

1^{ère} expérience :

On a une protéine du réticulum endoplasmique qui est codée par un gène. On synthétise notre gène dans un tube à essai. On met notre ADNc qu'on couple à un précurseur radioactif pour pouvoir visualiser notre protéine (souvent méthionine marquée à l'isotope radioactif ³⁵S). On fait ensuite une centrifugation différentielle et on récupère la fraction microbody (contenant des fractions du RE). On mélange alors les RE et les protéines synthétisées, on recentrifuge le tout de façon à ce que le réticulum se retrouve dans le culot et on obtient :

- **1^{er} cas :** Une protéine qui est dans le culot (donc dans le RE), car la radioactivité est détectée dans le culot.
- **2^{ème} cas :** Une protéine qui n'est pas dans le culot (donc dans le surnageant) car pas de radioactivité dans le culot, mais dans le surnageant.

Dans le 1^{er} cas, la protéine a réussi à intégrer le RE alors qu'elle était déjà synthétisée.

Dans le 2^{ème} cas, la protéine n'a pas réussi à intégrer le RE.

→ Alors on change la manip, et cette fois ci on met le RE en même temps que l'on fait la traduction de notre protéine.

→ Cette fois-ci on se rend compte que la radioactivité est toujours dans le culot, et donc que la protéine a réussi à intégrer le RE.

Conclusion : l'insertion des protéines transmembranaires dans les membranes du RE est un phénomène co-traductionnel.

2^{ème} expérience :

A savoir : Qu'est ce qu'une électrophorèse ? C'est une technique utilisée en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules, notamment grâce à leur taille.

D'après la 1^{ère} expérience, on peut penser qu'il y a une différence entre les protéines du cas 1 et du cas 2. On peut penser que leurs tailles sont différentes ?

1^{er} cas : On insère le RE en même temps que l'on fait la traduction de la protéine.

2^{ème} cas : On n'insère pas le RE, on fait uniquement la traduction de la protéine.

→ On réalise une électrophorèse sur gel de poly-acrylamide, et on se rend compte que dans le 1^{er} cas, la protéine a migré plus loin, elle est donc plus petite.

On en conclut alors que la protéine libre est plus grande que la protéine insérée.

En fait l'insertion co-traductionnelle de la protéine s'accompagne d'une perte d'une partie de la protéine.

C'est le peptide signal en N-term (situé sur la face luminale) qui est clivé par la signal peptidase dès l'entrée de la protéine dans le RE.

3^{ème} expérience :

Cette fois ci, on veut savoir si le peptide signal est nécessaire à l'insertion de la protéine dans le RE.

On réalise la même expérience qu'avant (1^{er} cas) sauf que d'un côté on mute la séquence du gène qui code pour le peptide signal.

Observation : On se rend compte que si le peptide signal n'est pas intact, la protéine ne s'insérera pas dans le RE.

CCL : le peptide signal est nécessaire à l'insertion de la protéine dans le RE.

4^{ème} expérience :

Maintenant on veut savoir si le peptide signal est suffisant pour l'insertion de la protéine dans le RE.

Même expérience que la 4^{ème} sauf qu'on va coupler à une protéine qui n'est pas « normalement » dans le RE un peptide signal.

Observation : La radioactivité est dans le culot → la protéine a intégré le RE.

CCL : le peptide signal est suffisant à l'insertion d'une protéine dans le RE.

5^{ème} expérience :

On veut localiser notre protéine lorsqu'elle insère le RE (transmembranaire ou non ?).

On met notre culot en présence de protéases (qui « dégomme » notre protéine)

- **On observe** une **disparition partielle** de la protéine (identifiée grâce à notre électrophorèse) :

Conclusion :

- Soit notre protéine est **partiellement résistante** aux protéases,

→ **Vérification** : Application de détergents + protéases → aucun changements car notre protéine est partiellement résistante.

- Soit notre protéine est transmembranaire donc protégée en partie, (la partie qui se retrouve dans la bicouche et dans le RE ne sera pas coupée).

→ **Vérification** : Application de détergents + protéases → destruction entière de notre protéine.

- **On n'observe** aucune disparition (pas de digestion enzymatique) de la protéine :

Conclusion :

- Soit notre protéine est dans le RE entièrement (donc protégée).

→ **Vérification** : Application de détergents + protéases → la protéine disparaît alors !!

- Soit notre protéine est entièrement résistante aux protéases.

→ **Vérification** : Application de détergents + protéases → la protéine résiste toujours !!