

Problématique	Méthodologie	Résultats- Observations	Conclusion
Comment se fait l'intégration des protéines dans le Réticulum Endoplasmique ?	On synthétise un ADNc codant pour une protéine radioactive s'intégrant en temps normal dans le RE. On fait 2 cultures.	On effectue une centrifugation. La protéine est marquée à la radioactivité. Comme le RE est plus dense que le cytosol, il se situe dans le culot, le cytosol dans le surnageant	Les protéines sont incapables de s'intégrer dans le RE après la fin de leur traduction pour des ribosomes libres. <u>L'intégration dans la membrane du RE pour des protéines transmembranaires est donc co-traductionnelle</u> et ce par des ribosomes associés à la membrane du RE.
	Culture A : On retire les réticulums de la cellule. On enclenche la synthèse protéique par des ribosomes libres , on rajoute les réticulums ensuite	La radioactivité se situe dans le surnageant	
	Culture B : Culture témoin, avec les réticulums. La synthèse s'effectue par des ribosomes associés au réticulum (REG)	La radioactivité se situe dans le culot	
Est ce que les deux protéines ont la même structure, lorsqu'elles sont synthétisées en présence ou sans RE?	On récupère les protéines et on effectue une électrophorèse sur PAGE-SDS qui permet une migration en fonction de la taille seulement .	La protéine cytosolique (Culture A) migre plus loin que la protéine synthétisée avec le RE (Culture B). Ces deux protéines ont cependant été synthétisées à partir du même ADNc, mais la protéine A est plus lourde .	La protéine du RE a été maturée par le RE. On SUGGERE que les protéines transmembranaires contiennent un peptide signal clivé lors de l'insertion co-traductionnelle.
Le peptide signal est-il nécessaire à l'intégration dans le RE ?	In vitro, on supprime au niveau de l'ADN la séquence qui code pour le peptide signal. On effectue la traduction en présence du REG	Les protéines synthétisées restent cytosoliques	Le peptide signal est donc nécessaire à l'intégration dans la membrane du RE.
Le peptide signal est-il suffisant à l'adressage co traductionnelle?	On utilise l'ADNc de la GFP (protéine non membranaire qui ne possède donc aucune propriétés pouvant l'aider à être adressée dans le RE). On crée in vitro un hybride avec un peptide signal.	La fluorescence se situe dans le cytoplasme et non dans le réticulum endoplasmique	Le peptide signal est suffisant à l'insertion co traductionnelle.
Quelle est la différence entre une protéine soluble dans le RE et une protéine insérée dans la membrane du RE?	On utilise notre GFP hybride soluble dans la lumière du RE et une protéine X dans la membrane du RE Protéine Soluble (GFP) On compare 4 électrophorèses a) La protéine + RE seule b) La protéine + RE avec une peptidase seule c) La protéine + RE avec un détergent seul d) La protéine + RE avec une peptidase + un détergent	On observe pour les Exp a) et b) une protéine à la même hauteur. On émet plusieurs hypothèse : 1) La peptidase est trop vieille et ne fonctionne pas 2) La protéine (GFP) est très résistante à la peptidase 3) La GFP se trouve enfermée dans le RE et la peptidase ne lui est pas accessible.	L'Exp c) donne le même résultat que les E a) et b) le détergent n'a donc pas d'action sur la GFP. L'Exp d) ne révèle aucune trace de protéines. Il y a donc eu digestion par la peptidase de la GFP. Ceci invalide les hypothèses 1) et 2). Le détergent est nécessaire pour détruire la membrane plasmique et rendre accessible à la protéase la GFP, complètement soluble dans la lumière du RE.
	Protéine membranaire. Même protocole.	L'Exp b) révèle la présence d'une protéine plus petite que dans l'E a)	Les protéines membranaires sont intégrées dans la membrane du RE laissant une partie extra réticulum.
	Cela permet de définir une deuxième séquence qui implique l'arrêt de transfert de la protéine à travers la membrane, c'est la séquence stop transfert . Conclusion : Les protéines transmembranaires ont une séquence signal et une séquence stop transfert		