

# Organisation moléculaire des membranes et des matrices extracellulaires en relation avec leurs rôles.

## A. Les membranes : des mosaïques fluides formant des barrières sélectives

### 1- Les membranes sont essentiellement lipidiques

#### a) Mise en évidence des propriétés hydrophobes des membranes

- **Overton 1899** sur algues unicellulaires montre que la diffusibilité d'une substance à travers l'enveloppe cellulaire est d'autant plus grande que la substance est plus hydrophobe

#### b) Étude chimique des membranes

- Matériel d'étude : sur hématies (biconcaves) éclatées en milieu hypotonique (pas de paroi protectrices contre le phénomène de turgescence poussée)

- Extraction et séparation moléculaire sur les "fantômes" (membranes seules)

- 70% eau

- matière sèche : distinction par colorants spécifiques

- **lipides** : 40% (phospholipides polaires, stérides rigides, glycolipides antennaires du **glycocalyx**);

- **protéine** : 60 % (mais il y a une protéine pour 75 molécules de lipides) structurales, de reconnaissance (dont protéine glycosylées du glycocalix), à activité spécifique comme les enzymes...

- **ions** ( $\text{Ca}^{2+}$  stabilisateur,  $\text{Mg}^{2+}$  cofacteur de l'ATPase...)

### 2- Les membranes sont des bicouches autoréparatrices

#### a) Première expérience historique mettant en évidence les propriétés des lipides

Benjamin Franklin (1774) = verse une tasse (5 ml) d'huile d'olive à la surface de l'eau. Il observe que les petites vagues se calment sur un demi acre (=2023m<sup>2</sup>) ce qui lui permet de calculer l'épaisseur d'une couche d'huile : couche monomoléculaire.

- Les propriétés "calmantes" sont dues à la diminution des forces de tension (remplace liaisons hydrogènes par forces de Van der Waals)

#### b) Les agrégats lipidiques se disposent spontanément en micelles, bicouches ou liposomes

- Pas de formation de micelles tant qu'une concentration critique (cmc) n'est pas dépassées (pour le dodécyl sulfate employé pour les électrophorèses en conditions dénaturantes, par ex., et qui n'a qu'une unique queue courte, c'est environ 1mM; pour les composants biologiques, c'est <math>10^{-6}\text{M}</math>)

- Les lipides à queue simple ont tendance à former des micelles. qq centaines de molécules (variations faibles). ex. : pour les savons anioniques

- Les glycérophospholipides et glycolipides dérivés de la sphingosine ont tendance à former des bicouches du fait de la présence d'une double queue  $\Rightarrow$  forme  $\pm$  rectangulaire

- L'épaisseur attendue est de 6 nm, lorsque les queues sont étendues (vérifié par observation au microscope électronique et par diffraction aux rayons X)

- Les liposomes : une bicouche lipidique en forme de vésicule
- Des phospholipides en solution dans l'eau présentent des vésicules multilamellaires organisées comme un oignon. Après sonication (coupure par vibrations aux ultrasons), ces structures se réarrangent en liposomes = structure close, autofermante, remplies de solvant, recouvertes d'une unique bicouche,  $\varnothing$  qq 10 nm (pour  $\varnothing > 100$ nm, possibilité d'injecter dans l'eau)
- Les liposomes sont stables et peuvent être séparés de leur milieu initial par dialyse, gel filtration ou centrifugation

### **c) Première expérience historique mettant en évidence l'organisation en bicouche des membranes des cellules**

E. Gorter et F. Grendel (1925) observent que des extraits à l'acétone de fantômes d'hématies répandus sur un film monomoléculaire à la surface d'un plan d'eau, ils occupent une surface double de la surface initiale des hématies = bicouche

- Conclusion : la structure en bicouche constitue la base de l'organisation des membranes biologiques

- Les membranes biologiques sont des liposomes associés à des protéines; les liposomes artificiels ont été intensivement étudiés comme modèle de membrane
- Liposomes : prometteurs pour délivrance de substances thérapeutiques

### **3- Les membranes réalisent des barrières hémiperméables**

#### **a) Méthode**

- Réalisation de liposomes contenant la substance d'intérêt puis mesure du taux de libération de cette substance après avoir placé le liposome dans un autre milieu

#### **b) Modélisation physique**

- L'étude de bicouches lipidiques artificielles permet de déterminer les substances diffusant librement selon la loi de Fick à travers une bicouche: la mesure du Flux net.
- Définition du flux : débit en un temps donné à travers une surface donnée

$$F = \text{volume d'eau passée} / \text{Temps donné}$$

La valeur de référence se fait en absence de membrane : on parle de diffusion libre

$$Fd = \text{Coefficient de diffusion libre} \times S \times (C_2 - C_1)$$

#### **c) Résultats**

- En général, le coefficient de diffusion à travers une membrane diffère du coefficient de diffusion libre
- Les molécules qui traversent sont :
  - molécules lipophiles même de taille importante (stéroïdes)
  - petites molécules polaires ( $\ll 100$  Dalton) non chargées : eau, urée, glycérol
  - ne passent pas ou très peu : les ions, les molécules chargées ou les grosses molécules polaires, même non chargées

## 4- Les membranes sont fluides

### a) Mise en évidence de la fluidité membranaire

1970

#### - Méthode :

- Expérience de **patching**

#### - Matériel d'étude :

- Réalisation de cellule hybrides (chimère) souris/homme grâce à virus de Sendai (rend possible la fusion membranaire) inactivé (rendu non pathogène). On fournit des anticorps antiSouris et antiHomme marqués différenciellement (fluorescents à la rhodamine en rouge et fluorescéine en vert par ex.).

#### - Résultats :

- Au bout de 5 min. les deux cellules ont fusionné en une chimère qui est marquée moitié/moitié;

- au bout de 50 min. les marques sont mélangées de manière homogène sur toute la chimère

Interprétation : les molécules de membrane sont mobiles

### b) Notion de fluidité membranaire

- les lipides sont mal liés entre eux par des forces hydrophobes (queues d'acides gras oscillent autour de doubles liaisons).

Les forces hydrophobes sont des interactions non orientées induites par la tendance de l'eau à maintenir des liaisons hydrogène avec elle-même. En minimisant la surface de contact avec les lipides (qui ne réalisent pas de liaison H avec l'eau donc qui en rompent), l'eau est thermodynamiquement plus stable.

- Le cholestérol est stabilisateur (cf ci-dessous) : augmente la résistance mais diminue la fluidité

- les protéines sont enchassées (comme des icebergs) face ext, int ou transverses et liées par interactions hydrophobes avec leurs résidus hydrophobes d'acides aminés de surface. Celles qui sont regroupées ou solidaires du complexe sous membranaire sont moins mobiles (liaisons ioniques ou covalentes, hélices hydrophobes/domaines transmembranaires) et répondent aux sollicitations mécaniques intracellulaires

- Lorsque la température augmente, la fluidité augmente et les protéines sont plus déformables (car moins bloquées par les lipides) ce qui augmente leur activité

### c) Fluidité et renouvellement moléculaire

- Définition de demi-vie : temps au bout duquel 50% des molécules ont été renouvelées

- Méthode : Expérience de marquage avec ligands : **capping**

- Résultat : 8 jours (en partie grâce au phénomène d'exocytose)

### d) Des fluides à 2 dimensions

#### d1) La diffusion transversale est très lente

- "flip-flop" de la face ext vers la face int et inversement

- demi-vie = plusieurs jours

- il existe flippases (du REL notamment) qui permettent cette translocation (par un domaine hydrophobe central) lors de synthèses de novo (face cytoplasmique, permet translocation de certains phospholipides mais pas sphingolipides par ex)

#### d2) La diffusion latérale des lipides est très rapide

- Mise en évidence par méthode de blanchiment d'un fluorochrome fixé sur la membrane d'une cellule immobilisée, par un rayon laser puissant sur une très petite surface ( $3\mu\text{m}^2$ )

(photobleaching); on mesure la vitesse à laquelle la fluorescence revient = vitesse à laquelle les molécules de fluorochrome détruites sont remplacées latéralement par des molécules proches non détruites. Parcourent  $1\mu\text{m}$  en 1s

### **d3) La fluidité latérale des membranes varie avec la température**

#### **- Transition ordre/désordre la bicouche**

- Quand les queues aliphatiques sont orientées toutes dans un sens et pas dans un autre.
- Sous une certaine température dite de transition, les membranes se comportent comme un gel solide.
- Au dessus de cette température, l'organisation est considérée comme organisée (analogie avec le réseau cristallin) mais fluide (terme de cristal liquide)

#### **- La température de transition augmente avec la longueur des chaînes et le degré de saturation des résidus d'acides gras**

- La température de transition de la plupart des membranes biologiques se situe entre 10 et  $40^\circ\text{C}$
- La température de transition chez les mammifères est bien en dessous de la température du corps donc assure la fluidité membranaire
- Certains organismes (bactéries comme E. Coli de  $15$  à  $43^\circ\text{C}$  conserve même fluidité, poïkilothermes, poissons...) peuvent modifier la composition de leur membranes en fonction de la température afin de conserver la même fluidité membranaire

#### **- Le cholestérol diminue la fluidité membranaire**

- Ne constitue pas de bicouche à lui seul
- son noyau stérol interfère avec le mouvement des chaînes aliphatiques des autres acides gras
- En grande quantité, peut abolir la température de transition = "plasticien" des membranes

NB : Les gaz anesthésiants, qui sont rejetés inchangés, semblent modifier les membranes (d'autant plus efficace que plus liposolubles) et donc empêcher le passage de l'influx nerveux dans les cellules nerveuses qui sont les plus sensibles

## **5- Les membranes sont asymétriques**

### **a) Asymétrie dans la répartition des constituants chimiques**

#### **b) Asymétrie dans la répartition des protéines**

##### **- Méthodes d'étude**

##### **- au microscope électronique**

car la membrane est invisible au microscope optique ( $7,5\text{ nm} = 75\text{ \AA} < 1\mu\text{m} = 1000\text{ \AA} =$  pouvoir séparateur du microscope optique)

Nécessite fixation par sels de métaux lourds ( $\text{OsO}_4$ ) et déshydratation puis inclusion dans résine époxy (rigidifie) et coupes (tranches fines d'environ  $1\mu\text{m}$ )

- **Par cryodécapage** (congélation dans l'azote liquide à  $-192^\circ\text{C}$ ; clivage selon zones de moindre résistance, réplique, ombrage au platine avec angle  $30^\circ$ , consolidation au carbone, coulage de résine et digestion des tissus restant par acides HF) et observation au hasard des coupes

- Par diffraction aux rayons X permet de visualiser l'aspect tridimensionnel des molécules (précision environ  $0,1\text{ nm}$  soit longueur d'une liaison covalente)

##### **- Résultat :**

- bicouche lipidique; les protéines sont globulaires, intrinsèques ou extrinsèques asymétriques (cf. diffraction aux rayons X) (à fonctions précises; élucidé par l'usage de détergents)

### 6- Les membranes peuvent être spécialisées

- Elle permet la différence cellule-milieu mais laisse se réaliser des échanges (que l'on étudiera plus tard)

#### a) Des réseaux de membranes +/- polarisés

- Dans la cellule du pancréas exocrine :
  - REG très abondant pôle basal
  - noyau, mitochondries et golgi en position central
  - granules internes (grains de zymogène ou vésicules d'endocytose) côté apical
- Dans la cellule végétale :
  - une grosse vacuole centrale
  - noyau, mitochondries et chloroplastes rejetés à la périphérie
  - dans de fins tractus cytoplasmiques
  - lieu d'une cyclose adéquate entre l'intensité de l'ensoleillement et la position des chloroplastes
- En général, ces cellules différenciées dérivent d'une cellule indifférenciée ou souche qui présente une forme subsphérique avec un gros noyau central et des organites peu différenciés
  - pas de grosse vacuole mais un vacuole constitué de très petites vacuoles et des proplaste pour la cellule végétale,
  - pas de polarisation nette des organites pour la cellule animale.

#### b) Des systèmes jonctionnels

- ex. des cellules épithéliales animales
- passe par un équipement moléculaire plus ou moins spécialisé
  - Résistance :  
ZA, Desmosomes, hémidesmosomes
  - Souplesse :  
interdigitations
  - Imperméabilité :  
Z.O.
  - Adhérence et reconnaissance :  
CAM, NAM etc. et glycocalyx

#### c) Des passages directs

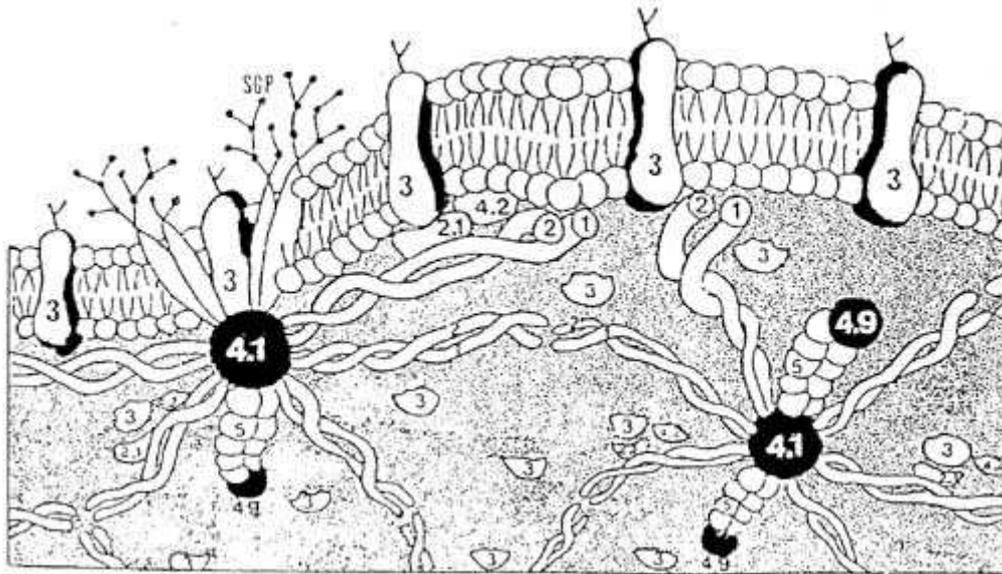
- b1) Les jonctions communicantes ou lacunaires ou gap junctions*
- b2) Syncytium du parenchyme palissadique*
- plasmodesmes : laisse passer molécules dont poids moléculaire max. = 800 à 1000 D
  - structure : desmotubules et prot de l'annulus
  - rôle dans transport prot (un peu équivalent à celui des gap-jonctions mais Ø 7 nm) et ARN
  - Arrêt de continuité avec les tissus épidermiques d'une part et vasculaires (ou endoderme, dans la racine) d'autre part (passage par la voie apoplasmique obligatoire)
  - contact membrane / paroi pectocellulosique par synthèse membranaire continue des fibres de cellulose (et exocytose de pectines)

#### **d) Des équipements protéiques à activité spécifique**

- D'autres protéines jouent un rôle de structure

Ex : fantôme d'hématie

Les hématies des mammifères sont des cellules anucléées, biconcaves et discoïdes de 7 µm de diamètre. Elles sont caractérisées par une grande déformabilité liée à une élasticité importante leur permettant de circuler dans les capillaires les plus fins et de retrouver leur forme d'origine dans les vaisseaux. Un réseau protéique sous-membranaire, le cytosquelette, lié à la membrane plasmique par des points d'ancrage au niveau de certains constituants membranaires contribue à ces propriétés (Fig. 9).



**Ensemble cytosquelette-membrane du globule rouge** (d'après Delaunay & Boivin, 1990).

**1 et 2:** Spectrine alpha et bêta; **2.1:** ankyrine; **3:** bande3; **4.1:** protéine 4.1; **4.9:** protéine 4.9; **5:** actine; **SGP:** sialoglycoprotéines: glycophorines A, B, C.

La membrane plasmique de l'hématie est constituée de deux feuillets monomoléculaires de phospholipides dans lesquels sont insérées de nombreuses protéines. La protéine majeure de la membrane érythrocytaire est la bande 3 ou canal anionique dont la fonction principale est le transport d'anions ( $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ) (Kopito & Lodish, 1985). Elle sert aussi de point d'ancrage au cytosquelette et à certaines protéines cytoplasmiques (hémoglobine, aldolase...). Un autre groupe de protéines membranaires important auxquelles le cytosquelette est amarré est constitué par les glycophorines A, B et C, porteuses des déterminants antigéniques des groupes MN et Ss (Furthmayr, 1978).

Le cytosquelette sous-jacent à la membrane est constitué majoritairement de spectrine représentant environ 75% de la masse protéique, d'actine et de protéine 4.1 (Sweetz, 1979). De façon schématique, le cytosquelette se présente comme un filet à mailles en majorité hexagonales mais aussi pentagonales voire octogonales dont les côtés sont constitués de spectrine et dont les noeuds sont composés de protéines 4.1 et d'actine (voir revue Palek & Sahr, 1992) (Fig. 9). La spectrine, dimère composé d'une chaîne alpha (Sahr *et al.*, 1990) et d'une chaîne bêta (Winkelmann *et al.*, 1990) est présente dans la membrane érythrocytaire sous forme de tétramères résultant de l'association de deux hétérodimères alpha/bêta. Chaque hétérodimère de spectrine fixe deux molécules de protéine 4.1 (Cohen *et al.*, 1980; Tyler *et al.*, 1980) dont la présence favorise nettement la fixation de l'actine sur l'hétérodimère alpha/bêta (Cohen & Langley, 1984). L'actine (bêta-actine) existe au sein du cytosquelette sous forme de protofilaments constitués de 12 à 18 molécules d'actine monomérique (Lin & Lin, 1979) et est associée à trois protéines mineures:

- la dématine ou protéine 4.9 qui régulerait le processus d'élongation des filaments d'actine. Cette activité serait entièrement contrôlée par l'état de phosphorylation AMPc-dépendant de la protéine 4.9 (Siegal & Branton, 1985),

- la tropomyosine et l'adducine qui exerceraient un effet régulateur sur l'association entre la spectrine et les filaments d'actine (Bennett, 1989).

L'un des plus importants systèmes d'ancrage du cytosquelette à la membrane est constitué par des interactions spectrine-ankyrine-bande 3. L'ankyrine se fixe sur la chaîne bêta de la spectrine avec une forte affinité à raison d'une molécule d'ankyrine pour une molécule de tétramère alpha2bêta2 (Goodman & Weidner, 1980; voir revue Bennett & Gilligan, 1993). La liaison entre l'ankyrine et la bande 3 s'effectue avec une affinité encore plus forte et une stoechiométrie de 1:1 (Hargreaves *et al.*, 1980; voir revue Bennett & Gilligan, 1993). Les nombreuses associations de la protéine 4.1 avec les fragments cytosoliques des glycophorines (Anderson & Lovrien, 1984) et de la bande 3 (Lombardo *et al.*, 1992), les complexes glycophorine A-polyphosphoinositol et les phosphatidylsérines de la bicouche lipidique (voir revue Pinder *et al.*, 1992) stabilisent le cytosquelette à la membrane érythrocytaire.

- Des transporteurs : de photons, d'électrons, de protons, d'ions, d'eau

- Des canaux (cf. deuxième année)
- Des enzymes cf. ATPsynthétases des crêtes mito ou thylakoïdes des CP ou du tonoplaste dont les inhibiteurs sont spécifiques; cellulose synthétase de membrane plasmique des cellules végétales, phosphorylases du Golgi,

### Bilan : Modèle membranaire de mosaïque fluide

- de Singer et Nicolson 1972 = barrière souple et déformable mais étanche aux composés hydrophobes, résistante et autoréparatrice

**Limite de la notion de membrane plasmique** : certains composants de la matrice extracellulaires sont des macromolécules adsorbées par le glycocalyx...

**CONCLU** : la membrane peut donc :

- assurer des échanges orientés :
  - choix des molécules hydrophile/hydrophobe et
  - affinité pour les protéines de transport;
  - sens du passage int / ext ou inversement..),
- recevoir des messages
- participer à des réactions (ATPase membranaires, enzymes du Golgi etc...)

## B/ Les matrices extracellulaires : des exosquelette fibreux turgescents

### 1- La matrice extracellulaire des cellules animales assure cohésion et échanges avec le milieu interne

#### a) Des fibres plus ou moins réticulées

##### - Fibres de collagène

- dimensions : 1,5 X 300 nm
- PM 300 kD
- Synthétisées (exocyté) par fibroblastes à partir de tropocollagène : triple hélice gauche enroulée droite cf cours SIV des prot
- riche en acides aminés type hydroxyproline et hydroxylysine. Polymérisation extracellulaire en place par pontage covalent entre hydroxyl.
- Possibilité d'incrustation de  $Ca^{2+}$  et rigidification (osseuse) par ostéoblastes et ostéocytes

##### - Fibres d'élastine.

- chaînes en hélices élastiques
- pontées par desmosine
- Glycoprotéines adhésives
- Fibronectine ou fibrilline;
- laminines de la basale, nidogène (ou tenascin embryonnaire)

#### b) Une substance fondamentale turgescente

- Substance fondamentale amorphe synthétisé par les cellules = gel semi fluide d'acides uroniques (longues chaînes de disaccharides aminés chargés négativement qui attirent l'eau et sont donc turgescents; associés par liaisons covalentes forte S-S avec des chondroïtineS, dermatanS et kératine S, ou de façon non covalente avec des acides hyaluroniques sans S)

#### c) Cas de la (lame) basale

- Allure : 3 couches :
  - lamina lucida 10 à 50 nm

- lamina densa 20 à 300 nm
- lamina fibroréticularis à colagène III
- Rôles de la lame basale :
  - perméabilité régulée par filtration par GAG associés par 2 à 15 sur protéoglycanes
  - contrôle de croissance et différenciation

## 2- La paroi pectocellulosique des cellules végétales permet un état turgescent constitutif

- Discuter par rapport aux parois des mycètes contenant chitine (glucides aminés), et des bactéries (peptidoglycanes à muréines et oligopeptides)

### a) La lamelle moyenne commune à deux cellules adjacentes

- Uniquement pectique
- Mise en place par exocytose golgienne
- Mise en place des plasmodesmes par fusion des vésicules golgiennes : phragmoplastes, dans le plan mitotique, piégeant les desmotubules. Nombreux environ  $10^6$  au  $\text{mm}^2$
- Il existe mise en place secondaire ex greffe de tissus
- Fonction : intégration pluricellulaire
  - par passage de dépolarisation membranaire directe. Ex développement d'une spore de fougère destinées à donner un prothalle. Au stade 3 cellules, si on rompt les plasmodesmes par du  $[\text{CaCl}_2]$  0.2M 30min, évolue en 3 prothalles distincts au lieu d'un seul.
  - Compartimentation par tri moléculaire en fonction de la taille ex malate passe, PEPcarboxylase ne passe pas

### b) La paroi primaire : un matériau composite résistant mais extensible

#### - Composition :

25-30% de cellulose,

15-25% hémicellulose,

35% pectines,

5-10% (du poids sec) glycoprotéines riche en hydroxyproline (HPRP :

Hydroxyproline riche protéine) ex. : **extensine**. La composition moléculaire précise dépend des tissus et de l'espèce. Rôle de l'extensine : bloque croissance cellulaire par pontages interchizines. Lors de réception de message de croissance (ex. auxine), le pH pariétal chute ce qui rompt les liaisons H interchaines de cellulose et il y a exocytose de d'hydroxyprolases qui rompent les HRGP, l'ensemble associé à une augmentation de pression de turgescence permet la reprise de l'agrandissement cellulaire.

- cellulose très stable chimiquement et insoluble, en microfibrilles de 3 nm Ø (cristal), résistant à la contrainte si // à l'axe (liaisons hydrogène)

- matrice = pectines et hémicellulose (// cellulose et recouvre la surface des microfibrilles) en phase amorphe, associé par liaisons ioniques  $\text{Ca}^{2+}$

- L'ensemble forme un matériau composite très résistant, comme le béton ou les fibres de verre

- Mise en place : à partir de précurseurs UDPGlucose grâce à celluloses synthétases (8 sous-unités) guidées par microtubules tous parallèles et se déplaçant dans l'épaisseur de la bicouche grâce à fluidité membranaire.

- Couches de cellulose successives orientées différemment dans chacun des plans

### c) La paroi secondaire : un matériau renforcé mais inextensible

- Composition : contient toujours HRGP, beaucoup moins de pectines et beaucoup plus de cellulose mieux organisée mais aussi parfois, incrustation de polyphénols comme la **lignine** 15-35%. C'est le degré d'organisation de la cellulose dans la paroi qui caractérise la paroi secondaire
- Résistance équivalente à celle d'un fil de fer de même diamètre (15 à 20 kg / mm<sup>2</sup>)
- Quand la paroi s'épaissit, de nombreux plasmodesmes sont rompus. Ils restent alors surtout abondants dans des zones plus minces comme les ponctuations.

**BILAN : Origine mixte (intracellulaire et membranaire) des matériaux de la paroi**