes digestif, urinaire, respiratoire et circulatoire. Leurs activités respectives sont ajustées par de multiples boucles de régulation, sous le contrôle des système nerveux et endocrinien. Le tout aboutit à une **homéostasie générale de l'organisme**, révélée par la constance du milieu intérieur. Constance qui est passée, en un siècle et demi de recherches, du stade de *vision* géniale anticipatoire de Claude Bernard à celui de *fondement* indiscutable de la physiologie et de la médecine modernes. Cette conception mécaniste de la vie, bien que limitée, prévaut aujourd'hui. Il restent, cependant, des phénomènes importants - telles que la conscience et les émotions - qui devront trouver une explication dans l'avenir.

## MEMBRANE PLASMIQUE ET LES ESPACES LIQUIDIENS

La membrane plasmique a deux fonctions, en apparence contradictoires. La première fonction est de former une **barrière de séparation** entre deux milieux aqueux dont la composition chimique est fort différente (**Tableau 1**). La deuxième fonction est de permettre la **communication** entre les cellules et leur milieu environnant, communication sans laquelle la vie des cellules, et partant celle de l'organisme, serait impossible. La bicouche lipidique de la membrane remplit essentiellement la **fonction de séparation** pour les substances *hydrophiles*. Elle est en effet une barrière quasi infranchissable pour l'eau, les ions inorganiques et pour des substances organiques telles que le glucose (**Fig. 3**). En revanche, la bicouche est très perméable à l'O<sub>2</sub>, au CO<sub>2</sub>, et bien évidemment à des molécules organiques *liposolubles*. La **Fig. 4** illustre que des molécules liposolubles passent facilement une membrane biologique. Cette facilité de passage est mesurée par le coefficient de perméabilité, alors que la liposolubilité est mesurée par le coefficient de partition huile:eau. En général, à liposolubilité égale, les petites molécules passent plus facilement que les grandes molécules (**Fig. 4**).



**Fig. 1** Des systèmes dans leur ensemble



**Fig. 2** Distribution de l'eau

Certaines protéines de la membrane plasmique permettent la **fonction de communication**. Plus précisément, ces protéines représentent des *voies de transport transmembranaire*, en général d'une grande *spécificité*. C'est le cas des nombreux canaux ioniques, des canaux d'eau (aquaporines), des divers transporteurs du glucose, etc. A noter cependant que les protéines membranaires ne sont pas toutes des voies de transport; certaines sont impliquées dans une série d'autres fonctions telles que récepteurs d'hormones, enzymes membranaires, et marqueurs immunologiques.

### Volume et composition des liquides corporels

Revenons maintenant aux liquides corporels, en particulier à leur **volume** et à leur **composition chimique**. L'eau est quantitativement le principal constituant de l'organisme. Chez l'adulte, elle représente environ **60%** du poids corporel; autrement dit un homme de 70 kg porte en lui **42 L** d'eau. Ceux-ci vont se répartir de la façon suivante (**Fig. 2**): 2/3 (**28 L**) se trouvent dans l'espace **intracellulaire**; 1/3 (**14 L**) dans l'espace **extracellulaire**. Dans ce dernier, une subdivision est encore à signaler : environ **3 L** (soit 1/5 ou 20% du liquide extracellulaire) sont confinés dans le compartiment **intravasculaire** et constituent le plasma sanguin; le reste, *ca.* **11 L** (soit 4/5 ou 80 % du liquide extracellulaire) constitue le **liquide interstitiel** dans lequel baignent les cellules. Selon les traités que l'on consulte, on trouvera de petites différences par rapport aux chiffres indiqués ici, ce qui est sans importance. Une partie du cours sera consacrée aux régulations des volumes, qui est d'une grande importance en physiologie et en clinique.

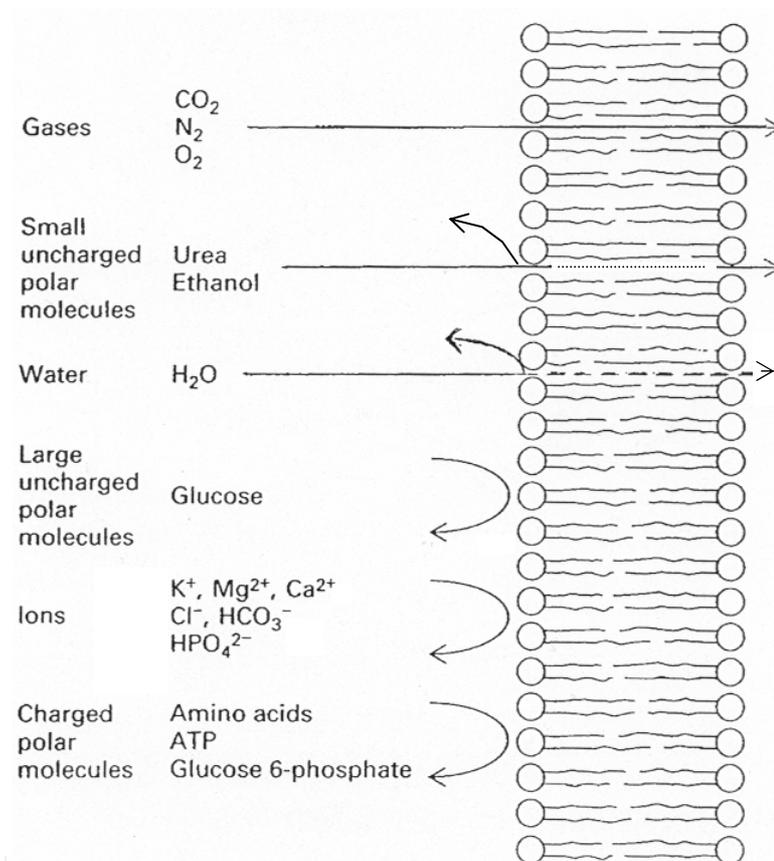
Qu'en est-il de la **composition** des liquides corporels ? Voici deux notions capitales à ce sujet : 1) la composition est *différente* entre le liquide intracellulaire et le liquide extracellulaire (**Tableau 1**); 2) la composition est assez *semblable* entre le plasma et le liquide interstitiel. L'asymétrie de composition entre les liquides intra- et extracellulaire est absolument vitale. Les différences les plus marquées concernent : a) l'ion **Na<sup>+</sup>**, qui est le cation principal du liquide extracellulaire, tandis que sa concentration intracellulaire est faible; b) l'ion **K<sup>+</sup>** qui, à l'opposé du Na<sup>+</sup>, est abondant dans le liquide intracellulaire et peu concentré à l'extérieur; c) l'anion **Cl<sup>-</sup>**, dont la distribution ressemble à celle du Na<sup>+</sup>; d) les **phosphates** et les **protéines** qui sont fortement concentrés dans le milieu intracellulaire. En ce qui concerne le liquide interstitiel, la concentration des protéines y est environ **4-5 fois plus faible que** dans le plasma. Les valeurs pour le liquide intracellulaire du **Tableau 1** correspondent à des concentrations moyennes. Certains types cellulaires montrent des déviations importantes par rapport à cette moyenne. Au sujet du calcium, signalons que la valeur intracellulaire de 1,5 mM représente la concentration de *calcium total* intracellulaire, ce qui inclut les réserves de calcium. La concentration de *calcium ionisé* intracellulaire [**Ca<sup>++</sup>**]<sub>i</sub>, ou *calcium cytosolique*, est beaucoup plus faible, de l'ordre de 10<sup>-7</sup> M. Du point de vue physiologique, c'est la concentration de calcium ionisé qui est déterminante.

## LES MÉDIATEURS DU TRANSPORT MEMBRANAIRE

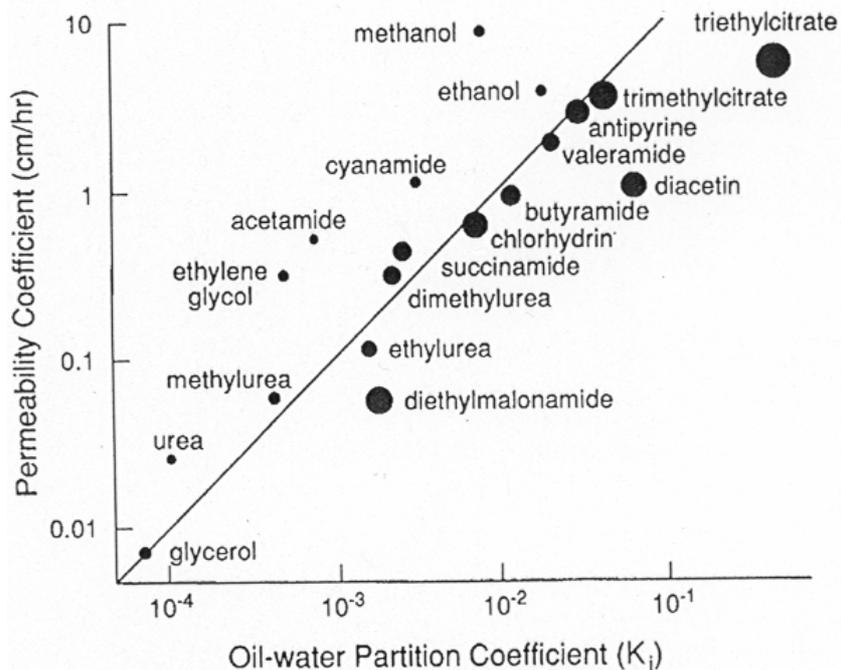
### Uniports, symports, antiports

Alors que les molécules **lipophiles** traversent la membrane par **diffusion**, la situation est tout autre pour le passage des molécules **hydrophiles**. Celles-ci ne se *dissolvent* pas facilement dans les lipides membranaires et de ce fait ont une probabilité très réduite de pouvoir diffuser à travers la bicouche de la membrane plasmique. Afin d'assurer des taux de transport compatibles avec les besoins physiologiques de la cellule, l'intervention de plusieurs **protéines membranaires** est indispensable pour effectuer le transfert de molécules hydrophiles. Pendant de nombreuses années, les protéines liées au transport membranaire ont eu un statut de simples *métaphores biophysiques*. De nos jours, elles sont devenues des *entités biochimiques*, dont on connaît la séquence des acides aminés, l'expression tissulaire et, dans certains cas, la structure tridimensionnelle. Actuellement, il est possible d'isoler un système de transport membranaire et de le reconstituer fonctionnellement dans une membrane lipidique artificielle.

La classification des protéines impliquées dans le transport membranaire, ainsi que la classification des mécanismes physico-chimiques qui le régissent, sont des sujets controversés. Nous ferons ici un effort particulier pour dégager les aspects principaux de ce problème. Dans un premier temps, classons les protéines membranaires liées au transport dans les trois catégories générales suivantes :



**Fig. 3** *Passage de différentes molécules à travers une bicouche lipidique (sans transport facilité)*



**Fig. 4** *Passage de différentes molécules à travers une membrane biologique selon leur solubilité dans l'huile. Le diamètre des points dénote la taille de la molécule.*

**Tableau 1. Composition des liquides corporels**

Espèce chimique	Liquide extra-cellulaire (mM)	Liquide intra-cellulaire (mM)
Na <sup>+</sup>	145	15
K <sup>+</sup>	4	150
Ca <sup>2+</sup>	1	1,5
Mg <sup>2+</sup>	1,5	12
Cl <sup>-</sup>	110	10
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	24	10
P <sub>i</sub>	2	40
Acides aminés	2	8
Glucose	5,6	1
ATP	0	4
Protéines	0,2	4

Adapté de "Human Physiology" par Vander et al. (1994)

**Tableau 2. Principaux types de protéines et de mécanismes impliqués dans le transport à travers des membranes biologiques**

Protéine transporteuse	Mécanisme du transport
Canaux	Transport passif
Pompes	Transport actif
Uniports ( <i>diffusion facilitée</i> )	Transport passif
Symports	Transport secondairement actif
Antiports	Transport secondairement actif

- Uniport** : protéine qui transporte *une seule* espèce chimique à la fois ;  
**Symport** : protéine qui transporte simultanément *deux, ou plus de deux*, espèces chimiques dans le **même sens** ;  
**Antiport** : protéine qui transporte successivement *deux, ou plus de deux*, espèces chimiques dans **deux sens opposés**.

Dans un deuxième temps, prenons en considération *la nature passive ou active* des processus de transport en question. La classification présentée au **Tableau 2** correspond à celle qui s'accorde au mieux aux connaissances et aux tendances actuelles, sans être toutefois entièrement satisfaisante. Dans un sens strict, les **uniports** sont des protéines qui transportent passivement des substances organiques (p. ex. le glucose) par un processus dit de **diffusion facilitée**. Les **symports** et les **antiports** sont des protéines qui transportent des *solutés organiques et/ou des ions inorganiques* par un processus dit **secondairement actif**. Le terme "secondairement actif" signifie que dans ce type de transport on utilise l'énergie contenue dans un gradient ionique transmembranaire (exemple: sodium) engendré par un **transport actif** (exemple: pompe à sodium). Le devenir rapide des connaissances relatives au transport membranaire oblige à être prudent et pragmatique à l'égard des différentes classifications proposées à ce jour : *aucune ne fait l'unanimité*. L'important c'est qu'elles nous permettent de saisir les caractéristiques principales d'un phénomène de transport donné.

### Transport passif et transport actif

L'existence d'un **flux net** d'une substance  $i$  ( $J_i$ ) à travers une membrane, qu'elle soit biologique ou non biologique, signifie : a) que la membrane est **perméable** à la substance  $i$  ; b) qu'il y a une « **force** »  $X$  agissant sur  $i$  *qui détermine* le flux  $J_i$  *dans un sens donné*.

Ces « forces » dérivent des *gradients des potentiels thermodynamiques* classiques : gradient de *température* ( $dT/dx$ ); gradient de *pression* ( $dP/dx$ ), gradient *chimique* ( $d\mu/dx$ ); et gradient *électrochimique* ( $d\tilde{\mu}/dx$ ). Dans les deux types de membranes, biologiques et non biologiques, on parle de transport **passif** d'une substance  $i$  si l'énergie contenue dans ces gradients transmembranaires de potentiel thermodynamique rend compte **quantitativement** du flux transmembranaire de  $i$ .

S'il s'agit d'une membrane *biologique*, le flux net de  $i$  peut **ne pas** s'expliquer, partiellement ou totalement, par les forces thermodynamiques que nous venons d'évoquer. Dans ce cas, *et en l'absence de couplage* du flux de  $i$  avec les flux d'autres substances présentes dans un système donné, l'énergie nécessaire pour effectuer le transport de  $i$  provient, partiellement ou totalement, du *métabolisme cellulaire*: on parle alors de **transport primairement actif** ou de **transport directement couplé au métabolisme**. Très souvent, le transport actif est défini comme le transport qui s'effectue **contre un gradient**. En effet, en biologie le transport actif d'une substance  $i$  se fait **souvent contre son gradient chimique ou électrochimique**. Conceptuellement, cette définition est cependant trop restrictive. Théoriquement rien n'empêche qu'un transport actif se fasse dans le *sens* d'un gradient ou *en l'absence* d'un gradient. Par conséquent, pour certains auteurs, dont la thermodynamicienne Ora Kedem, *ce qui caractérise le transport primairement actif c'est le couplage direct avec le métabolisme cellulaire*.

## BIOPHYSIQUE SIMPLE DU TRANSPORT MEMBRANAIRE

Comment distinguer, *opérationnellement*, si un processus de transport donné est actif ou passif ? Il y a différentes façons. Du point de vue biophysique, une possibilité à envisager est le recours à **l'équation de Ussing-Teorell**

$$f = \exp ( X / RT )$$

$f$  étant le quotient des flux transmembranaires ( $f = \text{influx} / \text{efflux}$ , où l'influx est le flux d'une substance  $i$  d'un compartiment 1 au compartiment 2, et l'efflux est le flux de la substance  $i$  du compartiment 2 au compartiment 1 (voir aussi **Fig. 6**) ;  $X$  la négative du gradient de potentiel chimique (ou électrochimique) d'une substance  $i$ ;  $R$  la constante des gaz ; et  $T$  la température absolue.

Si la valeur **expérimentale** de **f** est égale, dans les limites d'erreur des méthodes expérimentales, à la valeur **théorique** prédite par l'**exponentielle X/RT**, le flux de *i* est **passif**. Si **f** diverge de cette valeur, le transport de *i* est en principe **actif** et par conséquent couplé au métabolisme cellulaire. Il faudra vérifier cependant que la déviation de **f** par rapport à la valeur de **exp (X/RT)** ne soit due à un couplage du flux de la substance *i* ( $J_i$ ) avec les flux d'autres espèces chimiques.

A ce stade, il est utile d'examiner les expressions qui nous donnent la valeur de **X** à partir de la différence de potentiel chimique ( $\Delta\mu$ ) ou électrochimique ( $\Delta\tilde{\mu}$ ) à travers une membrane d'épaisseur  $\Delta x$ . Si la substance *i* n'est pas chargée, **X** dépend de la différence transmembranaire de **potentiel chimique de i** et est donné par l'expression

$$\mathbf{X} = -\Delta\mu_i = -RT \ln (C_2 / C_1)$$

où  $C_1$  et  $C_2$  sont les concentrations de *i* respectivement dans les compartiments 1 et 2. Si la substance *i* est chargée, il faut tenir compte de la différence de potentiel électrique transmembranaire,  $\Delta\Psi$ . **X** dépend alors de la différence transmembranaire de **potentiel électrochimique de i** et est donnée par l'expression

$$\mathbf{X} = -\Delta\tilde{\mu}_i = -[RT \ln (C_2 / C_1) + z_i F \Delta\Psi]$$

où  $z_i$  = valence de *i*,  $F$  = constante de Faraday et  $\Delta\Psi = \Psi_2 - \Psi_1$ .

Une fois connues les expressions mathématiques pour  $\Delta\mu_i$  et pour  $\Delta\tilde{\mu}_i$ , voyons, à l'aide d'un exemple très simple, la distinction entre un transport passif et actif. Soit une substance *i*, non chargée, qui traverse une membrane séparant deux compartiments 1 et 2. La concentration de *i* est de 4 mM dans le compartiment 1 et de 1 mM dans le compartiment 2. A l'aide d'*isotopes*, on mesure le flux ( $_{1 \rightarrow 2}$ ) ou *influx*, et le flux ( $_{2 \rightarrow 1}$ ) ou *efflux*. Supposons que la valeur du quotient  $f = \text{influx/efflux}$  soit égale à  $4,03 \pm 0,12$  (moyenne  $\pm$  écart type). *S'agit-il d'un transport passif ou actif ?*

Pour répondre à cette question, il faut comparer la valeur expérimentale de  $f$  calculée à partir des flux isotopiques et la valeur théorique calculée à partir de l'expression *exp (X/RT)*. Comme nous l'avons vu,

$$\mathbf{X} = -\Delta\mu_i = -RT \ln (C_2 / C_1) = RT \ln (C_1 / C_2)$$

$$f = \exp (\mathbf{X}/RT)$$

et, par réarrangement

$$RT \ln f = \mathbf{X} = RT \ln (C_1 / C_2) \quad \text{d'où} \quad f = C_1 / C_2$$

Par conséquent, si l'on applique l'équation d'Ussing-Teorell au transport passif d'une substance non chargée, **f** doit être égal au quotient  $C_1/C_2$ . Du fait que dans cet exemple précis la valeur expérimentale ( $4,03 \pm 0,12$ ) et la valeur théorique (4,0) sont statistiquement identiques, nous pouvons affirmer que le transport de *i* dans ce système est **passif**.

## LES MÉCANISMES DU TRANSPORT MEMBRANAIRE

Nous allons diviser ce sujet en quatre parties principales. Dans la *première partie*, nous examinerons le **transport passif par diffusion** dans trois situations précises: a) la *diffusion simple* ; b) l'*électrodiffusion* ; c) la *diffusion facilitée*. La *deuxième partie* sera consacrée au **transport primairement actif**, en particulier aux  **pompes ioniques** ou **ATPases**, avec un accent particulier sur le transport actif de  $\text{Na}^+$  par des épithéliums. Dans la *troisième partie*, nous aborderons le **transport secondairement actif**, dans deux situations bien définies : a) le *cotransport par symport* ; b) le

**cotransport par antiport**, ou **contre-transport**. Dans la *quatrième partie*, nous reviendrons sur un autre transport passif, le **transport d'eau**.

## Transport passif par diffusion

### Diffusion simple (ou libre)

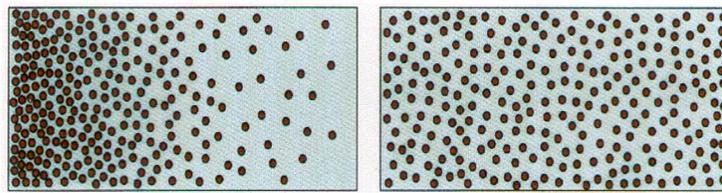
La diffusion d'une substance  $i$  dans un milieu donné est le **mouvement des molécules de  $i$  des régions où la substance est plus concentrée vers les régions où sa concentration est moins élevée**. Ce mouvement est dû à l'*agitation thermique* des molécules de  $i$ . Dans un compartiment unique, le processus de diffusion conduit à la *distribution uniforme* de  $i$  et par conséquent à l'homogénéisation de sa concentration dans l'espace en question (**Fig. 5**). Dans un compartiment subdivisé par une *partition* qui laisse passer la substance  $i$ , la diffusion conduit dans un intervalle de temps déterminé à une *égalisation des concentrations* de  $i$  de part et d'autre de la partition (**Fig. 6 et Fig. 7**). Les molécules d'un liquide ou d'un gaz se déplacent continuellement, sans direction préférentielle et à très grande vitesse. Par exemple, à la température de notre corps, une molécule d'eau se déplace à 2500 km/h et une molécule de glucose, qui est dix fois plus lourde, à 850 km/h. Malgré cela, ces molécules parcourent d'infimes distances dans une direction donnée, à cause des collisions (plusieurs millions par seconde) avec d'autres molécules et aux changements aléatoires de direction après chaque collision moléculaire (*random walk*). C'est la raison pour laquelle **la diffusion est un processus extrêmement lent lorsqu'il s'agit de franchir des distances au-delà de quelques  $\mu\text{m}$** . En effet, comme il a été démontré par Einstein, le temps de diffusion pour aller d'un point A à un point B est *proportionnel au carré de la distance* qui sépare ces deux points sur une trajectoire rectiligne. Par exemple, une molécule qui prendrait 4 microsecondes pour parcourir 0,1  $\mu\text{m}$ , mettrait 4 secondes pour 0,1mm, environ 46 jours pour 10 cm et environ 12,5 ans pour un mètre. D'autre part ce temps de diffusion est inversement proportionnel à la température absolue, ce qui signifie que la diffusion se fait légèrement plus rapidement à 37°C qu'à 27°C.

*Qu'en est-il maintenant du processus de diffusion en biologie ?*

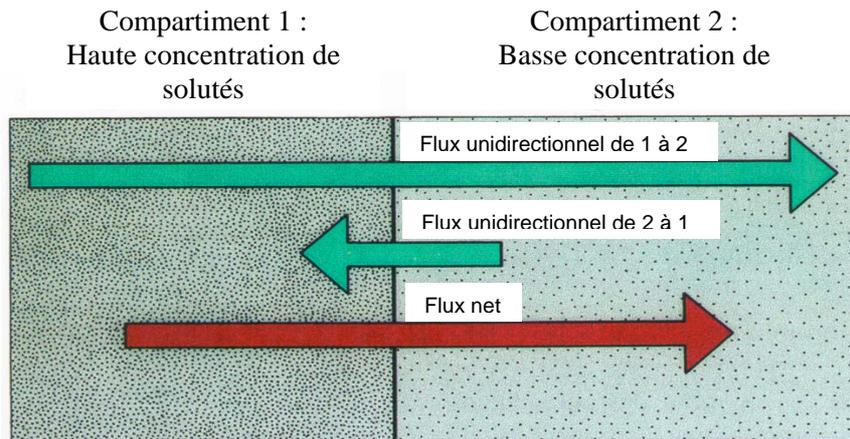
Les principales substances de l'économie de l'organisme, à l'exception notoire des *protéines*, en général peuvent **diffuser** assez facilement à travers la paroi des *capillaires* sanguins. Ceci explique la *similitude* des compositions chimiques du plasma et du liquide interstitiel, car tout gradient de concentration à travers cette barrière a tendance à se dissiper rapidement. La situation est tout autre pour ce qui est des compositions des liquides intra- et extracellulaire qui sont séparés par une bicouche lipidique. *De l'énergie métabolique* peut être dépensée pour *créer et maintenir, à l'aide de pompes ioniques*, des gradients transmembranaires *dynamiques*. Dans ce dernier cas, les pompes transportent contre leur gradient électrochimique des espèces chimiques qui diffusent ensuite à travers des canaux ioniques. *A l'état stationnaire*, le flux actif et le flux passif sont égaux et de sens contraire. C'est en partie ainsi que se constituent les gradients transmembranaires stables de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{K}^+$  et de  $\text{Ca}^{++}$ , par exemple.

Dans des membranes lipidiques *artificielles*, ayant une composition semblable à celle de la membrane plasmique, on observe que des gaz tels que  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  et  $\text{N}_2$  *passent facilement* à travers les lipides membranaires. Passent encore, mais plus difficilement, des *petites* molécules, *non chargées mais polaires*, c.-à-d., des molécules sans charge nette mais ayant des liaisons atomiques qui entraînent un partage asymétrique d'électrons (exemples : l'éthanol). En ce qui concerne l'*eau*, la perméabilité de la bicouche lipidique est *très faible*. Pour beaucoup de substances fort importantes pour l'économie de la cellule et de l'organisme, la perméabilité de la bicouche est virtuellement nulle. C'est le cas : 1) des molécules *non chargées, polaires* et d'une certaine *taille* (ex : glucose) ; 2) des ions inorganiques (ex :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) ; 3) des molécules *polaires chargées* (ex : certains acides aminés, ATP, glucose 6-phosphate).

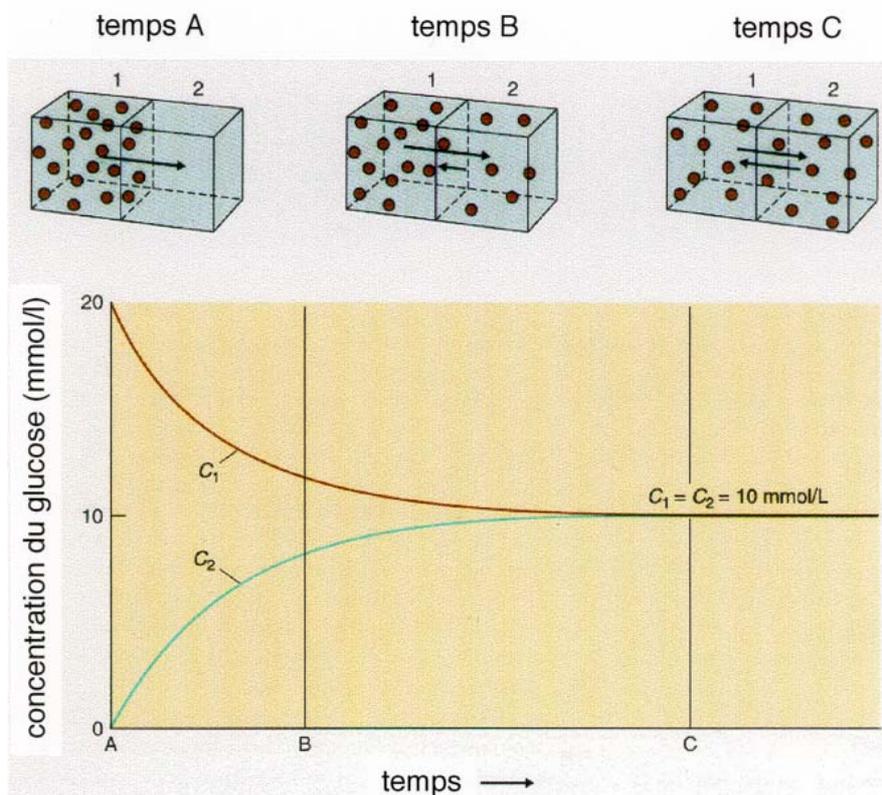
*Quelle est l'expression analytique qui relie le flux diffusionnel net au gradient de concentration transmembranaire ?* Soit une membrane artificielle de surface  $A$  et d'épaisseur  $\Delta x$  ayant des pores aqueux assez larges (**Fig. 8**). La membrane sépare deux compartiments aqueux 1 et 2, contenant des solutions d'une substance  $i$ , non chargée, respectivement aux concentrations  $C_1$  et  $C_2$ , avec  $C_1 > C_2$ . Le flux net  $(J_i)_A$  à travers la membrane dépend du coefficient de diffusion  $D_i$  dans la membrane et des concentrations de  $i$  aux deux extrémités des pores. Du fait que les pores sont assez larges, on admet que  $D_i$  dans la membrane est le même qu'en solution aqueuse et que les concentrations aux extrémités des pores sont égales à celles dans les milieux adjacents. Le flux  $(J_i)_A$  est *directement* proportionnel à  $D_i$ ,  $A$  et  $C_1 - C_2 = \Delta C_i$  ; en revanche, il est *inversement* proportionnel à  $\Delta x$ . Par conséquent:



**Fig. 5** Par diffusion, des solutés distribués de manière inhomogène (à gauche) se redistribuent de manière homogène (à droite)



**Fig. 6** Distinction entre flux unidirectionnels et flux net



**Fig. 7** Equilibration exponentielle des concentrations

$$(\mathbf{J}_i)_A = d\mathbf{n}_i/dt = \mathbf{D}_i A (C_1 - C_2) / \Delta x$$

où  $d\mathbf{n}_i/dt$  indique le nombre de molécules qui traversent la membrane par unité de temps.

Si  $\mathbf{J}_i$  est le *flux net par unité de surface*, on obtient l'expression plus simple

$$\mathbf{J}_i = \mathbf{D}_i \Delta C_i / \Delta x$$

Si l'on imagine que  $\Delta x \rightarrow 0$ , on obtient l'équation correspondant à la diffusion de  $i$  dans un *milieu continu*, sans partition,  $\mathbf{J}_i = \mathbf{D}_i dC_i / dx$ , laquelle est l'expression de la **1ère loi de Fick**. Par ailleurs, la vitesse de diffusion de  $i$  augmente avec la température. Ceci devient évident si l'on tient compte de la relation  $\mathbf{D}_i = \mathbf{u}_i RT$  dérivée par Einstein, où  $\mathbf{u}_i$  est la **mobilité** de  $i$ . Pour une molécule sphérique,  $\mathbf{D}_i$  est *inversement proportionnel* au **rayon**  $r_i$  de la molécule  $i$  et à la **viscosité**  $\eta$  du milieu de diffusion. Tout ceci est incorporé dans l'expression générale :

$$\mathbf{D}_i = (RT/N) (1/6\pi\eta r_i)$$

où  $6\pi\eta r_i$  est la force de frottement visqueux, ou force de Stokes, et  $N$  est le nombre d'Avogadro.

Soit maintenant une membrane lipidique pure, constituée de phospholipides identiques à ceux de la membrane plasmique (*Fig. 8b*). Le flux net  $\mathbf{J}_i$  dépend maintenant du coefficient  $\mathbf{D}_i^m$  *dans la membrane* et des concentrations  $C_1^m$  et  $C_2^m$  aux deux surfaces de la membrane, lesquelles sont différentes de  $C_1$  et  $C_2$ . On peut calculer  $C_1^m$  et  $C_2^m$  si l'on fait appel au coefficient  $\mathbf{K}_i$ , ou **coefficient de partition** de  $i$ . Voyons de quoi il s'agit.

Pour que la substance  $i$  traverse cette membrane, il faut qu'elle *puisse se dissoudre* dans les lipides de celle-ci, un phénomène qui dépend de la liposolubilité de  $i$ . Cette dernière propriété peut être caractérisée à l'aide du coefficient  $\mathbf{K}_i$ , lequel n'est autre que la *constante d'équilibre* des concentrations de  $i$  dans un système *huile/eau*. Avec une très bonne approximation, la même valeur de  $\mathbf{K}_i$  est aussi valable pour un système *lipides membranaires/eau*. Autrement dit, si  $C^{aq}$  est la concentration d'une substance  $i$  dans un milieu aqueux, sa concentration dans la membrane sera  $C^m$ , avec  $\mathbf{K} = C^m/C^{aq}$ . Le flux net de  $\mathbf{J}_i$  à travers la membrane lipidique est donc donné par l'équation

$$\mathbf{J}_i = d\mathbf{n}_i / dt = (\mathbf{D}_i^m / \Delta x) (C_1^m - C_2^m)$$

Du fait que  $C_1^m = \mathbf{K}_i C_1$  et  $C_2^m = \mathbf{K}_i C_2$ , alors  $C_1^m - C_2^m = \mathbf{K}_i (C_1 - C_2)$  et l'on obtient

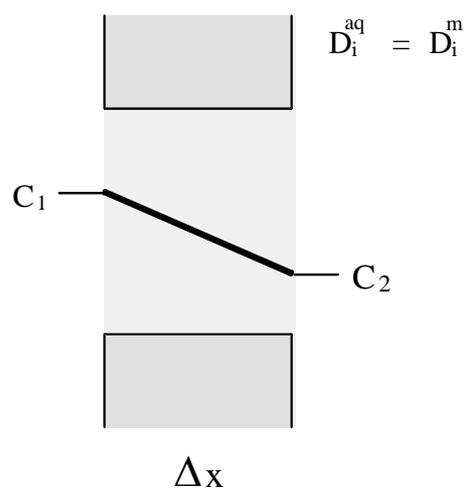
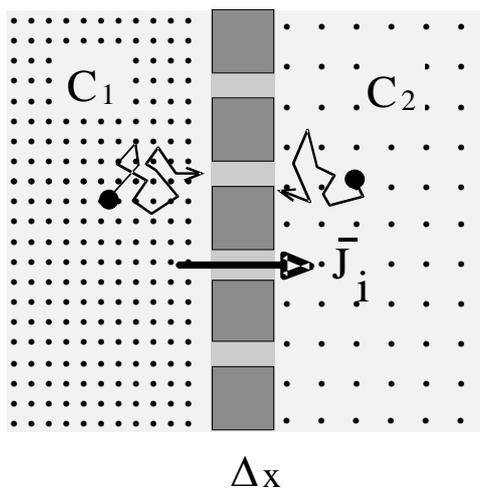
$$\mathbf{J}_i = (\mathbf{D}_i^m \mathbf{K}_i / \Delta x) \Delta C_i$$

L'expression  $\mathbf{D}_i^m \mathbf{K}_i / \Delta x$  définit un paramètre fort important dans le transport membranaire: il s'agit de  $\mathbf{P}_i$ , le **coefficient de perméabilité**, lequel dépend des propriétés de la substance  $i$  et de la membrane. Lorsqu'on examine la perméabilité d'une même membrane à une série de molécules, on observe une corrélation étroite entre  $\mathbf{P}_i$  et  $\mathbf{K}_i$  (*Fig. 9*). Par ailleurs, si l'on applique à  $\mathbf{D}_i^m$  l'expression générale dérivée pour  $\mathbf{D}_i$ , on constate aisément que, pour une membrane biologique,  $\mathbf{P}_i$  *augmente* lorsque  $T$  ou  $\mathbf{K}_i$  *augmentent* et *diminue* lorsque,  $\eta$ ,  $r_i$  et  $\Delta x$  *augmentent*. Finalement, si l'on introduit  $\mathbf{P}_i$  dans l'équation précédemment dérivée pour  $\mathbf{J}_i$ , on arrive à l'expression très simple

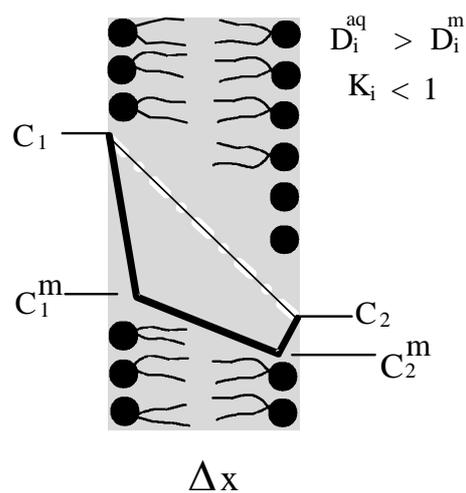
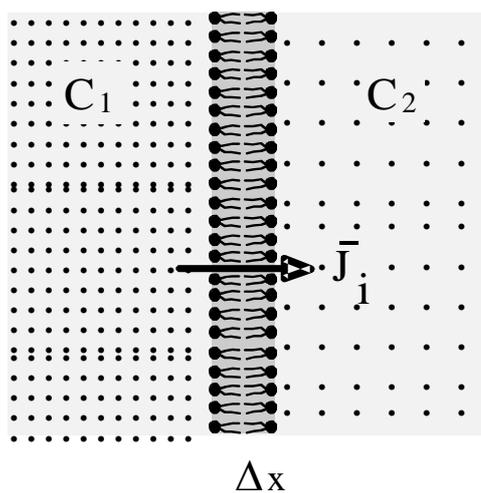
$$\mathbf{J}_i = \mathbf{P}_i \Delta C_i$$

une équation linéaire en tout point analogue à la *loi d'Ohm*. En effet, si l'on remplace  $J_i$  par  $I$ ,  $\mathbf{P}_i$  par  $1/R$  et  $\Delta C_i$  par  $V$ , on aboutit à la fameuse relation entre courant électrique et tension  $\mathbf{I} = (1/R)\mathbf{V}$ . A titre d'exercice, expliquez pourquoi la montée de  $C_2$  est curvilinéaire dans les *Fig. 8c*. Cette figure montre la variation, en fonction du temps, de la concentration  $C_2$  d'une substance  $i$  à l'intérieur de cellules placées

A



B



C

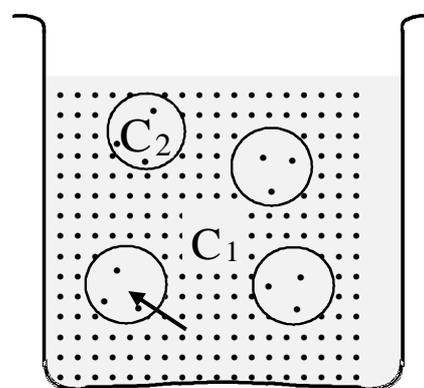
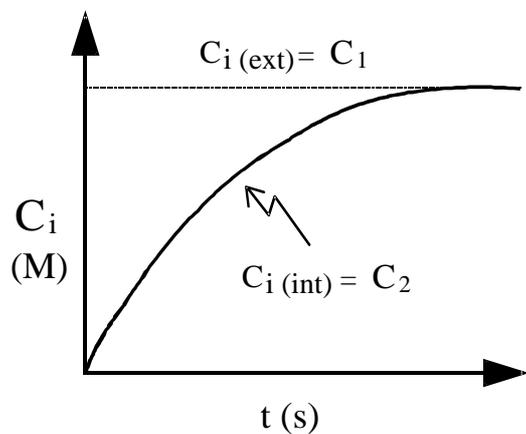


Fig. 8 Diffusion

dans un milieu où  $i$  est à la concentration  $C_1$ . Par hypothèse,  $C_1$  reste constante car la quantité de  $i$  qui diffuse vers les cellules est supposée négligeable par rapport à la quantité totale de  $i$  dans le milieu d'incubation. A l'équilibre,  $J_i = 0$  mais l'agitation thermique fait en sorte que  $i$  traverse toujours la membrane : *les flux unidirectionnels sont devenus égaux (Fig. 8c)*.

### Electrodiffusion

Les membranes lipidiques artificielles sont presque étanches aux ions inorganiques tels que le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$ . Cependant, ces mêmes ions peuvent traverser assez facilement les membranes biologiques, ce qui suggère l'existence de voies membranaires autres que les lipides pour le transport ionique. Ces voies sont multiples et de plusieurs types: canaux, pompes, symports et antiports (**Fig. 9**). Nous analyserons ici la voie qui concerne les **canaux ioniques**. On trouve de tels canaux dans toutes les cellules mais les mieux étudiés sont ceux des *cellules excitables*, soit nerveuses soit musculaires. Les canaux ioniques sont des structures protéiques qui traversent toute l'épaisseur de la membrane plasmique. Certains ont une sélectivité ionique très grande. On a identifié à ce jour des canaux spécifiques pour le transport du  $\text{Na}^+$ , du  $\text{K}^+$ , du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Cl}^-$ , ceci grâce aux techniques de la biologie moléculaire et du « patch-clamp ». Cette dernière technique permet des études électrophysiologiques extrêmement précises des canaux ioniques membranaires, parfois d'un seul canal situé dans un fragment de membrane (« patch »). Développé par les chercheurs allemands E. Neher et B. Sakmann, le patch-clamp leur a valu le prix Nobel de physiologie en 1990.

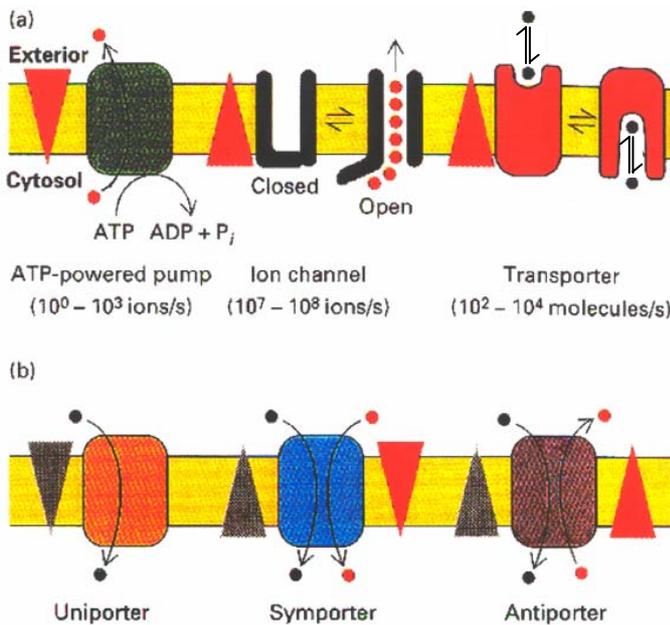
Une des caractéristiques singulières des canaux ioniques est leur *taux de transport très élevé* ( $10^6$  à  $10^8$  ions par seconde), ce qui va de pair avec un nombre relativement modeste de canaux par cellule. Par exemple, le corps cellulaire d'un neurone typique contient environ 1000 canaux à  $\text{Na}^+$  et une cellule épithéliale est pourvue de quelque 100 à 1000 canaux à  $\text{Na}^+$  ou à  $\text{Cl}^-$ . En revanche, une cellule contient  $10^5$  à  $10^7$  pompes à  $\text{Na}^+$ , mais leur taux de transport n'est que de 60 à 100 ions  $\text{Na}^+$  par seconde. Un canal ionique n'est pas constamment ouvert, mais s'ouvre et se ferme spontanément. Le temps moyen d'ouverture est contrôlé par différents facteurs physiques et biologiques. On relève, par exemple: le voltage transmembranaire, le calcium intracellulaire ionisé, et l'effet de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, le glutamate, la dopamine et la noradrénaline.

Le transport par des canaux ioniques est un **transport passif par diffusion (Fig. 10)**, déterminé par la **différence de potentiel électrochimique** transmembranaire. On y distingue deux termes : 1) la *différence de concentration* transmembranaire  $\Delta C_i$  d'un ion  $i$  ; 2) la *différence de potentiel électrique*  $\Delta \Psi$ . C'est pourquoi on parle d'**électrodiffusion**. La diffusion d'une espèce ionique est par conséquent un processus de transport un peu plus complexe que celui d'une espèce chimique non chargée.

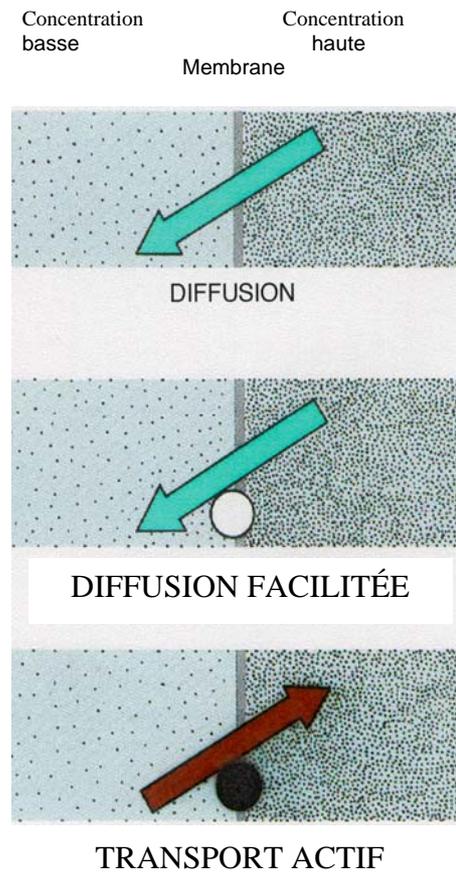
La diffusion d'un électrolyte à travers une membrane peut donner lieu à un phénomène nouveau : l'apparition d'une différence de potentiel électrique transmembranaire  $V_{\text{diff}}$ , appelée **potentiel de diffusion**. Pour comprendre sa genèse, revenons un instant à la diffusion de molécules non chargées. Dans une solution contenant plusieurs substances *non chargées*, la diffusion de chacune d'entre elles est indépendante de la diffusion des autres substances. Imaginons par exemple qu'au temps  $t_0$  nous ayons mis dans le compartiment 1 de la **Fig 8a** du glucose (0,2 M) et de l'urée (0,2 M), tandis que le compartiment 2 contienne de l'eau distillée seulement. Imaginons aussi que nous empêchions des mouvements d'eau à travers la membrane à large pores<sup>§</sup> en exerçant une pression adéquate sur le liquide dans le compartiment 1. La diffusion simultanée de glucose et d'urée à travers cette membrane à larges pores aboutira au temps  $t_0 + \Delta t$  à des concentrations différentes des deux solutés dans le compartiment 2, avec  $C_2^{\text{urée}} > C_2^{\text{glucose}}$  du fait que  $D_{\text{urée}} > D_{\text{glucose}}$ . De même, si l'on choisit une autre membrane ayant des pores de diamètre plus petit qui ne laissent pas passer le glucose, on constatera au temps  $t_0 + \Delta t$  que la diffusion de l'urée reste inchangée. La situation est assez différente lorsqu'il s'agit de la diffusion d'espèces ioniques résultant de la dissociation d'un électrolyte. Cela nous amène à la discussion des notions de **dipôle** et de **potentiel de diffusion** ainsi que du principe d'**électroneutralité des solutions**.

Supposons que de part et d'autre d'une membrane à large pores nous ayons placé des solutions d'acétate de potassium de concentration différente, et que l'on empêche la diffusion de ce sel en plaçant une partition imperméable amovible d'un côté de la membrane (**Fig. 11a**). Les ions  $\text{K}^+$  et acétate<sup>-</sup> ont des **mobilités** très différentes de par leurs tailles respectives et par conséquent leurs coefficients de diffusion sont aussi très différentes, avec  $D_{\text{K}^+} > D_{\text{acétate}^-}$ . La différence de mobilité aurait tendance à séparer les ions

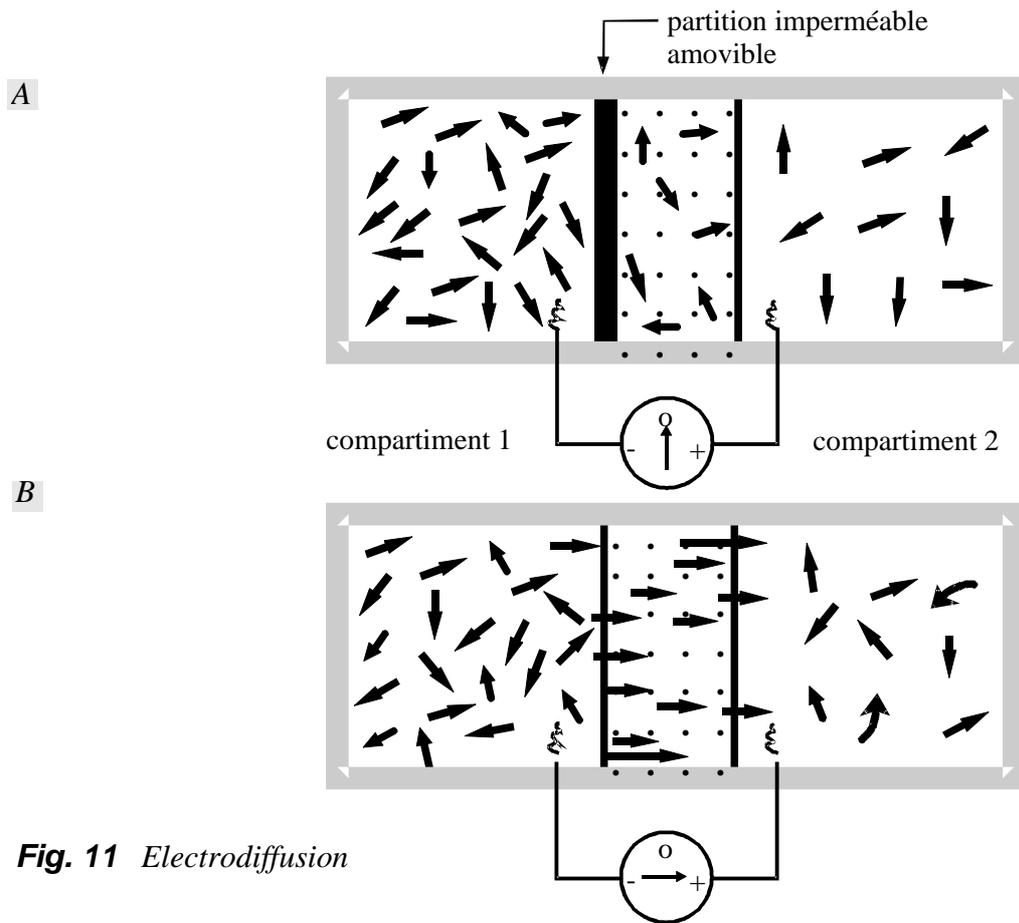
$K^+$  et acétate $^-$ , mais ceci est contrecarré par la force électrostatique attirant l'un vers l'autre. Il se forme ainsi des **dipôles**, ou **paires ioniques**, représentés dans la figure par des flèches dont la tête correspond à l'ion de mobilité plus grande, en l'occurrence le  $K^+$ . Ces dipôles n'ont pas d'orientation préférentielle et un voltmètre ne mesurerait aucune différence de potentiel électrique dans ces conditions (**Fig 11a**). La situation change complètement quand on enlève la partition imperméable : l'acétate de  $K^+$  tend à diffuser du compartiment 1 vers le compartiment 2, les dipôles prennent alors une orientation préférentielle à l'intérieur de la membrane. Dans ces conditions on mesure une différence de potentiel électrique,  $V_{diff}$ , à travers la membrane (**Fig. 11b**). Au temps  $t_0 + \Delta t$ , on observe que la concentration de la solution d'acétate de  $K^+$  dans le compartiment 2 a augmenté d'une valeur  $\Delta c$ , ce qui veut dire que les deux ions n'ont pas diffusé de façon indépendante mais sous forme de dipôles dont le coefficient de diffusion,  $D_{dipôle}$ , a une valeur intermédiaire entre  $D_{K^+}$  et  $D_{acétate^-}$ . L'égalité des concentrations de  $K^+$  et de acétate $^-$  dans le compartiment 2 contraste avec les valeurs différentes de  $C_2^{urée}$  et  $C_2^{glucose}$  de l'exemple précédent. Imaginons maintenant que l'on remplace la membrane de la **Fig. 11** par une autre qui empêche le passage de l'ion acétate $^-$ : dans ces conditions, on constate qu'au temps  $t_0 + \Delta t$  la concentration d'acétate de  $K^+$  **demeure inchangée** dans le compartiment 2. Autrement dit, malgré la grande mobilité de l'ion  $K^+$ , ce dernier **ne peut pas diffuser tout seul** si la membrane empêche le passage de l'ion acétate $^-$ , car cela violerait un principe fondamental des solutions électrolytiques : *dans n'importe quelle région macroscopique d'une solution, il doit y avoir autant de charges positives que de charges négatives (principe de l'électroneutralité des solutions)*.



**Fig. 9** Pompes, canaux ioniques et transporteurs



**Fig. 10** Transport passif, facilité et actif



**Fig. 11** Electrodiffusion

Eu égard aux concentrations de KCl de part et d'autre de la membrane, il devrait y avoir un flux  $J_{K^+}$  ( $1 \rightarrow 2$ ) mais, du fait que seul l'ion  $K^+$  peut diffuser, il se crée aussitôt une différence de potentiel  $\Delta\Psi$  qui détermine un flux de  $J_{K^+}$  ( $2 \rightarrow 1$ ) égal mais de sens opposé. Par conséquent, après un déplacement **microscopique** de charges ioniques, on arrive presque instantanément à une situation d'équilibre et dans ces conditions  $\Delta\tilde{\mu}_{K^+} = 0$ . On dérive ainsi l'équation de Nernst (**Fig. 12**) selon deux hypothèses à *retenir* : 1) Membrane perméable pour le potassium ; et 2) Equilibre entre forces électriques et forces de diffusion. Le calcul pour l'exemple donné vérifie bien que le potentiel d'équilibre  $E_{K^+}$  est de  $-58$  mV.

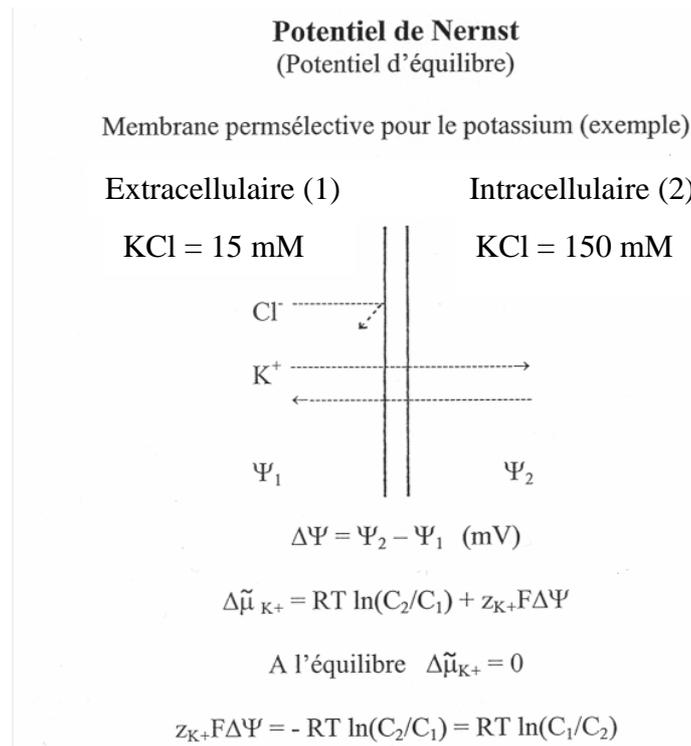
L'expression générale du potentiel de diffusion,  $V_{diff}$ , dû à la diffusion à travers une membrane d'un électrolyte qui se dissocie en un cation et un anion *monovalents*, est donné par l'équation :

$$V_{diff} = V_2 - V_1 = \left[ \frac{D_+ - D_-}{D_+ + D_-} \right] \left[ 2,3 \frac{RT}{zF} \right] \left[ \log \frac{C_1}{C_2} \right]$$

où  $D_+$  et  $D_-$  sont respectivement les coefficients de diffusion du cation et de l'anion. cette équation se simplifie si l'on examine les trois situations typiques suivantes :

- a)  $V_{diff} = 0$  si  $C_1 = C_2$ .  $V_{diff} = 0$  en l'absence d'un gradient de concentration.
- b)  $V_{diff} = 0$  si  $C_1 \neq C_2$  mais  $D_+ = D_-$ .  $V_{diff}$  est nul si l'anion et le cation ont la même mobilité.
- c)  $V_{diff} = E_i$  si  $C_1 \neq C_2$  et  $D_+ = 0$  ou  $D_- = 0$ .

Pour un rapport de concentrations donné,  $V_{diff}$  est **maximal** si  $D_+ = 0$  ou  $D_- = 0$ . Cette situation correspond au **potentiel d'équilibre** ou **potentiel de Nernst**  $E_i$ . Par conséquent, pour un même gradient de concentration,  $V_{diff}$  sera *élevé* si la différence  $D_{cation} - D_{anion}$  est grande (c'est le cas de l'acétate de  $K^+$ ) et *faible* si la différence est petite (c'est le cas du KCl).  $V_{diff}$  sera *nul* si  $D_{cation} = D_{anion}$ . En revanche, même pour des ions de grande mobilité en solution aqueuse (ex : KCl)  $V_{diff}$  sera **maximal** si la membrane est



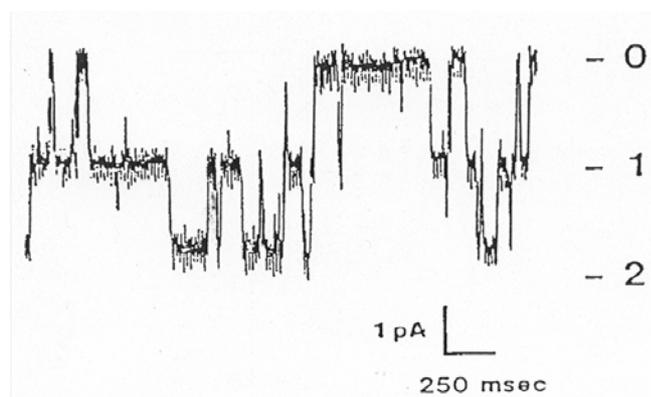
$$\Psi_2 - \Psi_1 = - (RT/z_{K^+}F) \ln (C_2/C_1) = E_{K^+} = \text{potentiel d'équilibre}$$

Si  $t = 20^\circ\text{C}$   $T = 293 \text{ }^\circ\text{K}$  et  $\ln(C_2/C_1) = 2,3 \log(C_2/C_1)$  et  $z_{K^+} = +1$

$$E_{K^+} = -2,3(RT/ z_{K^+}F) \log(150/15) = -58 \text{ mV}$$

A l'équilibre:  $V_m = E_{K^+} = -58 \text{ mV}$

**Fig. 12** Dérivation de l'équation de NERNST et exemple d'application



**Fig. 13** Activité de 2 canaux amiloride-sensibles dans un fragment (patch) de membrane plasmique

**permsélective.** Dans ce dernier cas, la valeur de  $V_{diff}$  devient indépendante de  $D_{cation}$  et de  $D_{anion}$ , pour ne dépendre que du rapport des concentrations  $C_1/C_2$ .

Pour une cellule située dans un tissu, le potentiel membranaire  $V_m$  n'est pas nécessairement égal à  $E_K^+$ , car les conductances pour d'autres ions tels que le sodium ou le calcium influent également sur  $V_m$ ; d'autre part, dans certains tissus tels que le muscle cardiaque, des cellules proches peuvent générer des courants qui, en traversant des jonctions intercellulaires (gap junctions), changent  $V_m$ . La force qui fera diffuser le ion potassium sera alors égale à  $(V_m - E_K^+)$ . Cela nous amène à l'équation de diffusion d'une espèce ionique à travers les canaux d'une membrane. On peut exprimer la différence de concentration de  $i$  par son équivalent électrique  $E_i$ , ce qui permet d'utiliser l'expression  $(V_m - E_i)$  pour définir la **force nette** agissant sur  $i$ . Etant donné que  $I_i = z_i F J_i$  on obtient, pour une membrane de conductance  $g_i$ , l'équation

$$z_i F J_i = I_i = g_i (V_m - E_i)$$

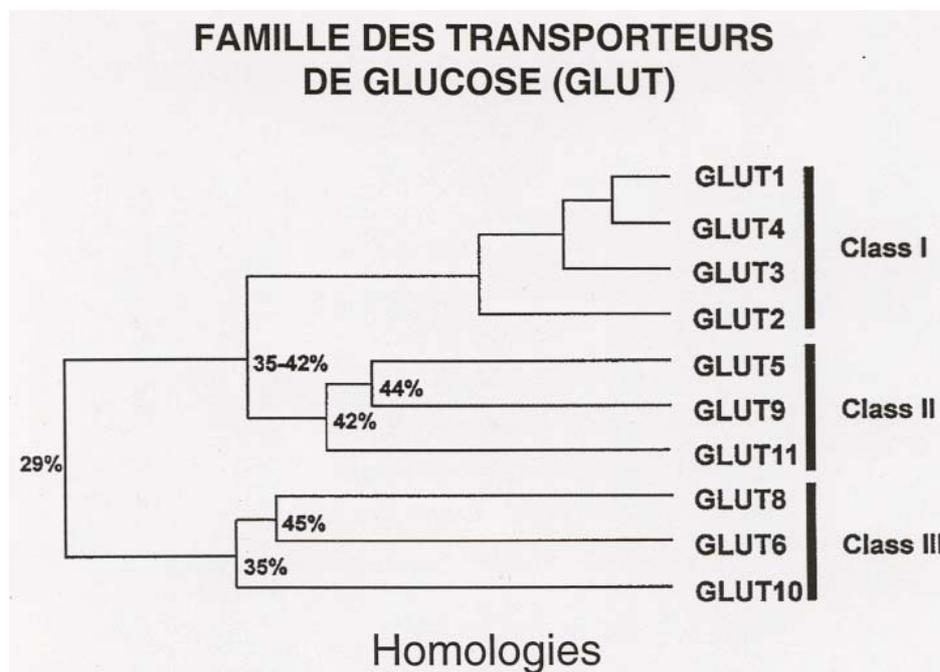
laquelle est une variante de la loi d'Ohm. En outre, par rapport à la loi de Fick, on remarquera dans l'équation d'électrodifusion que  $g_i / z_i F$  correspond à  $P_i$  et  $(V_m - E_i)$  correspond à  $\Delta C_i$ .

L'électrophysiologie des canaux ioniques est un domaine privilégié de la physiologie des **cellules excitables** (cellules nerveuses et musculaires), mais également de cellules non excitables telles que les cellules épithéliales. Dans les deux types on a identifiés des mutations génétiques de canaux ioniques qui peuvent amener à des maladies, appelées *canalopathies*. Mentionnons en passant deux grands groupes de canaux de cellules excitables : (i) les *canaux sensibles au voltage* (canaux  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ) ; (ii) les *récepteurs-canaux* dont le fonctionnement est modifié par la fixation de ligands tels que des neurotransmetteurs (acétylcholine, glutamate, glycine, GABA et sérotonine). D'autres canaux encore sont sensibles au calcium intracellulaire  $[Ca^{++}]_i$ , à des protéines G ou à des déformations mécaniques (étirement) de la membrane plasmique. En ce qui concerne les cellules non excitables, la liste des canaux ioniques caractérisés et même clonés s'allonge chaque mois. Une variété de phénomènes et de fonctions physiologiques sont associés à ces canaux. En voici quelques exemples :

- *Canaux sodiques amilorido-sensibles (ENaC)*. L'activité électrique de 2 canaux unitaires situés dans un « patch » de cellule épithéliale est représenté dans la **Fig. 13**, montrant l'ouverture et la fermeture sporadique de 1 canal ou 2 canaux à la fois. Les ENaC sont exprimés dans plusieurs épithéliums (tubes collecteurs du rein, côlon distal, glandes salivaires et sudoripares, poumon). Ils sont impliqués entre autres dans la réabsorption de  $Na^+$  par le rein et le gros intestin. Certaines mutations de l'ENaC rénal conduisent à une forme génétique d'hypertension artérielle, le *syndrome de Liddle*. Certains de ces canaux sont activés par l'aldostérone et la vasopressine.
- *Canaux calciques*. Présents dans les réservoirs de  $Ca^{2+}$  de la cellule (réticulum endoplasmique) et dans la membrane plasmique. Rôle déterminant dans le couplage stimulus-effet biologique.
- *Canaux  $H^+$* . La protéine constitutive appelée P32, protéine découplante, thermogénine ou UCP1, est localisée dans les mitochondries des cellules du tissu adipeux brun, où elle permet une production de chaleur sans synthèse d'ATP grâce à la dissipation d'un gradient de protons. Plus récemment deux autres protéines homologues (UCP2 et UCP3) ont été identifiées dans d'autres cellules, notamment dans les mitochondries du muscle squelettique.
- *Canaux  $K^+$  sensibles à la  $P_{O_2}$* . Présents dans les cellules chémoréceptrices des gloméra carotidiens. Déclenchent la réponse hyperventilatoire lors d'un stimulus hypoxique (*cf* système respiratoire).

Signalons pour terminer que certains auteurs utilisent le terme de **diffusion restreinte** (par opposition à diffusion libre) pour désigner le type de transport qui a lieu à l'intérieur de pores ou de canaux.

<b>Tableau 3</b>		
La distribution des transporteurs de glucose (GLUT) dans les tissus et leurs fonctions		
<i>Isoforme</i>	<i>Distribution</i>	<i>Fonction de transport</i>
GLUT-1	générale	glucose (constitutif)
GLUT-2	rein et intestin	glucose (basse affinité)
	foie	relâchement de glucose
	pancréas	senseur glucose (cell. $\beta$ )
GLUT-3	neurons, placenta	glucose (haute affinité)
GLUT-4	muscle, cœur, graisse	glucose (induit par l'insuline)
GLUT-5	générale	fructose
GLUT-6		pas connue (pseudogène)
GLUT-7	foie	gluconéogenèse
GLUT-8	testicules	
GLUT-9	rate, foie, leukocytes	
GLUT-10	foie, pancréas	
GLUT-11	cœur, muscle, rein	glucose, fructose



**Fig. 14** La famille des GLUT et les homologies (en %) entre les membres et entre les classes

### Diffusion facilitée

Le passage de beaucoup de solutés organiques à travers les membranes plasmiques ne s'explique guère par un processus de *diffusion libre* à travers la bicouche lipidique. L'intervention de protéines de transport - les **uniports** - a été postulée et, de nos jours, un certain nombre de ces protéines ont été identifiées et clonées. C'est le cas par exemple des transporteurs du glucose, dont les multiples isoformes constituent la série connue par l'abréviation GLUTs, pour *Glucose Transporter(s)*. La fonction de la famille des GLUTs est représentée dans le **Tableau 3**, et leur « cousinage » dans la **Fig. 14**. Retenez seulement le GLUT-1 (d'expression générale et constitutive), et le GLUT-4 qui est activé par l'insuline.

On appelle **diffusion facilitée** le type de diffusion où le passage transmembranaire d'une molécule organique se fait grâce à sa liaison réversible avec une protéine membranaire de la catégorie **uniport** (**Fig. 9**). De même que pour la *diffusion libre*, le déplacement du soluté se fait **dans le sens** du gradient de concentration chimique. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme du transport facilité, le postulat principal étant celui d'un *changement de configuration de l'uniport* suite à l'occupation par le soluté d'un site de liaison spécifique dans la protéine. Dans le cas de l'entrée du glucose dans les cellules, ce site est initialement exposé au milieu extracellulaire mais se trouve ensuite exposé au milieu intracellulaire à cause du changement de configuration de la protéine; lorsque le glucose est lâché à l'intérieur de la cellule, cela provoque à son tour le retour à la configuration initiale et un nouveau cycle de transport peut recommencer.

Un point important concernant le transport facilité est sa *cinétique*. L'exemple de la **Fig. 15** illustre le transport de glucose du milieu extracellulaire vers l'intérieur du globule rouge. On constate que la contribution de la diffusion libre (ou simple) de glucose est extrêmement faible,  $J_{\text{glucose}}$  augmentant très peu en fonction de  $C_{\text{glucose}}$  à l'extérieur. En revanche, le flux de glucose par diffusion facilitée augmente rapidement et de façon curvilinéaire en fonction de  $C_{\text{glucose}}$  externe pour atteindre un maximum aux concentrations élevées.  $(J_{\text{glucose}})_{\text{max}}$  correspond à la **saturation** des transporteurs, lorsqu'ils sont tous occupés par des molécules de glucose; sa valeur absolue dépend donc du *nombre d'uniports* dans la membrane. Un autre point d'intérêt est la concentration de glucose désignée par  $K_m$ : elle correspond à la valeur de  $C_{\text{glucose}}$  dans le milieu externe pour laquelle  $J_{\text{glucose}}$  est égal à la moitié de  $(J_{\text{glucose}})_{\text{max}}$ . La réciproque de  $(K_m)_{\text{glucose}}$  est une mesure de l'**affinité** du glucose pour son site de liaison dans la molécule de l'uniport : **plus bas est  $K_m$  plus grande est l'affinité**. De façon générale, le flux  $J_i$  d'une substance  $i$  transportée par diffusion facilitée est une fonction de sa concentration  $C_i$  dans le milieu à partir duquel  $i$  diffuse, fonction exprimée par l'équation

$$J_i = \frac{(J_i)_{\text{max}}}{1 + K_m / C_i} = \frac{(J_i)_{\text{max}} C_i}{C_i + K_m}$$

laquelle correspond à une cinétique dite de **type Michaelis-Menten**. On voit aisément que  $K_m$  est en effet la concentration de  $i$  pour laquelle  $(J_i) = (J_i)_{\text{max}}/2$ .

Les uniports ont une grande *spécificité moléculaire*. Par exemple, les protéines de la série des GLUTs ne transportent pas des acides aminés, de même que les uniports des acides aminés ne transportent pas du glucose. Plus frappante encore est la **stéréospécificité** des uniports. Ainsi, l'uniport GLUT1 du globule rouge a une *haute affinité* pour le **D-glucose** ( $K_m = 1,5 \text{ mM}$ ) et une *très faible affinité* pour son isomère optique, le **L-glucose** ( $K_m > 3000 \text{ mM}$ ). A l'opposé, les uniports des acides aminés ont une *haute affinité* pour l'isomère **L** et une *très faible affinité* pour l'isomère **D**.

La **Fig. 16a** et **b** permet de comparer deux aspects importants de la cinétique des processus de diffusion libre et de diffusion facilitée : 1) la variation de la concentration intracellulaire  $[C_i]_{\text{int}}$  d'une substance  $i$  en fonction du *temps* ainsi que le rapport  $[C_i]_{\text{int}} / [C_i]_{\text{ext}}$ , lorsque  $[C_i]_{\text{ext}}$  est supposée fixe ; 2) la variation de  $J_i$  en fonction de  $[C_i]_{\text{ext}}$ . Dans les deux processus,  $[C_i]_{\text{int}}$  augmente de façon **curvilinéaire** jusqu'à l'égalisation de  $[C_i]_{\text{int}}$  et  $[C_i]_{\text{ext}}$  après un intervalle de temps donné. Ce temps pour atteindre l'équilibre est bien plus rapide pour le transport facilité. Pour ce qui est de  $J_i$ , le flux augmente **linéairement** en fonction de  $[C_i]_{\text{ext}}$  dans la *diffusion libre* ; en revanche, le flux augmente **curvilinéairement** et atteint un maximum  $(J_i)_{\text{max}}$  pour des valeurs de  $[C_i]_{\text{ext}}$  élevées, dans la *diffusion facilitée*. Autrement dit, ce dernier type de diffusion est caractérisé par une **saturation** liée au *nombre d'uniports* disponibles pour le transport de  $i$ , tandis qu'il n'y a pas de saturation dans la diffusion libre.

A part les GLUT, plusieurs uniports qui transportent des *acides aminés* ou des *nucléosides* ont été identifiés, mais leur nomenclature est par trop complexe et nous n'insisterons pas sur ce point. Plusieurs uniports pour le transport d'*urée* (UT) ont été clonés, dont l'un est présent dans le globule rouge et quatre autres sont exprimés dans le rein. UT1, qui se trouve dans la partie terminale du tube collecteur du rein, est *sensible à la vasopressine* et participe au mécanisme de concentration de l'urine.

### Transport principalement actif

**Le transport principalement actif est celui directement couplé au métabolisme.** En général, le sens du flux net de la substance transportée activement est contraire à celui de son gradient chimique ou électrochimique, toutefois, conceptuellement, ceci n'est pas une exigence absolue. L'apport d'énergie est fourni souvent, mais pas exclusivement, par l'activité d'une ATPase. Les protéines impliquées dans le transport principalement actif sont des macromolécules complexes, constituées de sous-unités parfois nombreuses, qui sont connues du point de vue biochimique. Cet aspect est traité dans d'autres cours. Analysons surtout les aspects biophysiques et fonctionnels du transport actif.

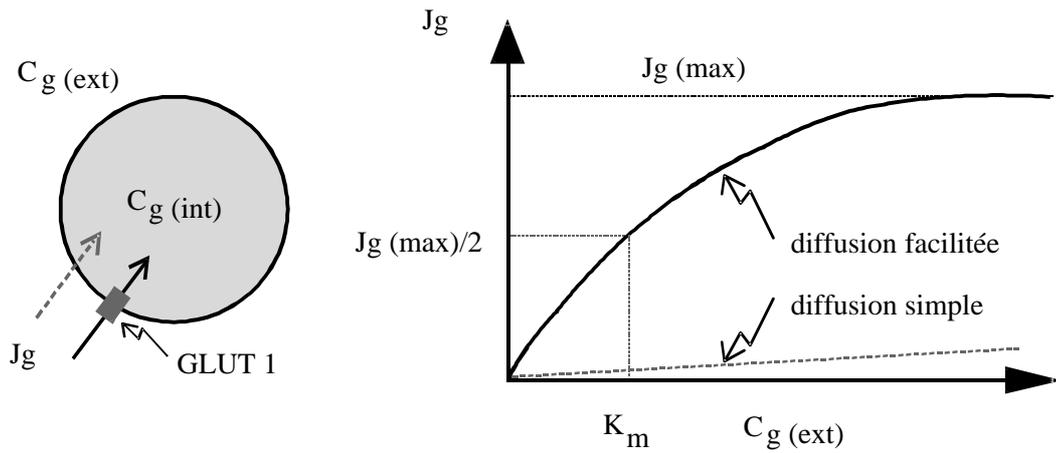
Les protéines du transport actif sont connues sous la désignation générale **de pompes membranaires**. On pense surtout aux *pompes ioniques*, mais il y en a d'autres types. Dans ce chapitre nous focaliserons notre attention sur les pompes ioniques. Sous la désignation « Autres pompes » nous passerons brièvement en revue d'autres exemples de transport actif, en particulier celui effectué par les **pompes ABC** (ATP-Binding Cassette) et par les **pompes photosensibles** (light-driven pumps).

### Pompes ioniques

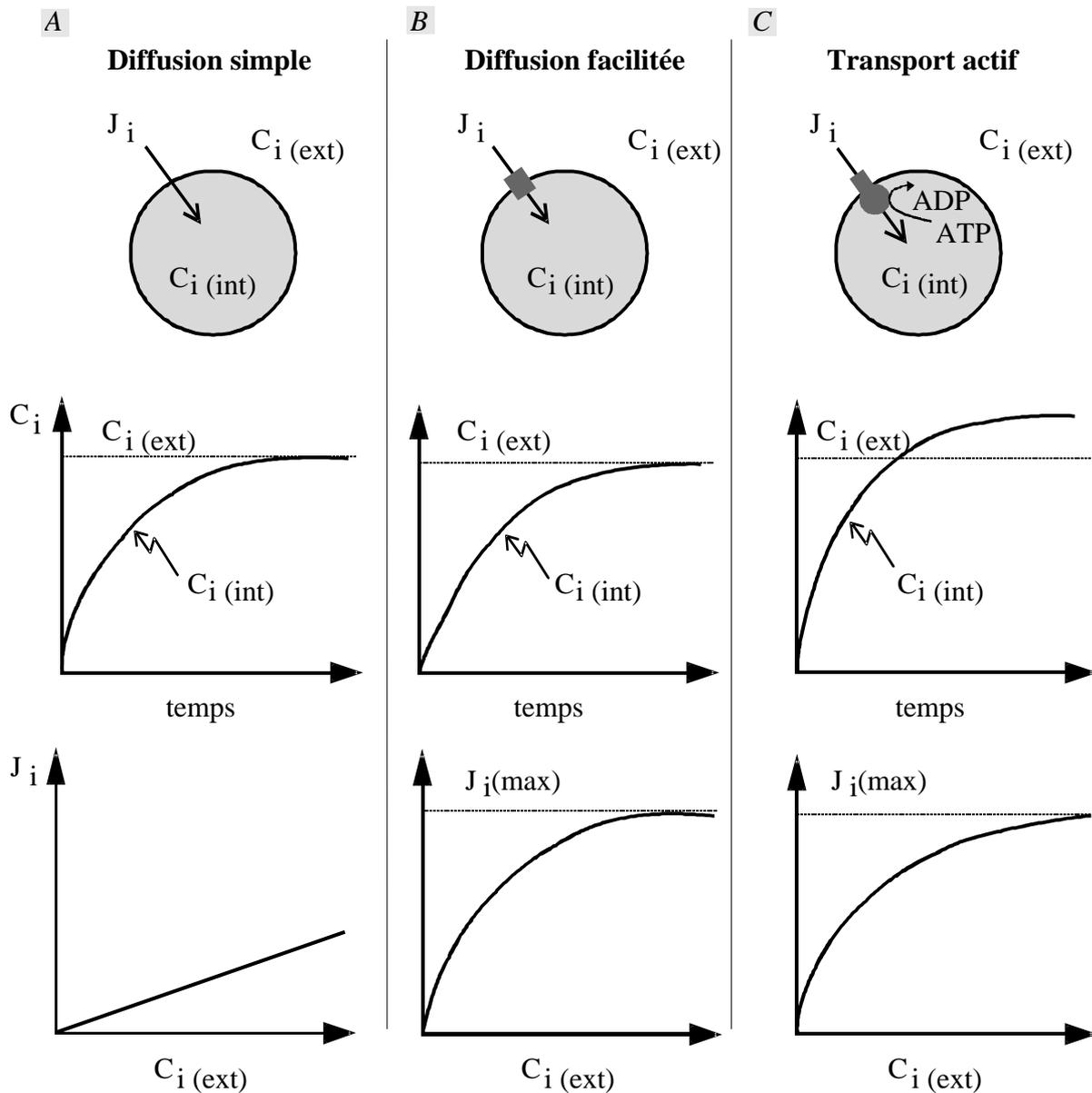
A l'intérieur de ce groupe, on distingue trois sous-groupes (**Fig 17a**) : les pompes de type **P** (phosphorylé), de type **F** ( $F_0F_1$ ) et de type **V** (vacuolaire).

**Pompes de type P.** Aussi appelées pompes de type  $E_1E_2$ , il s'agit d'ATPases caractérisées par la présence d'intermédiaires **phosphorylés** pendant le cycle du transport ionique. Appartiennent à ce sous-groupe : 1) la  $Na^+/K^+$ -ATPase ou pompe à sodium (**Fig. 18**); 2) la  $Ca^{++}$ -ATPase ou pompe à calcium (**Fig. 19**); et 3) la  $H^+/K^+$ -ATPase ou pompe à protons de l'estomac. Le *vanadate* est un inhibiteur commun à ces trois ATPases.

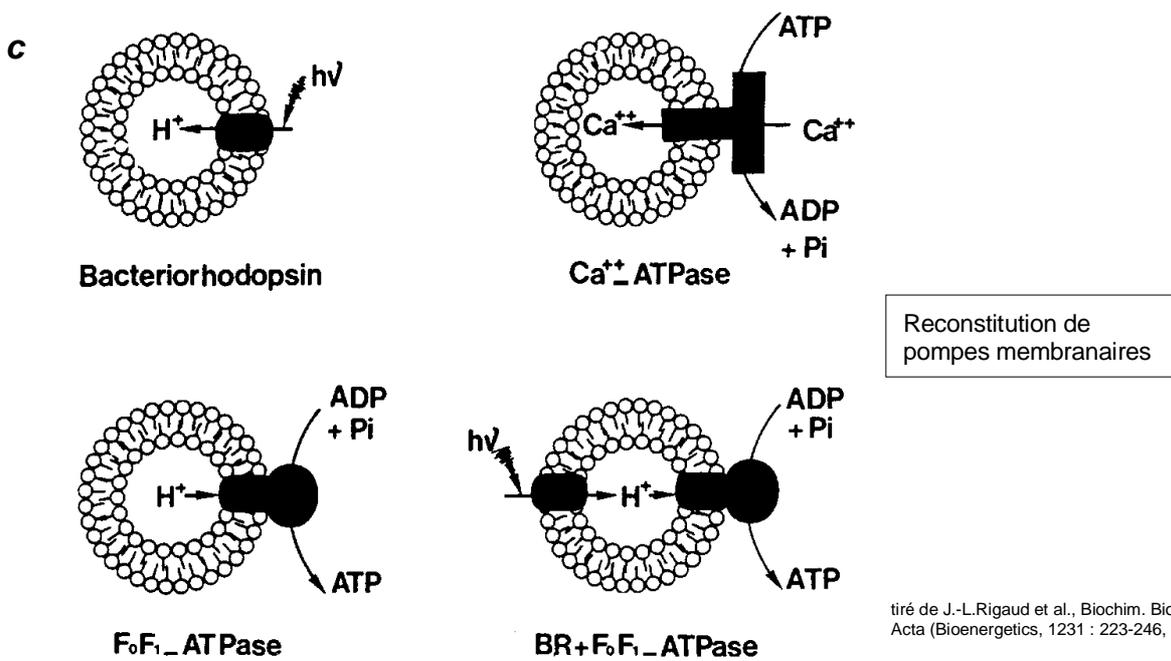
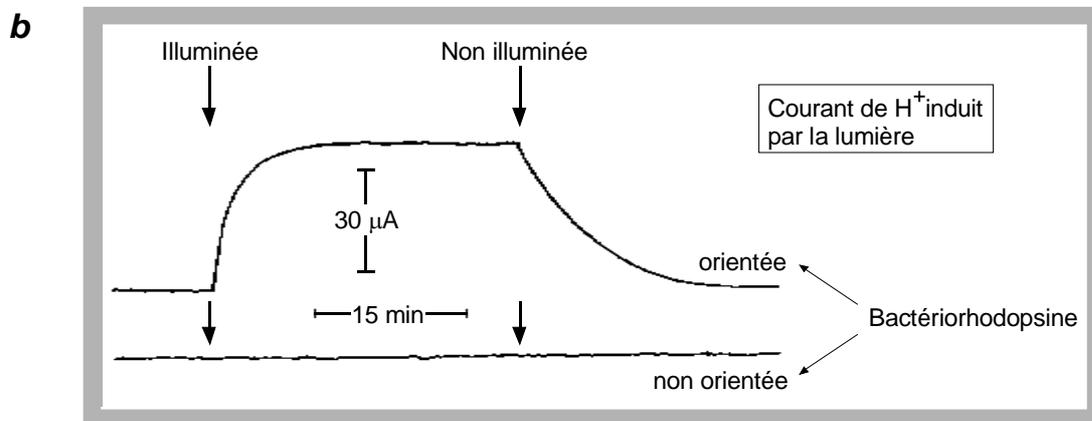
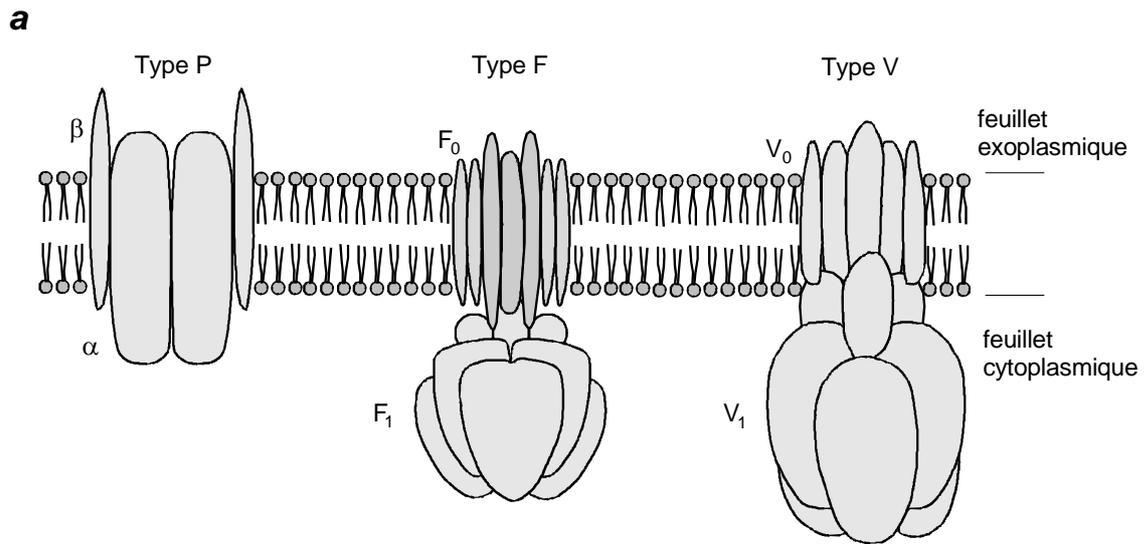
1) La  **$Na^+/K^+$ -ATPase** est une pompe ionique ubiquitaire dans les cellules du règne animal. L'Américain *R.B. Dean* postula le premier, en 1941, la présence d'une pompe à sodium dans la membrane plasmique des fibres musculaires, mais il a fallu attendre 1957 et les travaux du Danois *J.C. Skou* pour que le lien ait été fait entre le concept de la pompe à sodium et une ATPase activée par les ions  $Na^+$  et  $K^+$ . Entre ces deux dates, il est à relever qu'un chercheur suisse, *H.T. Schatzmann*, montra en 1953 que la pompe à  $Na^+$  **était inhibée par l'ouabaïne**. Cet inhibiteur, dont l'action s'est avérée très spécifique, appartient à un groupe de substances qui sont depuis longue date utilisées comme des médicaments dits *cardiotoniques* dans différentes maladies cardiaques. La  $Na^+/K^+$ -ATPase est un médiateur membranaire indispensable pour créer et maintenir l'une des asymétries fondamentales de la composition des liquides intra- et extracellulaire : l'asymétrie caractérisée par une concentration  $[Na]_i$  faible et une concentration  $[K]_i$  élevée à l'intérieur de la cellule tandis que les concentrations  $[Na]_e$  et  $[K]_e$  sont respectivement forte et faible dans le liquide extracellulaire. La  $Na^+/K^+$ -ATPase transporte ces deux ions contre leurs gradients électrochimiques respectifs, à raison de 3 ions  $Na^+$  vers l'extérieur et 2 ions  $K^+$  vers l'intérieur de la cellule par molécule d'ATP hydrolysée. Plusieurs auteurs ont proposé des « cartoons » qui sont autant de modèles des différentes étapes du transport des ions  $Na^+$  et  $K^+$  par la pompe à sodium, étapes où l'on postule des *changements de configuration* de la sous-unité  $\alpha$  et des *changements d'affinité* des sites pour la liaison de  $Na^+$  et de  $K^+$ , suite à la phosphorylation et à la déphosphorylation d'un résidu aspartate de la même sous-unité (**Fig. 18**). La sous-unité  $\alpha$  est donc, et de loin, la sous-unité principale. Elle possède des sites spécifiques pour la liaison : de l'ATP ; des ions  $Na^+$  et  $K^+$  ; des deux inhibiteurs vanadate et ouabaïne. Elle est aussi le siège du site de phosphorylation. Les sites pour l'ATP, la phosphorylation, le vanadate et les ions  $Na^+$  (3 sites,  $K_m = 0,2$  mM) sont du **côté cytoplasmique** de la protéine, tandis que les sites pour l'ouabaïne et les ions  $K^+$  (2 sites,  $K_m = 4$  mM) sont du **côté extracellulaire**. En ce qui concerne la sous-unité  $\beta$ , son rôle n'est pas encore bien défini. Les gradients électrochimiques créés par l'activité de la pompe à  $Na^+$  sont constamment menacés de dissipation à cause du transport passif de  $Na^+$  et  $K^+$  à travers des canaux ioniques.



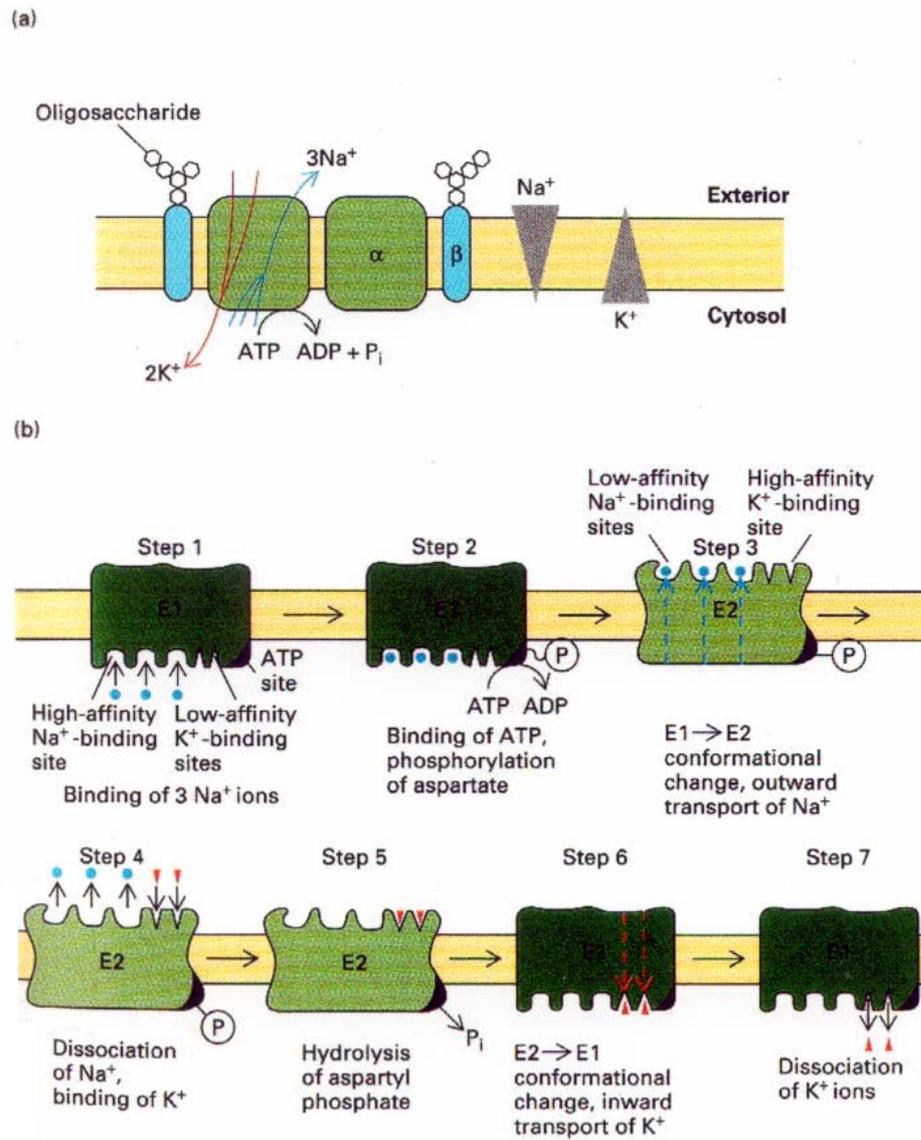
**Fig. 15** Diffusion facilitée de glucose (g)



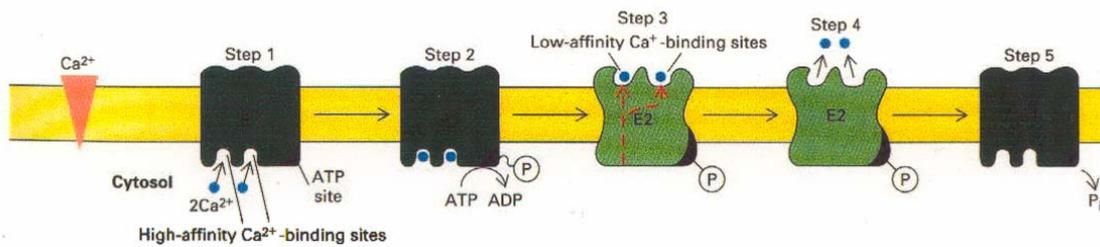
**Fig. 16** Diffusion et transport actif



**Fig. 17** Pompes ioniques: Rappel



**Fig. 18** *La*  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$



**Fig. 19** *La*  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$

A l'état stationnaire, un *équilibre dynamique* s'installe entre le transport actif de la pompe et le transport passif via les canaux ioniques (*modèle de la pompe et canal de fuite*). L'énergie dépensée par les cellules animales avec la pompe à  $\text{Na}^+$  est très considérable mais les couplages multiples des flux de  $\text{Na}^+$  avec ceux de nombreuses espèces chimiques rentabilisent cette dépense. De tels couplages sont la base de ce qu'on appelle l'*économie natriocentrique* de la cellule animale. Chez l'homme au repos, on estime que 19 à 28% de la consommation d'oxygène est liée à l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, mais dans certains organes (cerveau, rein) ce pourcentage s'élève à 50-60%. A titre de comparaison, notons que la consommation liée à la  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase est de 4-8% seulement.

2) La  **$\text{Ca}^{++}$ -ATPase**, ou pompe à calcium, a deux localisations principales : la *membrane plasmique* et la membrane du *réticulum sarcoplasmique* du muscle squelettique. La  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase située dans la membrane plasmique joue un rôle capital dans le maintien d'une concentration intracellulaire de calcium  $[\text{Ca}^{++}]_i$  très basse, de l'ordre de  $10^{-7}$  M, face à une concentration extracellulaire environ 10'000 fois plus élevée. Les variations de  $[\text{Ca}^{++}]_i$  sont un élément essentiel du couplage stimulus-effet biologique dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que le couplage stimulus-sécrétion et stimulus-contraction musculaire. Par exemple, une montée de  $[\text{Ca}^{++}]_i$ , grâce à la mobilisation de  $\text{Ca}^{++}$  séquestré dans le réticulum sarcoplasmique, doit précéder la contraction du muscle squelettique. Pour que le muscle puisse ensuite se relâcher, il faut que  $[\text{Ca}^{++}]_i$  redescende à la valeur de repos, ce qui implique un transport actif de  $\text{Ca}^{++}$  du cytosol vers le réservoir sarcoplasmique. Ce transport est le fait d'une  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase localisée dans la membrane de cet organite. Le gradient contre lequel se fait ce transport est fortement réduit par la présence de protéines qui se lient au  $\text{Ca}^{++}$  à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique.

L'une de ces protéines, la *calsequestrine*, peut lier 43 ions  $\text{Ca}^{++}$ . La  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase représente 80% des protéines de la membrane du réticulum sarcoplasmique, ce qui a facilité l'isolement, la purification et la caractérisation de cette pompe. Quant à la  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase de la membrane plasmique, on connaît plusieurs isoformes ; l'activité de certaines d'entre elles est modulée par une protéine régulatrice, la *calmoduline*. Les différentes étapes du transfert de 2 ions calcium sont illustrés dans la **Fig. 19**.

3) La  **$\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase** est une pompe à protons localisée principalement dans les cellules dites pariétales des glandes gastriques, où elle joue un rôle déterminant dans la *sécrétion active de HCl*. Lorsque cette sécrétion est activée, des pompes  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase sont insérées dans la membrane apicale des canalicules sécrétoires des cellules pariétales (**Fig. 20**). Des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sont transportés passivement via des canaux ioniques vers la lumière de ces canalicules. En reprenant le  $\text{K}^+$  et en sécrétant des protons par un processus actif, la  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase transforme la sécrétion initiale de KCl en sécrétion de HCl. Cette pompe peut être inhibée assez spécifiquement par une substance appelée *oméprazole*, laquelle est utilisée actuellement comme médicament pour diminuer la sécrétion de HCl. Une telle inhibition est nécessaire, par exemple, chez des patients souffrant d'un ulcère duodénal et dont l'estomac sécrète trop de HCl.

**Pompes de type F.** Aussi appelées  **$\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPases**, ces pompes sont des  $\text{H}^+$ -ATPases que l'on trouve dans les mitochondries, les chloroplastes et la membrane de certaines bactéries. Curieusement, les F-ATPases, dont celle des mitochondries, fonctionnent habituellement dans un mode « inversé » par rapport au transport actif de protons : *elles synthétisent de l'ATP à partir de l'énergie fournie par la dissipation d'un gradient de protons*. Dans ces circonstances, la désignation la plus adéquate est celle de  **$\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP synthases**. Ces synthases sont des macromolécules constituées de nombreuses sous-unités (**Fig 17a**). Le complexe comprend une partie transmembranaire  **$\text{F}_0$** , qui fonctionne comme un *canal de protons*, et une partie extramembranaire  **$\text{F}_1$** , laquelle peut effectuer soit la *synthèse* soit l'*hydrolyse d'ATP*. La  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP synthase est localisée dans la membrane *interne* des mitochondries. L'énergie nécessaire pour la synthèse d'ATP est fournie par le gradient de protons créé par les pompes redox de la chaîne respiratoire. Le rôle central de la  **$\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP synthase** mitochondriale est illustré dans la **Fig. 21**, montrant qu'elle fournit les ATP nécessaires au fonctionnement de toutes les autres pompes ioniques de la cellule.

**Pompes de type V.** Il s'agit de  **$\text{H}^+$ -ATPases** que l'on trouve: a) dans la membrane de beaucoup d'organites (lysosomes, endosomes, vacuoles, etc) des cellules en général; b) dans la membrane plasmique des *ostéoclastes*, c.-à-d. des cellules qui créent un pH acide localement pour résorber l'os (**Fig. 22**); les protons générés sous l'action de l'anhydrase carbonique sont pompés hors de la cellule par la  $\text{H}^+$ -ATPase; c) dans la membrane apicale des cellules des tubules rénaux impliquées dans l'*acidification de l'urine* par sécrétion active de protons. Deux autres localisations ont été mises en évidence. La première concerne des

cellules semblables à celles des tubules rénaux, lesquelles *acidifient certains segments de tractus génital masculin* (épididyme, canal déférent) afin que les spermatozoïdes y soient immobilisés pour effectuer leur maturation. La deuxième concerne la membrane plasmique des globules blancs (neutrophiles) activés en vue d'une action microbicide. L'activation des neutrophiles s'accompagne de la production de quantités très importantes d'acide qu'il faut absolument transporter hors de ces cellules. La structure des V-ATPases présente des similitudes avec celle des F-ATPases. On distingue par analogie une partie  $V_0$  membranaire, le canal de protons, et une partie  $V_1$  extramembranaire, siège de l'hydrolyse d'ATP (**Fig. 17a**). Les V-ATPases ont un inhibiteur assez spécifique, la *bafilomycine*.

### Autres pompes

Il existe une nombreuse et importante « superfamille » de transporteurs membranaires appelés **transporteurs ABC** (ATP Binding Cassette), dont certains aspects de la structure moléculaire ont été remarquablement conservés au cours de l'évolution. La plupart sont des **ATPases** qui fonctionnent comme des **pompes membranaires**. D'autres, comme la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) fonctionnent plutôt comme des **canaux**. La protéine **CFTR** agit comme un **canal chlorure**. Dans la maladie de la mucoviscidose, le canal CFTR est non fonctionnel, et les cellules épithéliales respiratoires sont incapables de liquéfier **le mucus**. La personne affectée risque alors de s'étouffer.

Un autre transporteur ABC fort intéressant auquel nous avons déjà fait allusion est la **glycoprotéine P**, une protéine membranaire impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. En effet, le traitement par des drogues anticancéreuses s'accompagne de l'activation d'un gène appelé MDR (*multidrug resistance*) dans les cellules malignes, ce qui conduit à la *surexpression* de la glycoprotéine P. Celle-ci fonctionnerait comme une *pompe* capable d'expulser des cellules cancéreuses les drogues en question, ce qui diminue leur concentration intracellulaire et rend le traitement inefficace.

Jusqu'ici nous avons examiné des pompes dont la source énergétique est l'hydrolyse d'ATP. Dans des bactéries comme l'*Escherichia coli* on connaît l'existence d'un autre type de pompe : il s'agit du système des *phosphotransférases*, dont le mécanisme d'action implique la *translocation d'un groupe phosphorylé*. La source d'énergie est dans ce cas le *phosphoénolpyruvate*. Chez les bactéries, de telles pompes transportent activement plusieurs types de sucre (glucose, arabinose, etc).

Pour terminer ce chapitre, faisons une brève allusion à deux **pompes photosensibles** que l'on trouve dans les bactéries halophiles qui vivent dans des milieux à haute salinité. Il s'agit de la bactériorhodopsine (qui est une *pompe à H<sup>+</sup>*) et de la halorhodopsine (qui est une *pompe à Cl<sup>-</sup>*). Le *couplage direct d'énergie lumineuse avec un transport actif de protons* a pu être démontré *in vitro* au moyen d'une membrane synthétique dans laquelle avaient été incorporées des molécules de *bactériorhodopsine*. L'illumination de la membrane produit un courant de protons (**Fig. 17b et c**), mesurable par la technique *du courant du court-circuit* dont nous parlerons un peu plus loin. Signalons en passant que parmi les systèmes de transport actif reconstitués *in vitro* dans des membranes lipidiques artificielles, celui schématisé dans la **Fig. 17c** est tout à fait étonnant. On a pu démontrer dans un système si simple que l'illumination de molécules de bactériorhodopsine crée un gradient de protons, lequel permet à une deuxième pompe, une  $F_0F_1$ -synthase, de synthétiser de l'ATP !

La bactériorhodopsine fut la première protéine membranaire dont on a pu déterminer la structure. Constituée par 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires, la bactériorhodopsine possède un groupe chromophore sensible à la lumière, le **rétilnal**, attaché à l'hélice G. On connaît actuellement le mode de translocation des protons à l'intérieur de cette molécule et la durée des différentes phases du photocycle. L'intérêt physiologique de ces nouvelles connaissances devient évident lorsqu'on sait que les structures de la bactériorhodopsine et des pigments visuels de l'œil humain sont analogues.

### Cinétique du transport actif

Lorsqu'on compare la diffusion facilitée et le transport actif (**Fig. 16b, c**), on constate dans les deux cas une relation curvilinéaire entre le flux de la substance transportée et sa concentration dans le milieu externe. Le taux de transport maximal correspond à la saturation du système de transport lorsque tous les transporteurs, pompes ou uniports, sont utilisés. En revanche, l'égalité entre influx et efflux de la substance transportée est atteinte dans des conditions différentes : dans la *diffusion facilitée*, l'égalité des flux s'observe lorsque les concentrations à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule sont les mêmes ; dans le *transport primairement actif*, il est possible d'aller au-delà de l'égalité des concentrations et de transporter

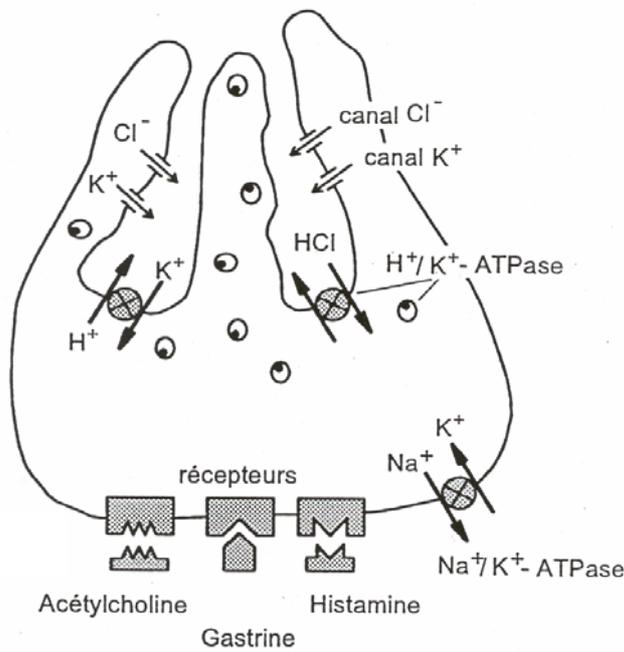
contre un gradient électrochimique. Toutefois, lorsque le gradient électrochimique atteint la valeur maximale contre laquelle la pompe peut transporter, influx et efflux deviennent égaux.

### Épithélia et transport actif de $\text{Na}^+$

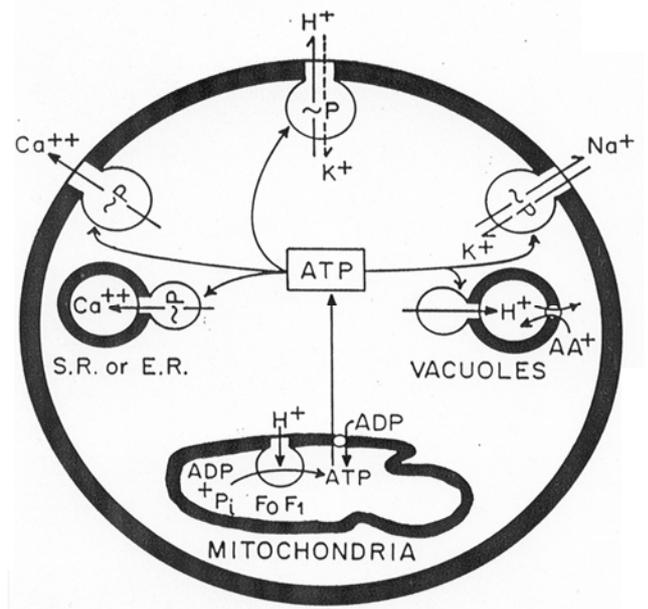
Dans les épithélia, l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase peut sous-tendre une fonction de transport **vectorel** de  $\text{Na}^+$  de l'extérieur de l'organisme vers le milieu intérieur. Cela concerne en particulier la réabsorption de  $\text{Na}^+$  à travers les épithélia de l'intestin et des tubules rénaux. Les cellules épithéliales sont des cellules **polarisées** et leur membrane plasmique a deux domaines distincts - **apical** et **latéro-basal** - où les processus de transport d'une même espèce chimique sont en général assez différents. Ainsi, les cellules du tube collecteur du rein (**Fig 23a**) ont des *canaux* spécifiques pour l'entrée de  $\text{Na}^+$  dans la *membrane apicale*, et des pompes pour la sortie de  $\text{Na}^+$  vers le milieu intérieur dans la *membrane latéro-basale*. L'activité des pompes à  $\text{Na}^+$  maintient la concentration intracellulaire de ce cation à une valeur très basse, ce qui crée un gradient favorable à l'entrée passive de  $\text{Na}^+$  à travers les canaux apicaux. Ces derniers ont la particularité d'être la cible de deux hormones majeures - *l'aldostérone et la vasopressine* - et d'être bloqués par un diurétique, *l'amiloride*.

Le transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  occupe une position unique dans l'histoire du transport membranaire, grâce aux travaux dans les années 50 du chercheur danois *H.H. Ussing*. Il a utilisé un modèle expérimental (*la peau de grenouille*) et une technique (*le courant de court-circuit*) très simples. Lorsqu'une peau de grenouille est installée entre deux chambres contenant des solutions appropriées pour la survie du tissu, la peau transporte des ions  $\text{Na}^+$  du milieu baignant sa face **externe** vers le milieu baignant sa face interne. Ce transport donne origine à une *différence de potentiel* électrique entre les deux faces de la peau, différence que l'on mesure aisément avec un voltmètre. À l'aide d'un circuit électrique rudimentaire (**Fig. 23b**), on peut faire passer dans ce système un courant jusqu'à ce que la différence de potentiel soit annulée. Il a été démontré que ce courant, appelé **courant court-circuit,  $I_{cc}$** , est *identique au flux net de  $\text{Na}^+$  à travers la peau*. Le graphe de la **Fig. 23c** montre que le transport actif de  $\text{Na}^+$  effectué par la peau **augmente** lorsque l'épithélium est stimulé par la vasopressine, et **diminue** lorsqu'il est exposé à un inhibiteur spécifique, en l'occurrence l'amiloride. Ces effets sur la peau de grenouille sont d'autant plus intéressants qu'ils reproduisent ceux que l'on observe *in vivo* dans le tube collecteur du rein ou dans le côlon. À noter que l'aldostérone induit un effet semblable à celui de la vasopressine, quoique par un mécanisme différent.

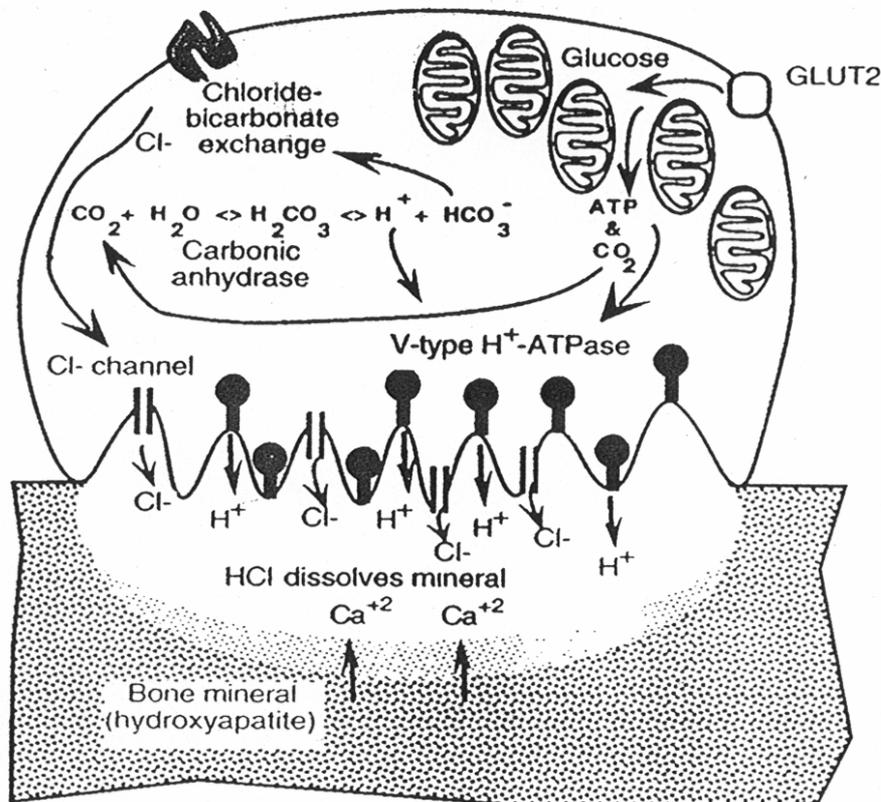
Étant donné que le transport *transépithélial* de  $\text{Na}^+$  est globalement un processus actif, il doit y avoir une corrélation entre les variations de ce transport (et donc de  $I_{cc}$ ) et les variations concomitantes de la consommation de  $\text{O}_2$  par la peau de grenouille. Une démonstration particulièrement convaincante est illustrée dans la **Fig. 23d**. On remarque une relation linéaire très significative entre ces deux paramètres, laquelle persiste lorsque le transport de  $\text{Na}^+$  est stimulé par la vasopressine ou inhibé par l'ouabaïne, l'inhibiteur spécifique de la pompe à  $\text{Na}^+$ . En présence de cyanure de potassium (KCN), le métabolisme cellulaire s'effondre et la consommation de  $\text{O}_2$  est abolie. Dans ces conditions, le transport actif de  $\text{Na}^+$  est, lui aussi, logiquement arrêté.



**Fig. 20** La  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase



**Fig. 21** La  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP synthase et ses consommatrices



**Fig. 22** La  $\text{V}$ -type  $\text{H}^+$ -ATPase

## Transport secondairement actif

Le concept de *transport secondairement actif* a mis un certain temps à s'imposer mais il est accepté aujourd'hui de façon générale par les auteurs. Ce type de transport est possible grâce au couplage des flux de deux (ou de plus de deux) espèces chimiques au niveau d'un transporteur membranaire. Dans les exemples de transport **primairement** actif que nous avons étudiés, l'apport d'énergie provenait principalement de l'hydrolyse d'ATP car la plupart des pompes étaient des ATPases. Dans le transport **secondairement** actif, *il n'y a pas* de consommation d'ATP au niveau du transporteur impliqué dans ce phénomène. De même que pour le transport primairement actif, le transport secondairement actif d'une deuxième espèce moléculaire, organique ou ionique, peut se faire *contre son gradient chimique ou électrochimique*. Dans les processus de transport secondairement actif, *il y a toujours cotransport*, lequel est effectué par des **symports** ou par des **antiports**. A noter cependant que la terminologie dans ce domaine n'est pas encore unifiée: certains auteurs parlent de *cotransport* pour le cas des symports exclusivement et réservent le terme de *contre-transport* pour le cas des antiports. Nous adopterons ici un concept plus large selon lequel la désignation de cotransport s'applique aux deux types de transporteurs.

### Cotransport par symport

La **Fig. 24a** est un schéma général du transport secondairement actif effectué par un symport grâce au gradient électrochimique de  $\text{Na}^+$ . La cellule représentée est une *cellule polarisée*, avec une membrane apicale et une membrane latéro-basale, telle une cellule de la muqueuse intestinale ou du tubule rénal. Dans la membrane *latéro-basale* (ou péricytotubulaire) sont localisées les *pompes à  $\text{Na}^+$*  qui maintiennent  $[\text{Na}^+]_i$  à une valeur assez basse. Cela crée un gradient favorable à l'entrée de  $\text{Na}^+$  à travers la membrane apicale, en l'occurrence par l'intermédiaire d'un **symport**.

Plusieurs substances, *organiques ou inorganiques*, sont transportées à travers la membrane plasmique *conjointement avec l'ion  $\text{Na}^+$*  par un mécanisme de ce type. C'est le cas du glucose, de certains acides aminés, d'acides organiques, du phosphate, du sulfate, etc. Toute une série de symports ont été clonés, dont le symport **Na-glucose**. On connaît deux isoformes : l'une, appelée **SGTL1**, où le couplage se fait avec 2 ions  $\text{Na}^+$  ; l'autre, appelée **SGTL2**, où le couplage se fait avec 1 ion  $\text{Na}^+$  seulement. Pour que le cotransport ait lieu, les sites ayant une affinité pour le  $\text{Na}^+$  et pour le soluté cotransporté, localisés sur la surface extracellulaire du symport, doivent être occupés. Selon les modèles mécanistiques proposés à ce jour, cette occupation induit un *changement de configuration* du symport de telle sorte que ces sites primitivement extracellulaires vont se trouver exposés au liquide intracellulaire dans lequel les solutés sont ensuite relâchés ; cela entraîne la récupération de la configuration initiale et le cycle du cotransport peut recommencer (**Fig. 24b**). Le transport secondairement actif par symport permet entre autres la **réabsorption** de nombreuses substances essentielles pour l'organisme et *rentabilise* ainsi de façon remarquable l'énergie dépensée avec la pompe à  $\text{Na}^+$ .

La **Fig. 25** montre différents symports et uniports (GLUTs) qui interviennent dans la réabsorption intestinale et rénale du glucose. Il est à relever que dans la plupart des cellules de l'organisme, la concentration intracellulaire du glucose est **inférieure** à celle du plasma, ce qui permet le passage de l'hexose vers les cellules par l'intermédiaire de différents GLUTs. Dans les cellules intestinales et rénales qui réabsorbent du glucose de la lumière de l'intestin ou du tubule rénal vers le sang, la situation est *inversée* : le flux diffusionnel va de la cellule vers le sang à travers un uniport GLUT1 ou GLUT2 (**Fig. 25**). *Comment atteindre alors une concentration intracellulaire suffisamment élevée pour que ce flux diffusionnel à travers la membrane latéro-basale de l'épithélium puisse avoir lieu ?* Cela devient possible grâce au symport Na-glucose apical qui, en utilisant l'énergie stockée dans le gradient sodique, permet le transport du glucose contre son gradient chimique transapical. Au fur et à mesure que la réabsorption de glucose se poursuit, sa concentration devient plus faible dans la lumière de l'intestin ou du tubule rénal. C'est dire que le gradient du glucose devient plus raide, ce qui demande davantage d'énergie. Afin de satisfaire ce besoin, on trouve l'isoforme **SGTL1** dans la membrane apicale des cellules intestinales et des cellules de la partie terminale du tube proximal du rein (**Fig. 25**). Du fait qu'il y a couplage de 2 ions  $\text{Na}^+$  avec une molécule de glucose, SGTL1 peut transporter contre des gradients transapicaux de glucose correspondant à des rapports de concentrations de l'ordre de 1/30000. La **Fig. 25** montre aussi que dans la première partie du tube proximal du rein le cotransport se fait à l'aide du symport **SGLT2**. Le transport

d'une molécule de sodium est couplé au transport d'une molécule de glucose. L'apport énergétique du sodium est suffisant, étant donné que les gradients transapicaux de glucose sont encore modestes dans ce segment du tubule rénal.

On connaît aujourd'hui plusieurs symports où les espèces chimiques cotransportées *sont toutes des ions inorganiques*. Deux symports ont une importance en physiologie et physiopathologie rénales : (i) le symport **Na-K-2Cl**, inhibé par le furosémide ; (ii) le symport **NaCl**, inhibé par le *chlorothiazide*. Le mécanisme de base est toujours le même : a) création d'un gradient favorable à l'entrée apicale de  $\text{Na}^+$  ; b) utilisation de l'énergie libre du gradient de concentration du sodium pour le cotransport d'autres solutés. Ces deux symports sont exprimés dans des segments distincts du tubule rénal où ils jouent un rôle crucial dans la réabsorption rénale de  $\text{Na}^+$ . Leurs inhibiteurs sont des diurétiques connus depuis fort longtemps.

En plus de ces symports on relève encore : (i) le symport *Na-sels biliaires*, qui permet la réabsorption de ces sels au niveau de l'iléon ; (ii) le symport *Na-dicarboxylate*, qui permet la réabsorption d'acides du cycle de Krebs par le tubule rénal ; (iii) les symports *Na-phosphate*, *Na-sulfate* et *Na-bicarbonate* qui jouent un rôle crucial dans la réabsorption rénale de ces anions ; (iv) le symport *Na-iodure*, qui permet de concentrer l'iode à l'intérieur des cellules de la glande thyroïde, première étape dans la synthèse des hormones thyroïdiennes (ce symport permet par ailleurs l'utilisation d'iode radioactif dans le traitement de certains cancers de la thyroïde).

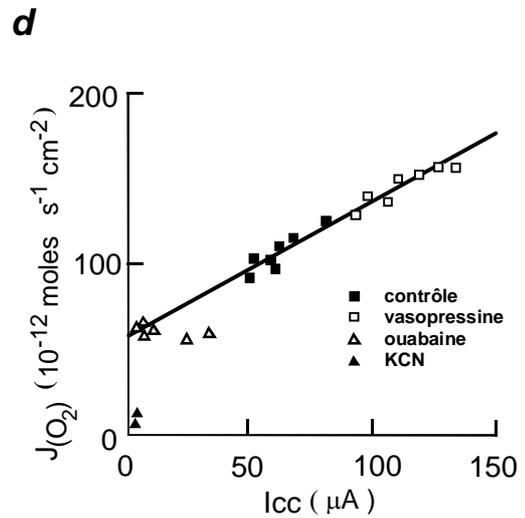
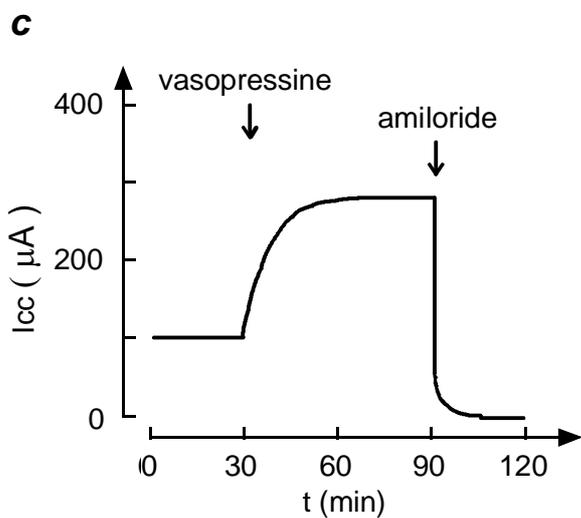
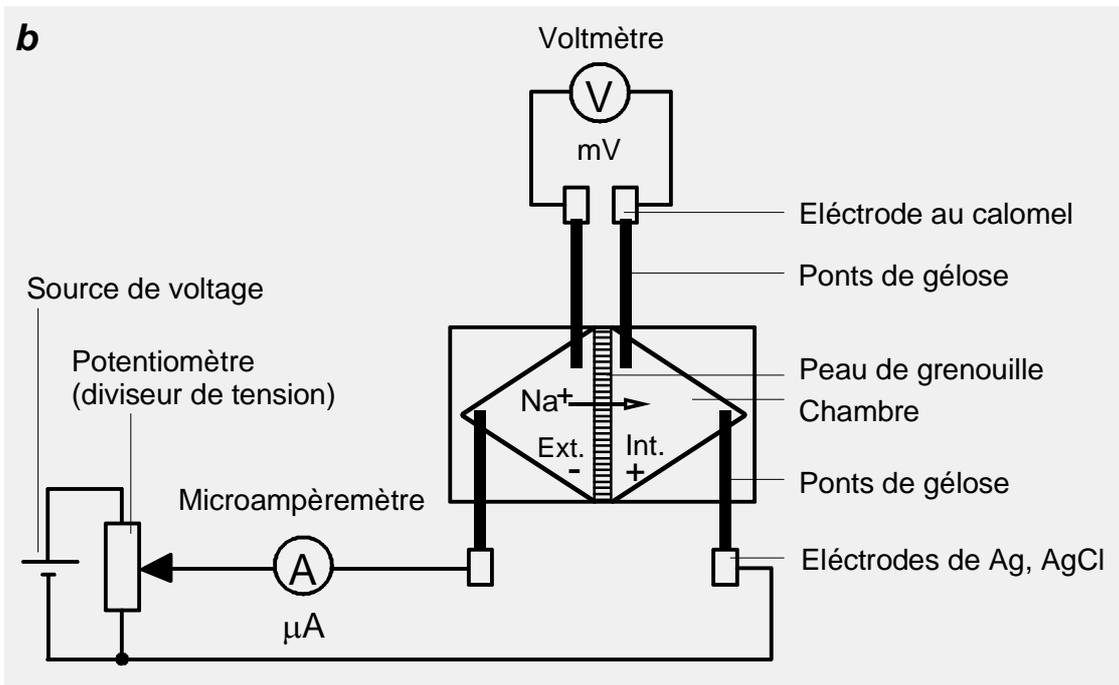
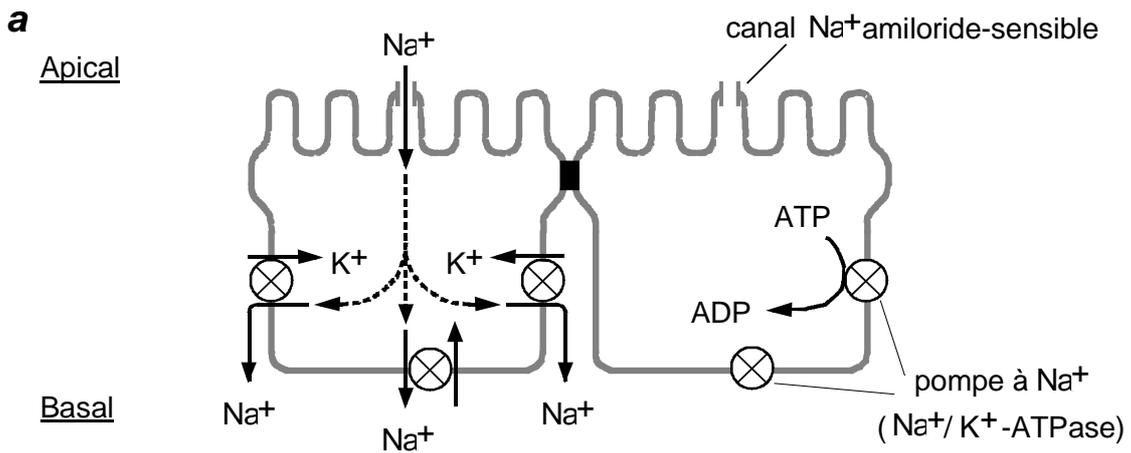
Quoique beaucoup moins fréquents, on connaît des exemples de symport où le couplage se fait avec **un flux passif de protons**. C'est le cas du symport *H<sup>+</sup>-oligopeptides (Pept-1)*, lequel effectue le transport non seulement des petits peptides (di-, tripeptides) mais aussi le transport de certains antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames (ex : la pénicilline) au niveau de la muqueuse intestinale et du tubule rénal. Par ailleurs, on trouve dans les mitochondries un symport *H<sup>+</sup>-phosphate*, un élément indispensable pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. En 1997, un symport *H<sup>+</sup>-métaux divalents (DCT1)*, exprimé de façon ubiquitaire mais particulièrement abondant dans le *duodénum* a été cloné. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension de la biologie et de la physiopathologie de métaux tels que le  $\text{Fe}^{++}$ , le  $\text{Zn}^{++}$  et le  $\text{Cu}^{++}$ , lesquels sont associés à différentes maladies dont certaines sont génétiques. En particulier, le *DCT1* peut jeter une lumière nouvelle sur les mécanismes encore très mal connus de l'*absorption intestinale de fer*.

### Cotransport par antiport

Les antiports transportent des molécules dans des **sens opposés**, et sont souvent désignés dans la littérature par le terme d'« échangeurs ». Trois antiports sont bien connus : a)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ; b)  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  ; c)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ .

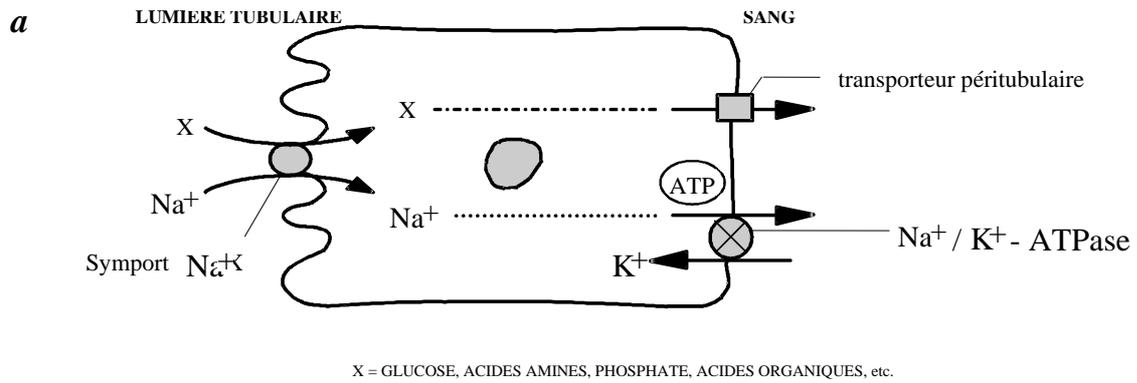
L'antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est très répandu et il en existe plusieurs isoformes qui participent à la régulation du volume et du pH intracellulaires. Dans la membrane apicale des cellules du tubule rénal, l'antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  participe, avec la pompe  $\text{H}^+$ -ATPase, à l'*acidification* de l'urine et à l'excrétion de protons par le rein (**Fig. 26**). Il est aussi, bien évidemment, une voie importante pour la réabsorption de  $\text{Na}^+$ .

L'antiport  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  est également très répandu dans les types cellulaires les plus divers, dont la cellule épithéliale (**Fig. 26**). Une isoforme particulièrement intéressante est celle du *globule rouge*. Cet antiport joue un rôle absolument capital dans le transport sanguin du  $\text{CO}_2$  produit par les cellules et dans l'élimination de  $\text{CO}_2$  par les poumons. Nous en reparlerons dans le chapitre consacré au système respiratoire.

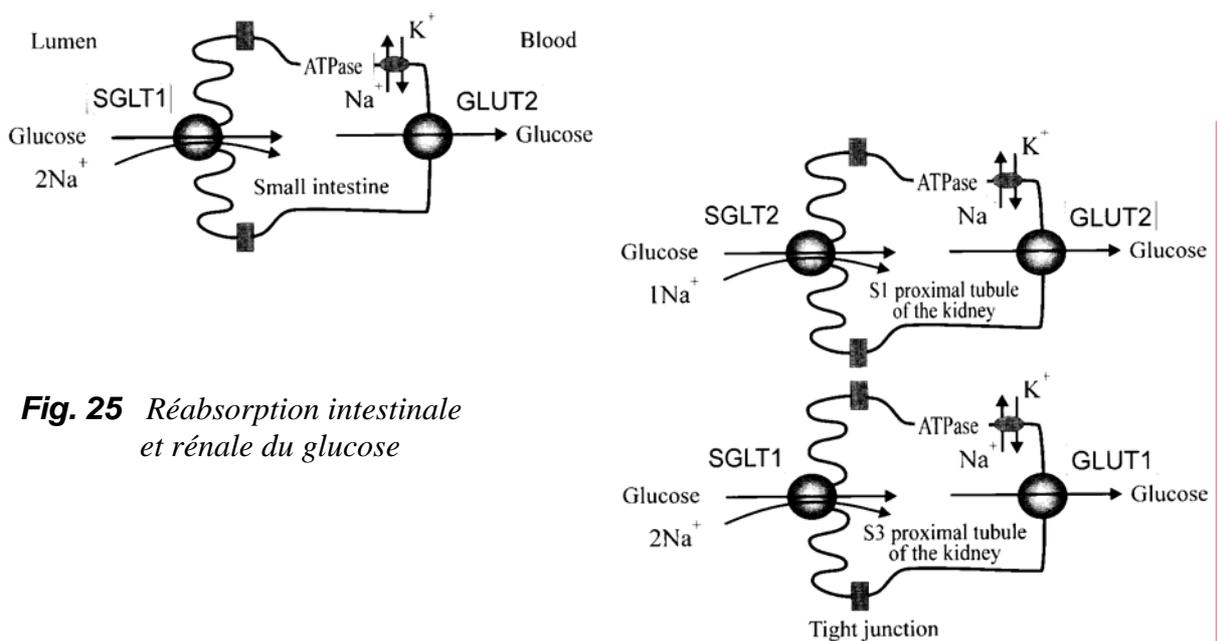
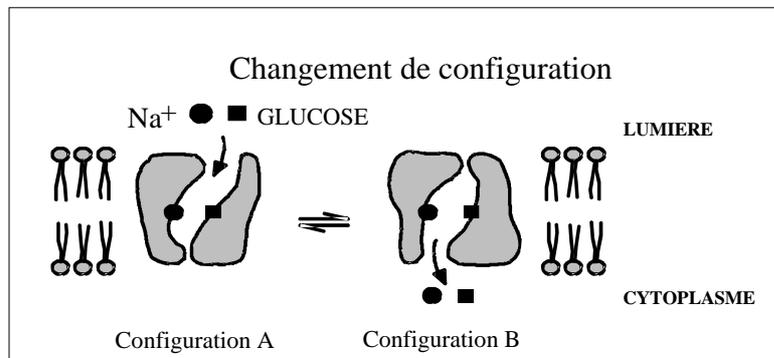


**Fig. 23** Mesure du flux de sodium à travers un épithélium

**Fig. 24** *Transport secondairement actif : Cotransport par symport*



**b**



Quant à l'antiport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , sa fonction de régulateur de  $[\text{Ca}^{++}]_i$  est particulièrement importante dans les cellules du muscle cardiaque (**Fig. 27**). Trois ions  $\text{Na}^+$  sont nécessaires pour assurer le transport de 1 ion  $\text{Ca}^{++}$  en présence d'une différence de concentration très élevée : environ 0.1  $\mu\text{M}$  à l'intérieur de la cellule et 1,5 mM dans le milieu extracellulaire. Un inhibiteur de la pompe à  $\text{Na}^+$  - l'ouabaine ou la digoxine - peut être utilisé thérapeutiquement pour augmenter la force de contraction du muscle cardiaque: l'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase provoque une augmentation de  $[\text{Na}]_i$ , ce qui à son tour diminue l'échange  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  à cause de la diminution du gradient sodique transmembranaire ; cela entraîne une augmentation de  $[\text{Ca}^{++}]_i$  et une contraction plus forte des fibres myocardiques (*effet inotrope*).

D'autres antiports ayant un intérêt physiologique majeur sont connus, mais nous ne les passerons pas en revue. Ainsi, des antiports interviennent dans l'excrétion des médicaments par le tubule rénal. Ces médicaments sont souvent des anions ou des cations organiques et doivent emprunter des antiports couplés à l' $\text{H}^+$  ou à  $\text{Na}^+$  avant d'être *sécrétés* dans l'urine. Aussi, dans la membrane interne des mitochondries, il y a plusieurs antiports importants, dont la **translocase ADP/ATP** qui envoie dans le cytosol l'ATP synthétisé grâce à la phosphorylation oxydative (**Fig. 28**).

Pour terminer le sujet du cotransport, abordons brièvement les **transporteurs des neurotransmetteurs**. On sait que les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique doivent être recapturés très rapidement par les neurones. Cela se fait au moyen de transporteurs dont certains sont d'une grande complexité, eu égard au fait que plusieurs espèces chimiques sont couplées. Par exemple, le transporteur **GAT1** du *GABA* ( *$\gamma$ -aminobutyric acid*) est un symport qui couple 2  $\text{Na}^+$ , 1  $\text{Cl}^-$  et 1 molécule de GABA. Quant au transporteur **EAAC1** du *glutamate*, le couplage de flux se présente ainsi : 2  $\text{Na}^+$  et 1 molécule de glutamate vers la cellule, 1  $\text{K}^+$  et 1  $\text{OH}^-$  vers le milieu extracellulaire. L'énergétique de ce couplage de flux permet d'atteindre des rapports de concentration de glutamate de l'ordre de  $10^5$  !

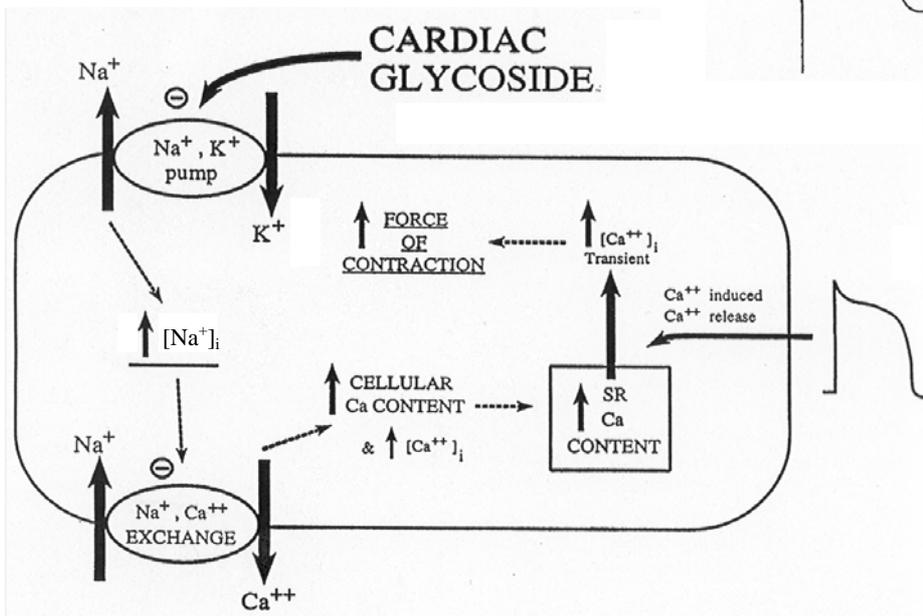
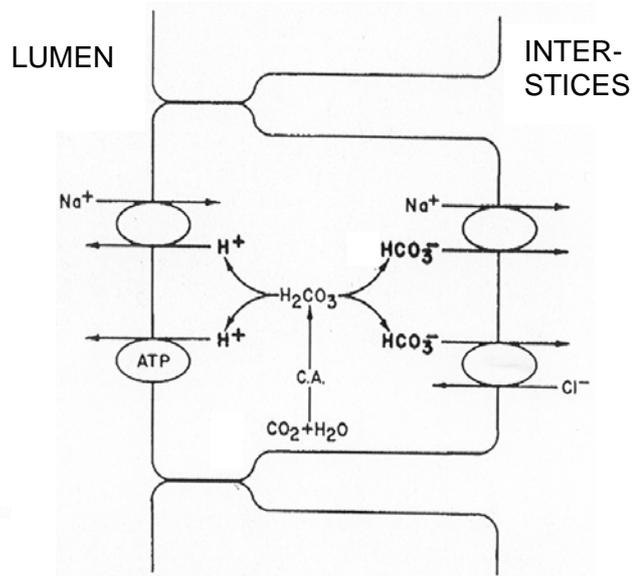
## Transport d'eau

### Tonicité et osmolarité

Tout gradient osmotique entre les liquides intra- et extracellulaire est immédiatement *dissipé par un flux d'eau* qui entraîne des altérations du *volume cellulaire*. On peut tester facilement ce principe au moyen d'expériences simples, *in vitro*. On place des cellules dans des solutions contenant **des solutés qui ne traversent pas la membrane plasmique** et dont l'osmolarité est *égale, supérieure ou inférieure* à l'osmolarité intracellulaire normale (environ 300 milliosmoles/L). On appellera ces solutions, respectivement *isotoniques, hypertoniques et hypotoniques* par rapport au liquide intracellulaire (**Fig. 29**). De telles expériences sont très démonstratives si l'on utilise des globules rouges : on voit aisément que le volume de ceux-ci *ne change pas* dans les solutions **isotoniques de NaCl**, *diminue* dans les solutions **hypertoniques** et *augmente* dans les solutions **hypotoniques**. On peut même faire éclater les globules rouges si on les plonge dans des solutions suffisamment diluées, ce qui fut dans le temps un test clinique (et un TP !) pour déterminer la « résistance globulaire ».

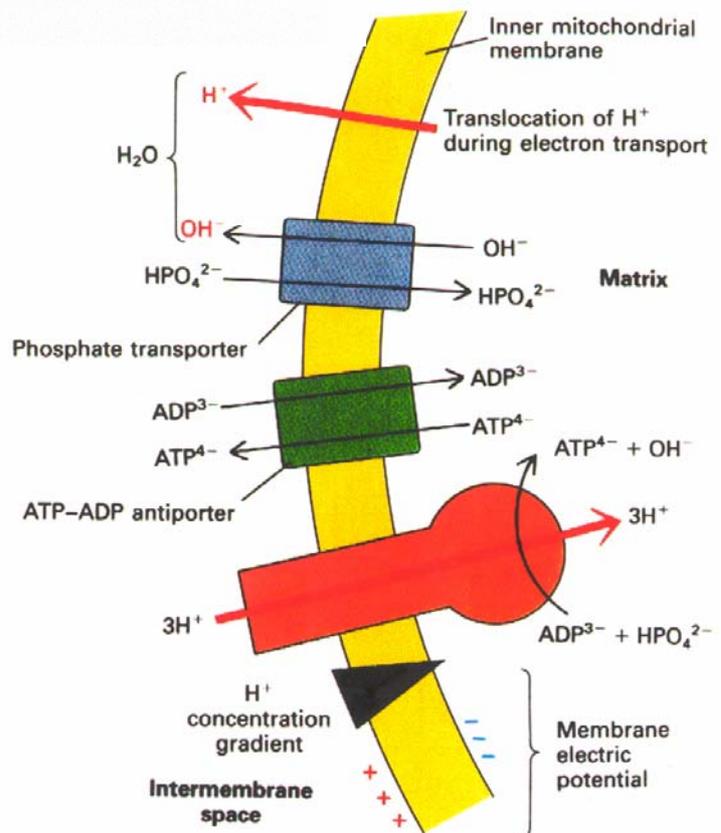
Comment expliquer la direction du flux d'eau ? La **Fig. 30** montre que le flux d'eau se dirige d'un compartiment de grande concentration d'eau vers un compartiment de plus basse concentration d'eau, tant que les solutés ne passent pas la membrane. L'équilibre est atteint quand l'efflux d'eau du compartiment 1 a concentré les solutés dans 1, et l'influx d'eau dans le compartiment 2 a suffisamment dilué les solutés dans 2. Clarifions également, à ce stade, comment calculer les « milliosmoles/L » d'une solution de NaCl. Une solution de 9 g/L de NaCl contient une concentration d'environ 150 millimoles/L de sodium et 150 millimoles/L de chlorure. En simplifiant, l'activité osmotique se calcule en ajoutant les concentrations de tous les solutés, donc on obtient pour l'osmolarité la somme totale de 300 milliosmoles/L. En réalité, les ions s'entrechoquent, se gênent donc mutuellement dans leur activité osmotique. L'osmolarité mesurée pour cette solution sera légèrement inférieure.

**Fig. 26** Les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  de la cellule épithéliale du tubule rénal



**Fig. 27** L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  du myocyte cardiaque

**Fig. 28** Les échangeurs  $\text{ATP}^{4-}/\text{ADP}^{3-}$  et  $\text{OH}^-/\text{HPO}_4^-$  de la mitochondrie



### Canaux d'eau (aquaporines)

Avant 1992 il n'était pas certain si le transport d'eau se faisait *exclusivement* à travers les lipides membranaires, ou par des **canaux** spécifiques. Cette controverse a pris un tournant historique, suite à un article publié dans le célèbre journal *Science*: Deux ovocytes de *Xenopus laevis* ont été placés dans un liquide *hypotonique*. L'un des ovocytes gonfle rapidement et éclate au bout de 3 min, alors que l'autre ne gonfle que très modérément (**Fig. 31a**). *Pourquoi?* L'ovocyte qui éclate a été *injecté avec du RNA messenger* codant pour une protéine de la membrane du globule rouge; l'autre est un ovocyte *témoin*. La protéine exprimée dans l'ovocyte injecté avec du RNAm fut le premier **canal d'eau** cloné. Désigné initialement *CHIP28*, il est appelé aujourd'hui **aquaporine 1**. Le canal d'eau semble avoir une structure tétramérique (**Fig. 31b**), transporte quelques trois milliards de molécules d'eau par seconde, et il est suffisamment étroit pour obliger les molécules d'eau à se déplacer en file indienne (*single-file diffusion*). Ce canal est bloqué réversiblement par des composés de mercure (*cf* les courbes *CHIP28* et *CHIP28 + Hg* de la Fig 10a).

La découverte de l'aquaporine 1 produisit une véritable révolution dans la biophysique du transport membranaire de l'eau. Chez les mammifères seulement, on connaît au moins 10 aquaporines différentes, avec des distributions tissulaires très variées. Des aquaporines ont été identifiées dans d'autres types d'animaux (p. ex. les amphibiens), dans les plantes et dans les bactéries. Ces canaux sont si répandus qu'il est plutôt difficile de concevoir aujourd'hui l'existence de cellules qui n'expriment aucune aquaporine. Même les spermatozoïdes en possèdent. Le problème des canaux d'eau est particulièrement intéressant dans les tubules rénaux, eu égard au fait qu'ils aident à réabsorber, chez l'homme, un volume d'eau de l'ordre de 170 L/jour. Ces tubules expriment en effet plusieurs aquaporines, dont on relève l'**aquaporine 1** dans les segments situés *proximalement* et l'**aquaporine 2** (**Fig. 31c**) dans le *tubule collecteur*. *A retenir*, l'aquaporine 2 est **sensible à la vasopressine**, une hormone provenant de la neurohypophyse. Cette hormone contrôle la *concentration de l'urine* et partant, joue un rôle déterminant dans *l'économie de l'eau* de notre organisme.

### Osmose et biophysique du transport d'eau

Dans de l'eau pure, la concentration d'eau est de **55.5 M**. Si l'on y dissout des solutés, ceux-ci prennent la place des molécules d'eau, ce qui *diminue la concentration d'eau et donc son potentiel chimique*. Si l'on sépare deux solutions de concentrations différentes d'un soluté donné par une membrane très perméable à l'eau et au soluté, les deux espèces chimiques - **soluté et solvant** - vont diffuser de façon indépendante. Grâce à ce phénomène d'**interdiffusion**, on arrive à un état d'*équilibre*. *Les concentrations du soluté et de l'eau sont alors partout la même sans que les volumes des deux solutions initiales n'aient changé*. La situation est bien différente si la membrane est perméable au solvant mais pas au soluté (**membrane semipermeable**) (**Fig. 30**). A l'équilibre, les concentrations d'eau et de soluté seront à nouveau partout les mêmes mais, du fait que seules les molécules d'eau peuvent se déplacer à travers la membrane, il y aura un *flux net d'eau* accompagné des *changements de volume* dans les deux compartiments (phénomène d'**osmose**). On peut empêcher ce mouvement d'eau dicté par le **gradient osmotique** transmembranaire à condition d'exercer sur la solution *la plus concentrée en soluté* une **pression** adéquate. Cette pression fait augmenter le potentiel chimique de l'eau jusqu'à la valeur du potentiel chimique de l'eau dans la solution diluée.

L'**osmose** est un phénomène d'importance capitale en biologie. Elle implique un **déplacement de volume ( $J_v$ ) par unité de temps due à un flux d'eau ( $J_{H_2O}$ ) de la région où l'eau est la plus concentrée vers la région où elle est moins concentrée**. La force conjuguée avec le flux osmotique d'eau ( $J_{H_2O} = J_v$ ) est la différence de pression osmotique,  $\Delta\Pi$ . Cette dernière est liée à la différence de concentration des solutions par l'expression  $\Delta\Pi = RT \cdot \Delta\text{osm}$ . Pour une membrane **semipermeable**, la relation force/flux est donnée par l'équation :

$$J_{H_2O} = J_v = P_{H_2O} \Delta\Pi = P_{H_2O} RT \Delta\text{osm}$$

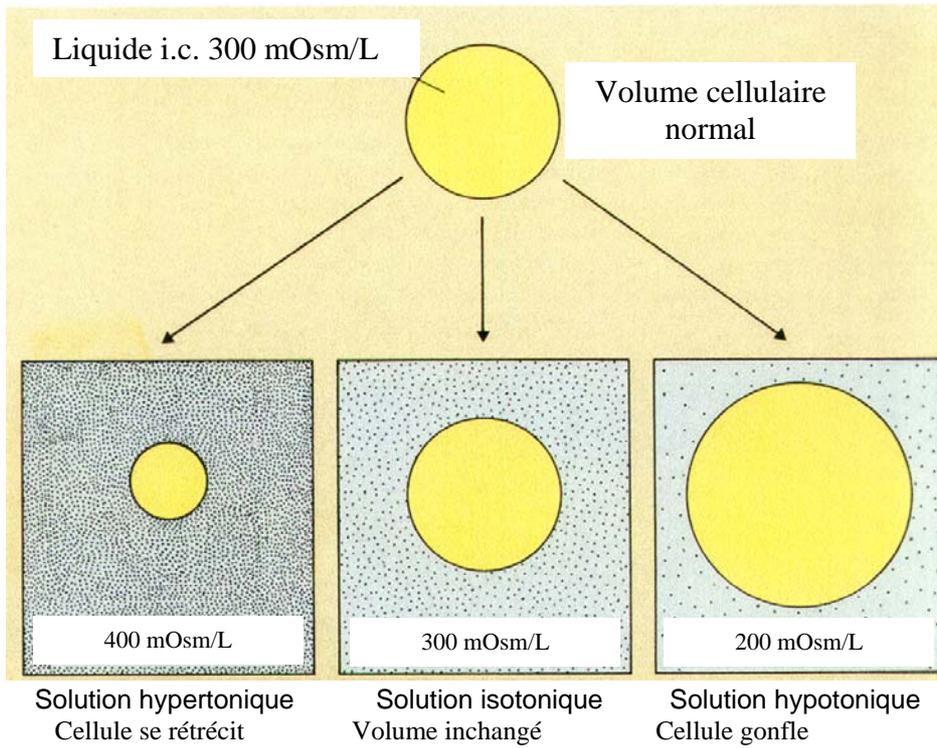
où  $P_{H_2O}$  est le coefficient de perméabilité à l'eau. Si la membrane laisse aussi passer le soluté, on parle alors de  $\Delta\Pi_{\text{effective}} = RT \sigma \Delta\text{osm}$ , où  $\sigma$  est le **coefficient de réflexion de Staverman**. On peut déterminer  $\sigma$  pour un soluté  $i$  et une membrane donnés à l'aide d'un dispositif permettant de *filtrer* une solution de  $i$  à travers la membrane en question (**Fig. 32**). On calcule  $\sigma$  à partir de l'expression  $\sigma = 1 - (C_f / C_i)$  où  $C_f$  est la concentration de  $i$  dans le filtrat et  $C_i$  la concentration dans le liquide initial. On voit aisément que  $\sigma = 1$  si  $C_f = 0$ , c.-à-d. la membrane *rejette complètement* le soluté  $i$ , et que  $\sigma = 0$  si  $C_f = C_i$ , c.-à-d. le soluté passe aussi facilement que l'eau. La différence de pression effective se mesure en appliquant, par l'intermédiaire d'un piston, une pression hydrostatique sur le compartiment le plus concentré en soluté (**Fig. 33**). En tenant compte de la *différence de pression hydrostatique*  $\Delta P$ , on arrive à une équation très générale, appelée **équation de Starling** :

$$J_v = K_f (\Delta\Pi_{\text{effective}} - \Delta P)$$

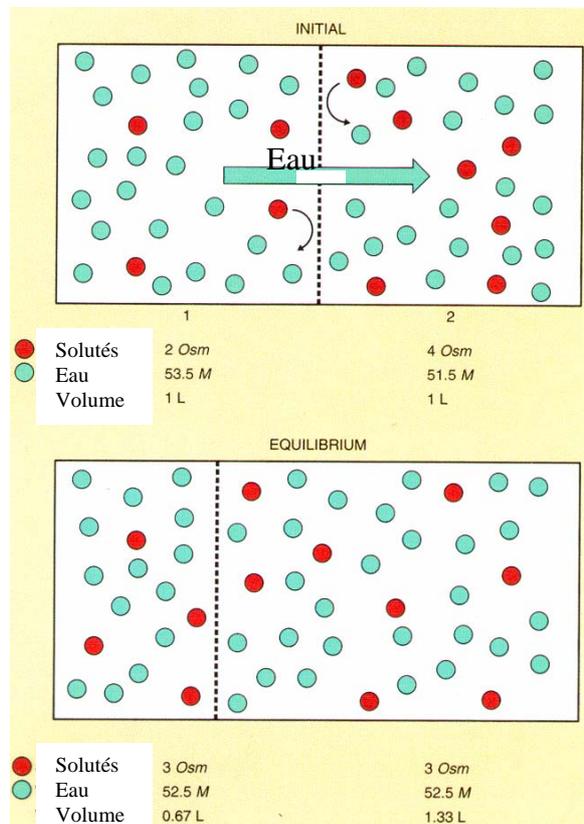
à partir de laquelle on peut déduire des équations plus simples ayant trait à des situations particulières. En effet, si  $\Delta\text{osm} = 0$  et  $\Delta P \neq 0$  alors  $J_v = K_f \Delta P$ , qui est l'équation du débit de filtration à travers une membrane en fonction de  $\Delta P$ . Si  $\sigma = 1$ ,  $\Delta\text{osm} \neq 0$  et  $\Delta P = 0$ , nous retombons dans l'équation du *flux osmotique* en fonction de  $\Delta\Pi$  à travers une membrane *semiperméable*, équation discutée ci-avant et où  $P_{H_2O} = K_f$ .

### Pression colloïdo-osmotique

Les protéines intracellulaires exercent une pression osmotique (dite *pression colloïdo-osmotique*), du fait qu'elles ne peuvent pas traverser la membrane plasmique; le flux d'eau dicté par cette pression devrait augmenter le volume intracellulaire jusqu'au point de rupture. Le volume cellulaire reste stable parce que la *pompe à Na<sup>+</sup>* expulse continuellement de la cellule un soluté osmotiquement très actif (*le Na<sup>+</sup>*) en échange d'un soluté osmotiquement moins actif (*le K<sup>+</sup>*). En effet, la membrane est plus perméable au K<sup>+</sup> qu'au Na<sup>+</sup>. Cet état stationnaire est rompu si l'on inhibe la pompe à Na<sup>+</sup> (par l'ouabaïne ou le froid, par exemple), situation dans laquelle les cellules gonflent. La cellule a cependant des moyens de contrer ces altérations de volume en activant plusieurs mécanismes de transport membranaire qui assurent efficacement l'homéostasie cellulaire.

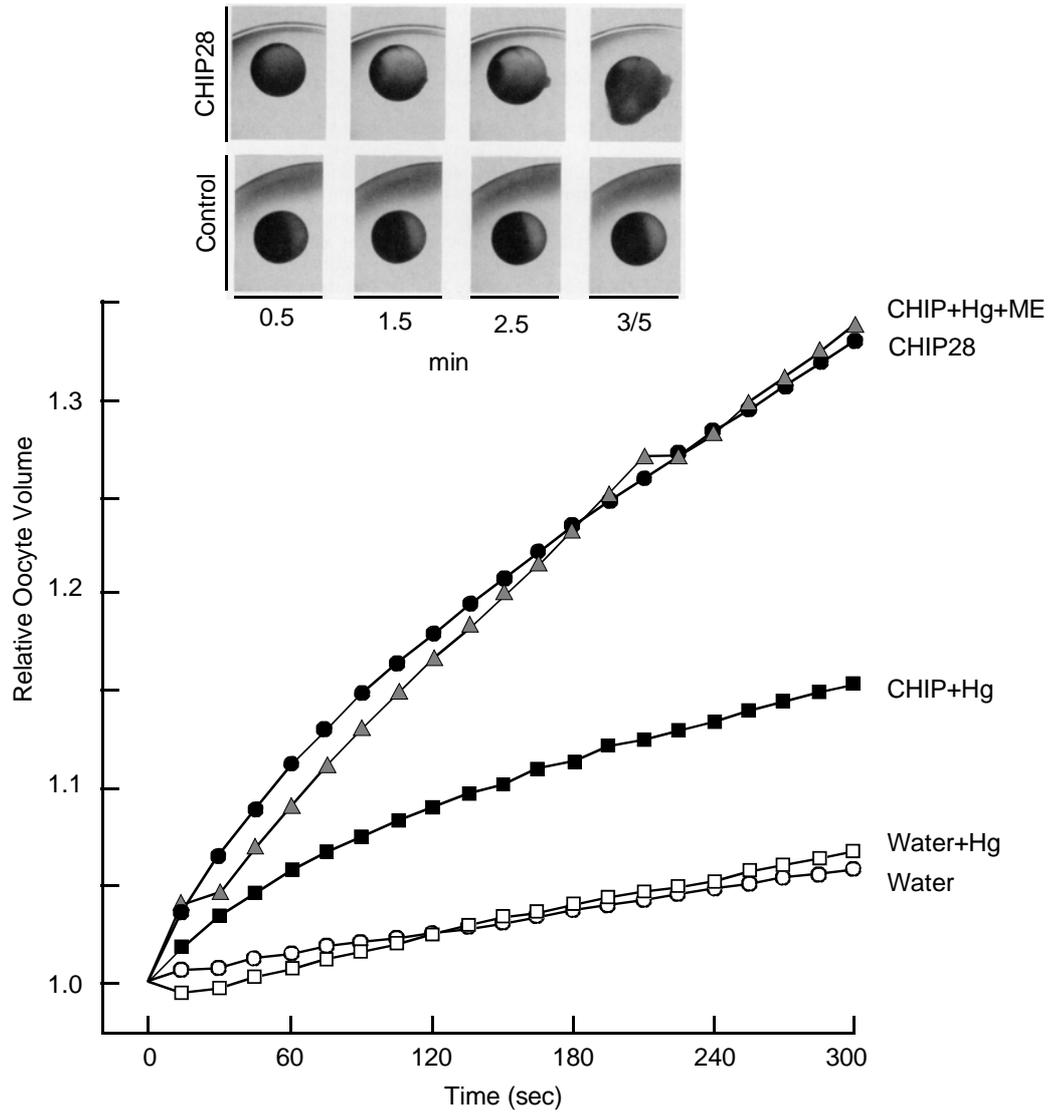


**Fig. 29** Changements de volume cellulaire en présence de différentes concentrations de solutés qui ne traversent pas la membrane

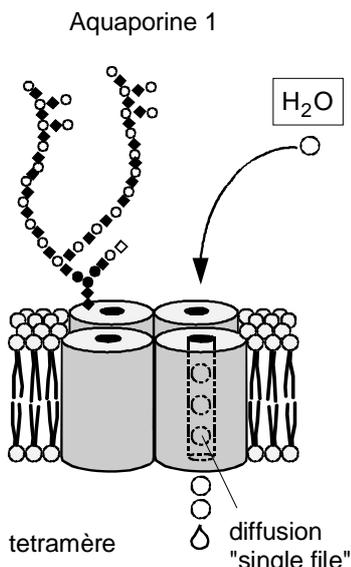


**Fig. 30** Déplacement d'une partition perméable à l'eau suite au flux d'eau

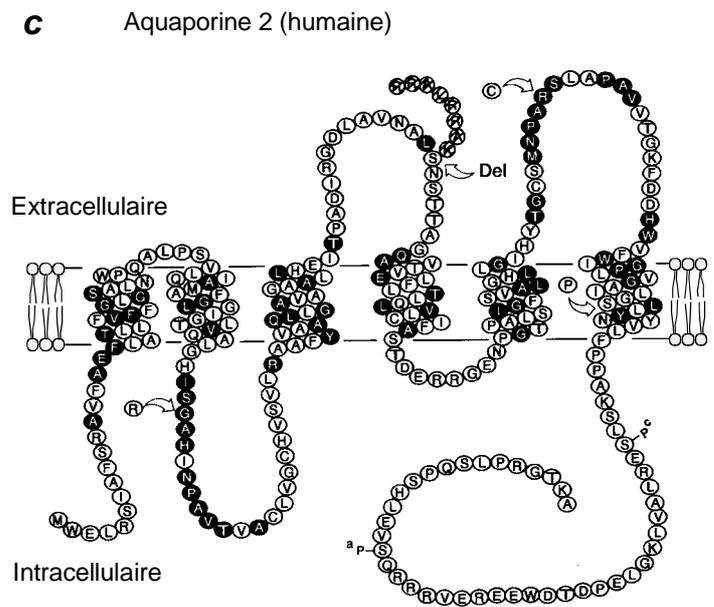
**a**



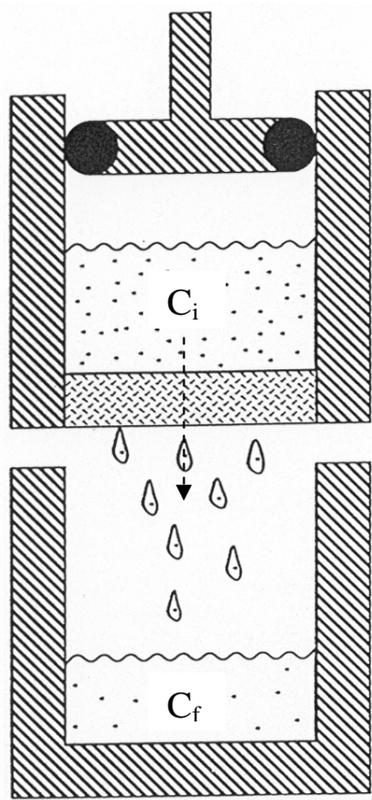
**b**



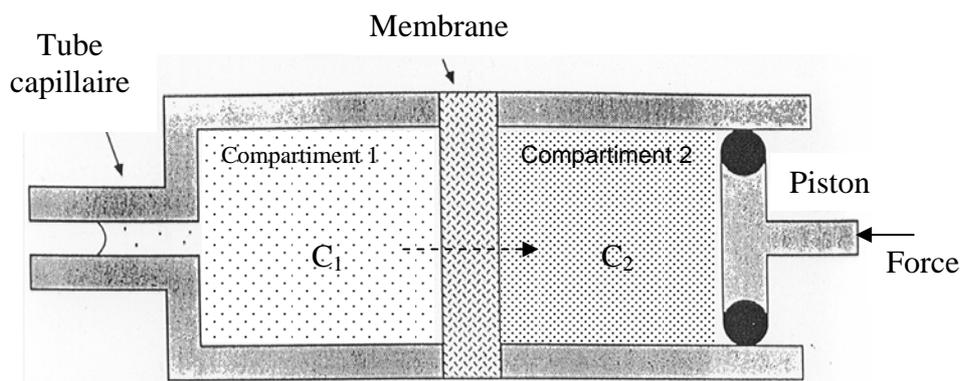
**c**



**Fig. 31** Gonflement d'un ovocyte exprimant l'aquaporine 1 (= CHIP28) dans une solution hypotonique



**Fig. 32** Filtration d'une solution de concentration  $C_i$ .  
Le réservoir contient le filtrat de concentration  $C_f$

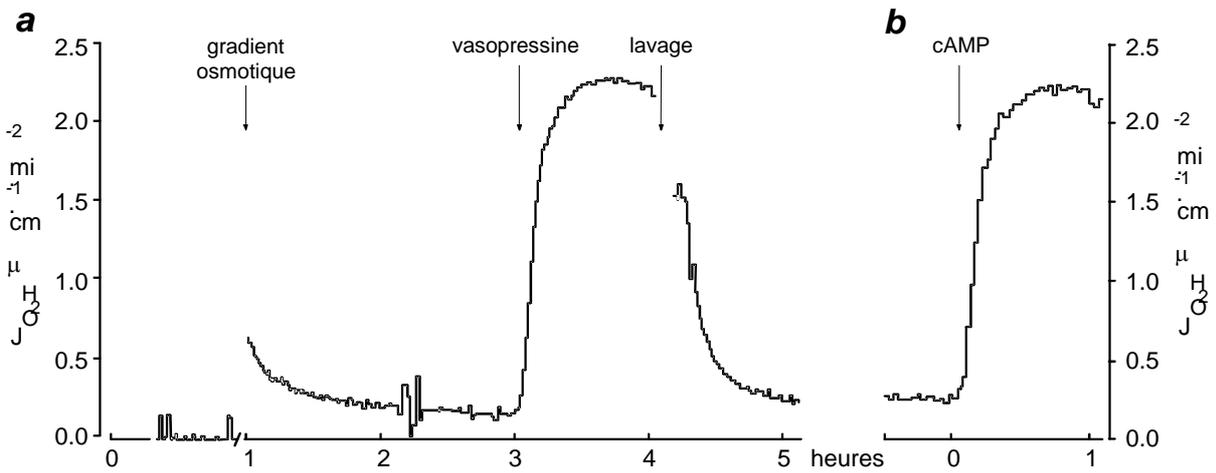


**Fig. 33** Le flux d'eau (flèche hachurée) augmente la pression dans le compartiment 2. La force exercée pour maintenir la position du ménisque (à gauche), divisée par la surface du piston, indique la pression osmotique.

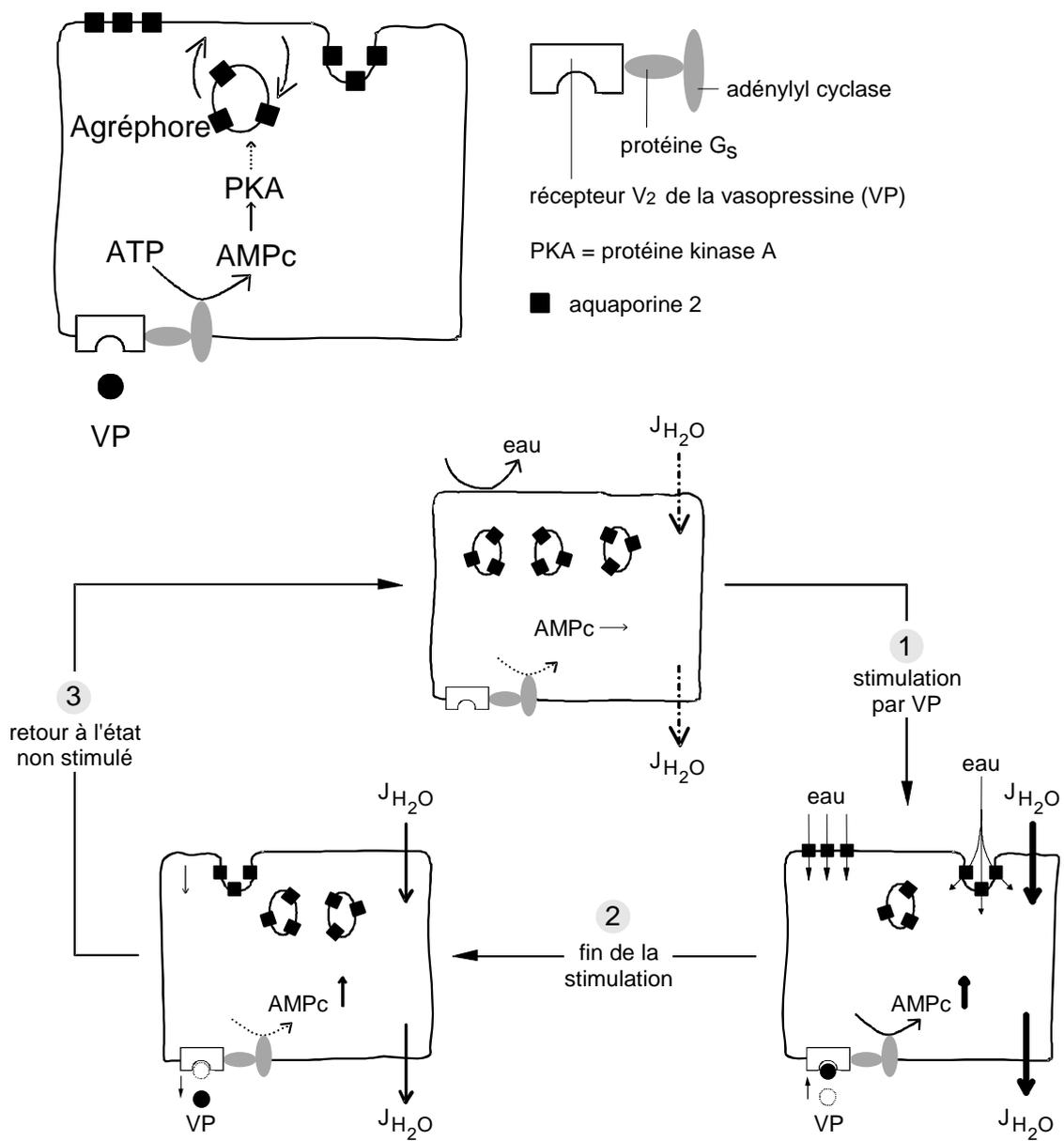
### Régulation du flux d'eau par la vasopressine

L'action de la vasopressine sur le tube collecteur du rein peut être étudiée *in vitro* à l'aide de deux modèles expérimentaux : *la vessie ou la peau de crapaud*. La **Fig. 34a** illustre une expérience effectuée avec une peau de crapaud (région ventrale). La peau est placée entre deux chambres et, dans une première période, les deux surfaces de l'épithélium sont baignées par la même solution physiologique (solution de Ringer) :  $\Delta\text{osm} = 0$ . Par conséquent  $J_{\text{H}_2\text{O}} = 0$ . Dans un deuxième temps, on dilue 10 fois le milieu baignant la face **externe** de l'épithélium : on constate alors la présence d'un flux d'eau, lequel est plutôt modeste eu égard au gradient osmotique relativement important ( $\Delta\text{osm} = 200 \text{ mOsm}$ ). Dans une troisième période, on ajoute de la **vasopressine** au milieu baignant la face **interne** de l'épithélium : on constate que  $J_{\text{H}_2\text{O}}$  augmente très fortement pour retomber à la valeur observée avant l'exposition à la vasopressine dès lors que l'on retire l'hormone de la solution interne (quatrième période). *Comment expliquer cette action de la vasopressine ?* Rappelons l'équation  $J_{\text{H}_2\text{O}} = P_{\text{H}_2\text{O}} RT \Delta\text{osm}$ . L'hormone a augmenté  $J_{\text{H}_2\text{O}}$  sans que  $\Delta\text{osm}$  ait changé, par conséquent, c'est  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  qui a augmenté sous l'effet hormonal. On sait aujourd'hui que la montée de  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  est due à une **translocation de canaux d'eau**, plus précisément de molécules d'**aquaporine 2**, induite par la vasopressine. La **Fig. 35** résume le mécanisme en question. Pour pouvoir agir sur une cellule, la vasopressine doit se lier à des *récepteurs* spécifiques. Cette liaison induit la production d'un *messenger intracellulaire*, l'**AMP cyclique**, lequel, par un mécanisme encore imparfaitement élucidé, provoque la **fusion** de vésicules cytoplasmiques sub-apicales avec la membrane apicale (phénomène d'**exocytose**). Ces vésicules contiennent dans leur membrane des molécules d'aquaporine 2, lesquelles, une fois insérées dans la membrane apicale, augmentent  $P_{\text{H}_2\text{O}}$ . Lorsque la vasopressine termine son action en quittant le récepteur, le taux d'AMP cyclique redescend, les aquaporines sont internalisées par un processus d'**endocytose**, et les vésicules sub-apicales se reconstituent. Dans ces conditions,  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  retourne à sa valeur initiale, très basse. L'insertion d'aquaporines correspond selon toute vraisemblance à l'apparition d'*agrégats de particules* détectables microscopiquement avec la technique du cryodécapage sur la membrane apicale de l'épithélium. En effet, il y a une excellente corrélation entre le nombre de ces agrégats par unité de surface et  $J_{\text{H}_2\text{O}}$ .

Le mécanisme de perméabilisation à l'eau (= **effet hydrosmotique**) de la vasopressine que nous venons de décrire est basé sur des observations effectuées dans les épithéliums d'amphibien ; un mécanisme *identique* sous-tend l'**effet antidiurétique** de la vasopressine (ou ADH) sur le tubule collecteur du rein. Des expériences réalisées avec ce tubule, *in vitro*, montrent une courbe sigmoïde classique lorsqu'on représente l'augmentation de  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  (ou de la production de AMP cyclique) en fonction de la concentration de vasopressine (**Fig. 36**). L'AMP cyclique joue un rôle de **messenger intracellulaire** de la vasopressine. C'est ainsi que l'adjonction de cette substance au milieu baignant la face interne de l'épithélium provoque une augmentation de  $J_{\text{H}_2\text{O}}$  identique à celle induite par l'hormone (**Fig. 34b**). Quant à la translocation d'aquaporine 2, une démonstration très convaincante de ce phénomène a été obtenue avec les cellules claires (ou principales) du tube collecteur (**Fig. 36c**). En effet, l'étude du nombre de particules d'aquaporine 2 détectées immunochimiquement dans la membrane apicale (MA) et dans la membrane des vésicules intracytoplasmiques (VI), a fourni les résultats suivants : (i) avant l'exposition à la vasopressine, l'aquaporine 2 *prédomine dans les vésicules subapicales* ; (ii) en revanche, pendant la durée de l'effet de l'hormone, c'est dans la *membrane apicale* que cette protéine est la plus abondante ; (iii) une fois l'action de la vasopressine terminée, l'aquaporine prédomine à nouveau dans les vésicules cytoplasmiques. Cela correspond dans ses grandes lignes au profil des changements de  $P_{\text{H}_2\text{O}}$  illustrés dans la partie gauche de la **Fig. 36c**.



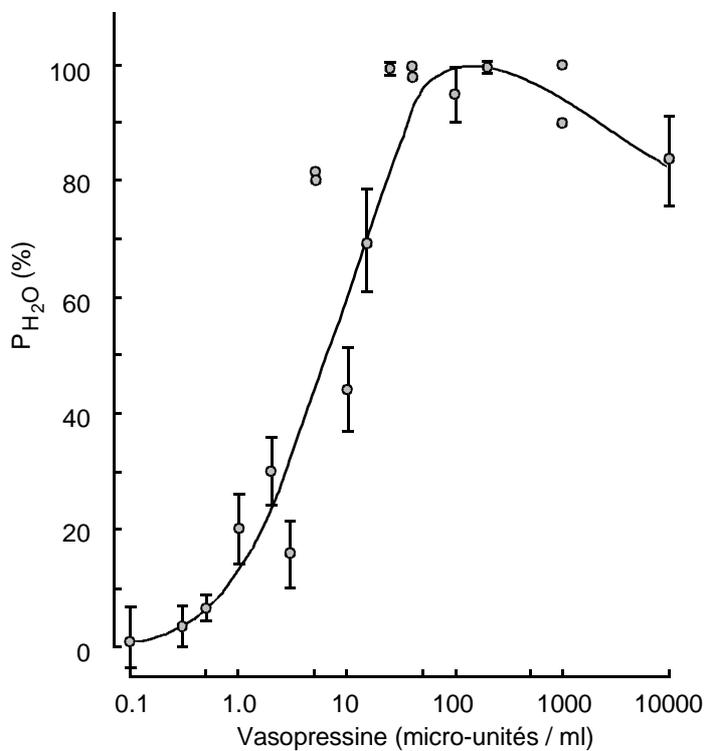
**Fig. 34**



**Fig. 35** Incorporation de canaux d'eau sous l'effet de la vasopressine

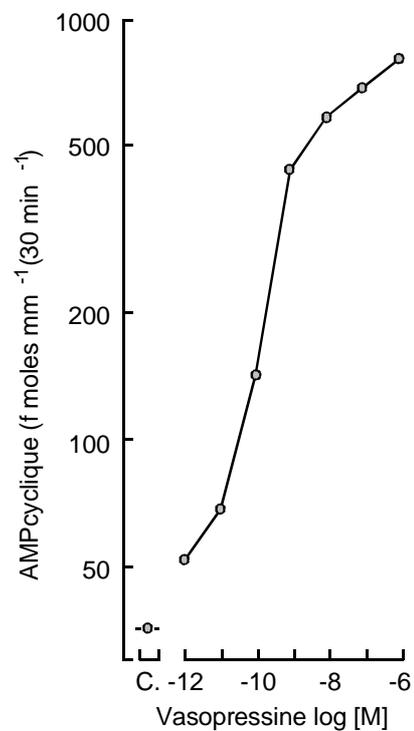
**a**

Augmentation de la perméabilité à l'eau



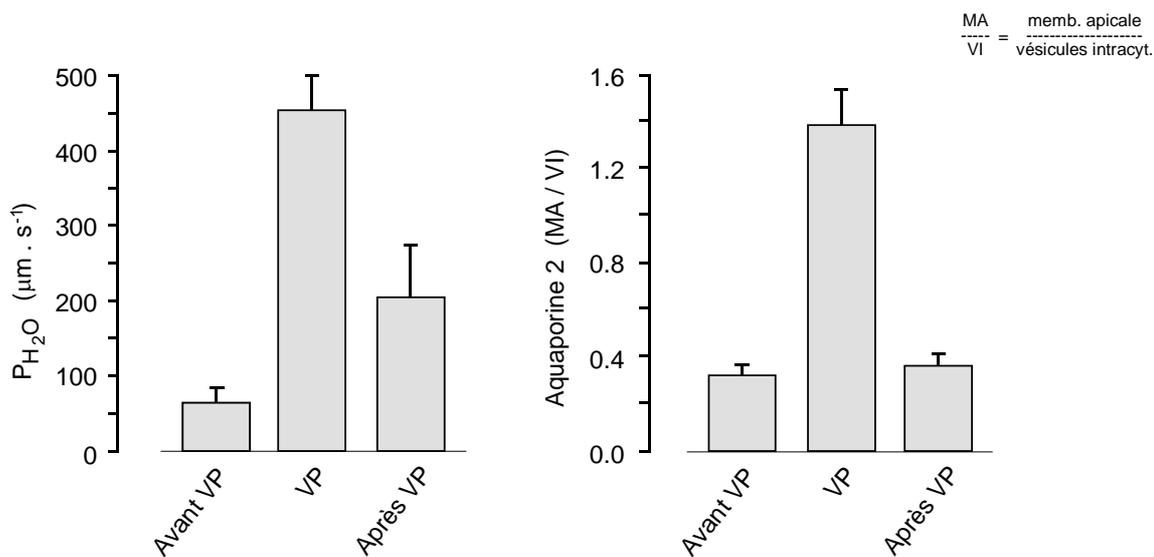
**b**

Production de messager secondaire



**c**

Translocation d'aquaporine 2



**Fig.36** Mécanismes de l'effet de la vasopressine sur la perméabilité à l'eau