

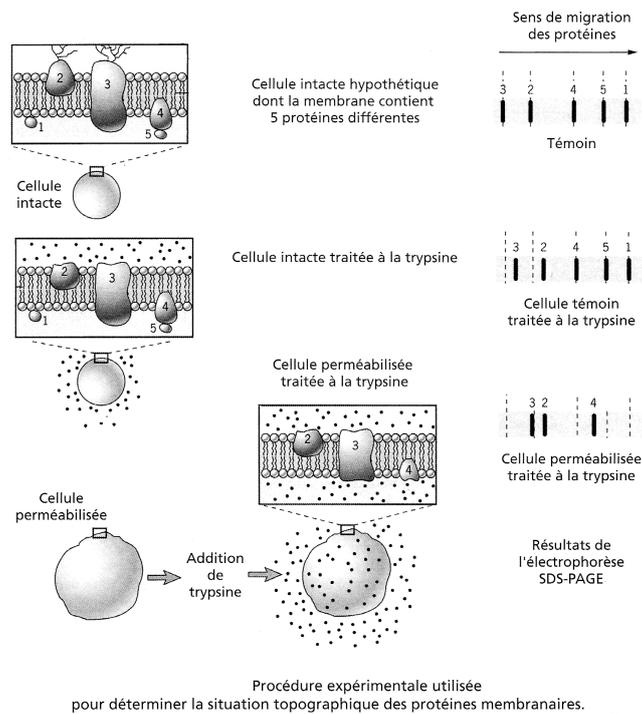
Figure 1 : étude des protéines membranaires par digestion sélective

(in Pécré et al, Dunod, 2006)

On réalise une **digestion sélective** des protéines membranaires par la **trypsine**, une protéase (enzyme hydrolysant les protéines). La trypsine est une molécule non perméante = qui ne traverse pas la membrane.

On **extraît** ensuite les protéines et on les sépare par **électrophorèse** = migration des protéines dans un champ électrique (sur gel de polyacrylamide SDS : **SDS-PAGE**).

Puis on réalise la **même expérience** en rendant la **membrane perméable** : l'enzyme est alors localisée dans le milieu extracellulaire et dans le milieu intracellulaire.



Analyse des résultats :

- Avant la digestion sélective :
- Digestion sélective de la membrane intacte :
- Digestion sélective de la membrane perméabilisée :

Figure 2 : profil d'hydrophobicité de la lactose perméase
(in Shechter, Dunod, 2000)

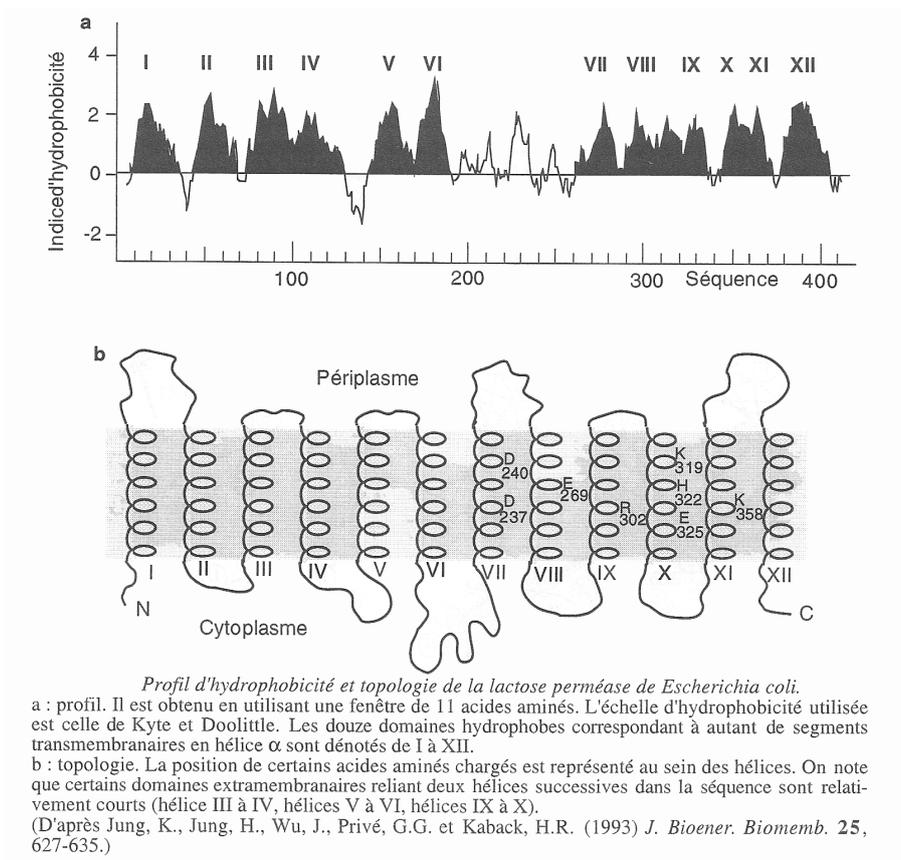
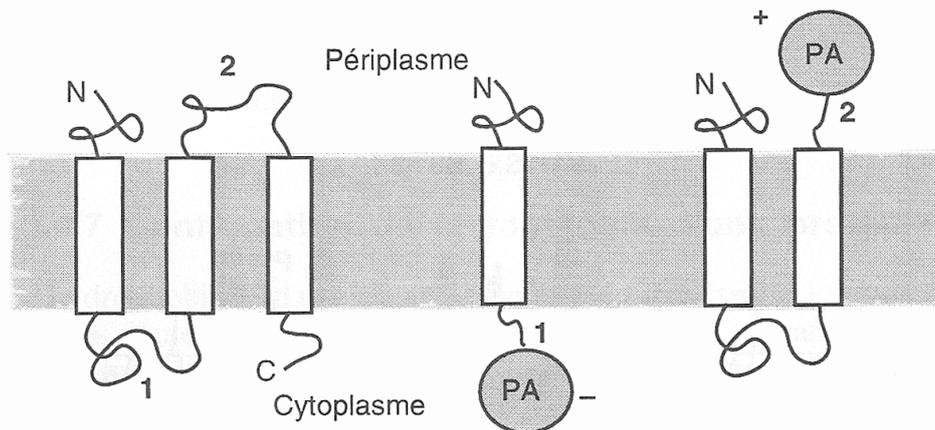


Figure 3 : utilisation d'une protéine reporteur
(in Shechter, Dunod, 2000)



Principe de la détermination de la topologie d'une protéine membranaire exprimée chez Escherichia coli par la technique de la fusion de gène avec la phosphatase alcaline.
 La protéine membranaire hypothétique est constituée de 3 segments transmembranaires, d'un domaine périplasmique et d'un domaine cytoplasmique. Aucune activité phosphatase alcaline (ou une activité faible) n'est détectée si la fusion a lieu en 1 au niveau du domaine cytoplasmique ; une activité élevée est détectée si la fusion a lieu en 2 au niveau du domaine périplasmique.
 (D'après Manoil, C., Boyd, D. et Beckwith, J. (1988) *TIG* **4**, 223-226.)

Figure 4 : organisation fonctionnelle de la membrane

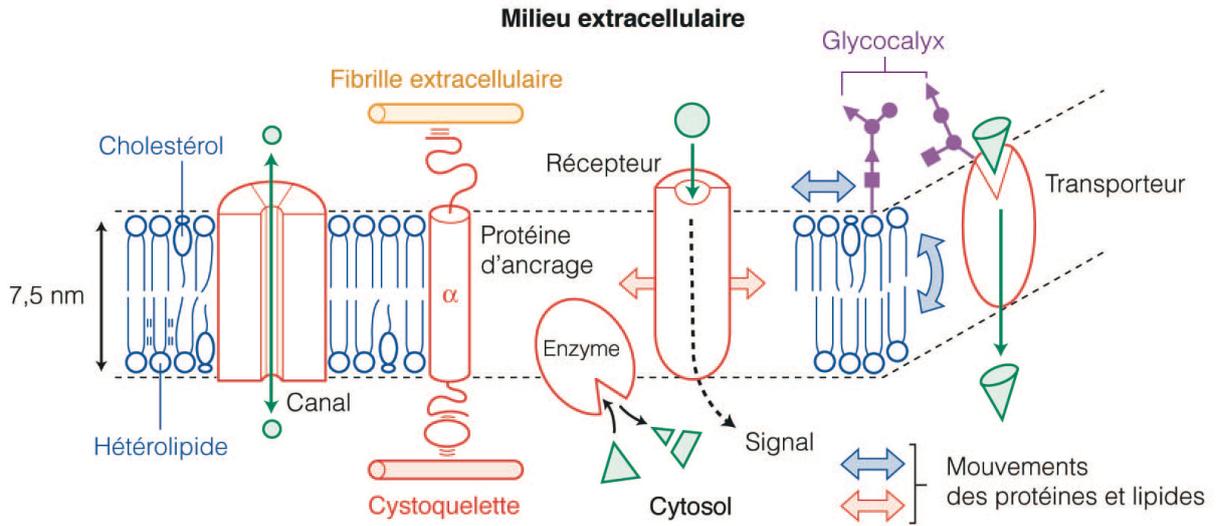


Figure 5 : 3 catégories de protéines en fonction de leur disposition dans la membrane

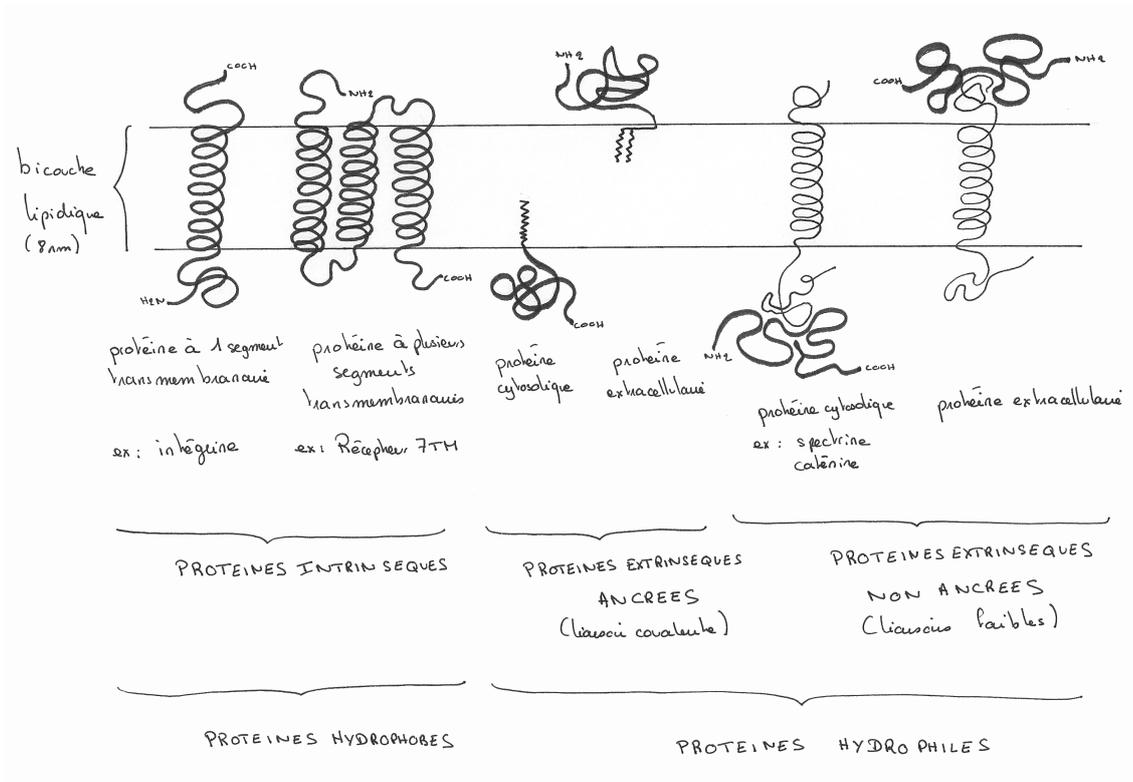
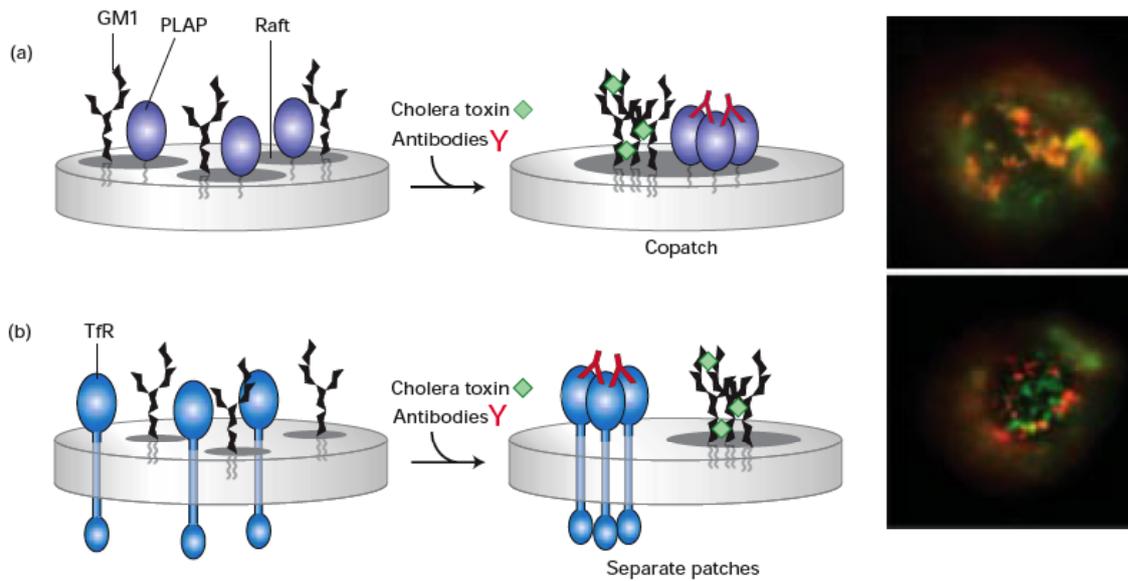


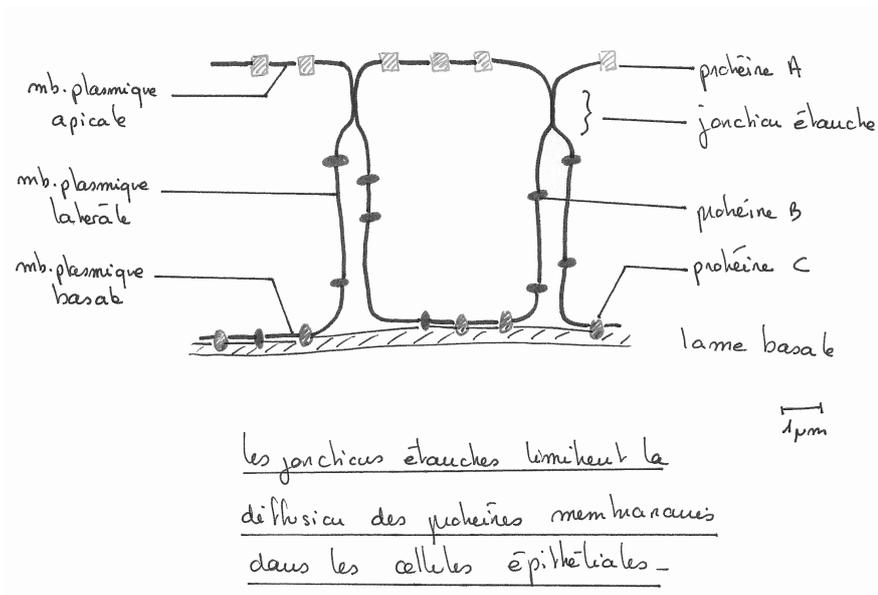
Figure 6 : les radeaux lipidiques
(in Lodish)



▲ EXPERIMENTAL FIGURE 5-10 Some membrane lipids and proteins colocalize in lipid rafts. The results of biochemical studies suggested that GM1, a glycosphingolipid, and placental alkaline phosphatase (PLAP), a lipid-anchored membrane protein, aggregate together into lipid rafts, whereas the transferrin receptor (TfR), which traverses the entire membrane, does not. To locate these components in the intact plasma membrane, cells were treated with fluorescence-labeled cholera toxin (green), which cross-links closely spaced GM1 molecules, and with fluorescence-labeled antibodies (red) specific for either PLAP or TfR. Each antibody can cross-link closely spaced

molecules of the protein that it recognizes. Cross-linking causes the proteins or lipids to form larger patches that can be detected by fluorescence microscopy (see Figure 5-42). (a) Micrograph of a cell treated with toxin and with anti-PLAP antibody shows GM1 and PLAP colocalized in the same patches (yellow). This copatching suggests that both GM1 and PLAP are present in lipid rafts that coalesce in the presence of the cross-linking reagents. (b) Micrograph of a cell treated with toxin and with anti-TfR antibody shows that GM1 and TfR reside in separate patches (i.e., red and green), indicating that TfR is not a raft-resident protein. [Micrographs from T. Harder et al., 1998, *J. Cell Biol.* **141**:929.]

Figure 7 : les jonctions étanches empêchent la diffusion latérale

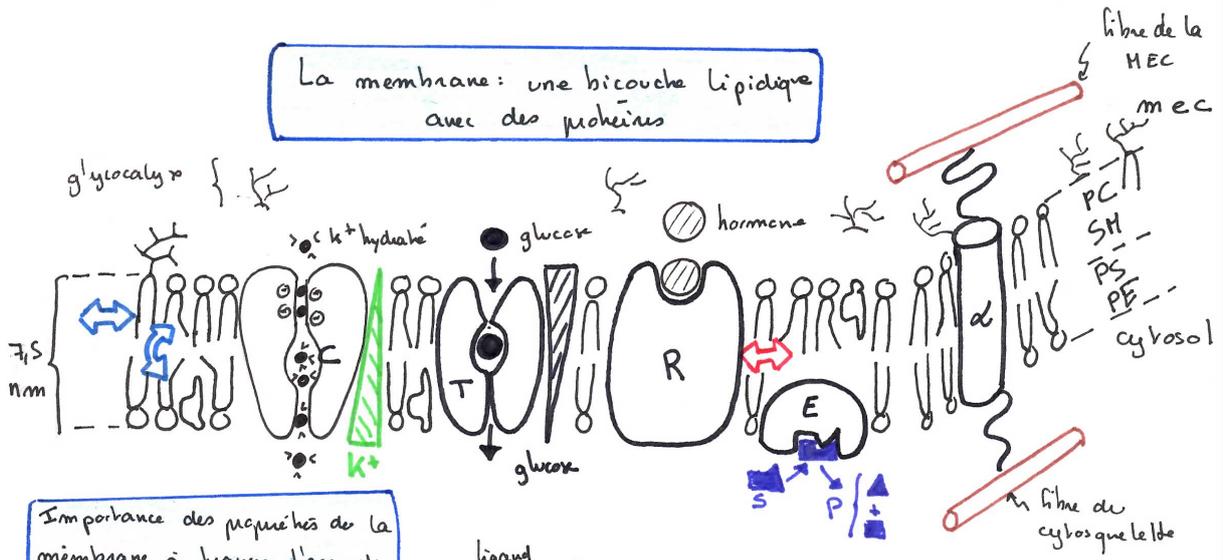


ORGANISATION ET PROPRIETES DES MEMBRANES CELLULAIRES

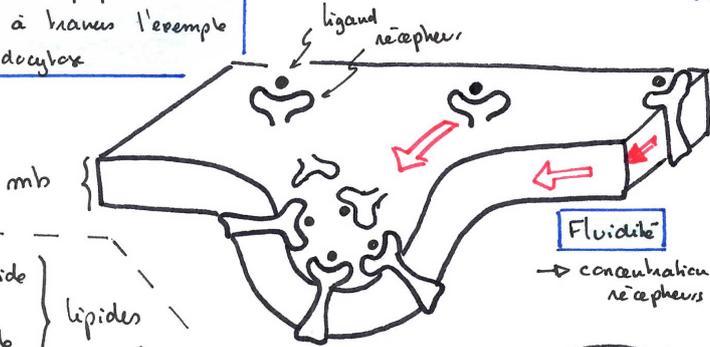
Technique	MET	MEB	FRAP FLIP
Observations / modèle	== structure biphasique	 structure particulaire	
Propriétés	hydrophobicité (centrale)	hétérogénéité (mosaïque)	Fluidité AGS / AGI cholestérol

Test de perméabilité
Profil d'hydrophobicité
Electrophorèse
Test avec AC / protéines
Protéines rapporteur
Modèle de Singer et
Nicolson (1972)

La membrane: une bicouche lipidique avec des protéines



Importance des protéines de la membrane à travers l'exemple de l'endocytose



polarité et spécificité protéique de la mb
→ réception du signal extracellulaire

- phospholipide
 - glycolipide
 - cholestérol
- lipides amphiphiles
- ▽ gradient de concentration
- ↕ déplacement des lipides et protéines
- R : récepteur

E: enzyme
C: canal ionique
d: hélice α



hydrophobicité
→ autohermétilisation
→ formation d'un compartiment intracellulaire