

La membrane plasmique

MP → frontière entre env aqueux (extra c) et cytosol + filtre sélectif : importation molécules essentielles + exportation molécules nocives.

I. Principales fonctions de la MP

- **Barrière hydrophobe avec perméabilité sélective** : Perméable aux gaz (O₂, CO₂), certains solutés via canaux/transporteurs/vésicules

- **Communication intercellulaire** :

Basée sur la stimulation de protéines exprimées à la MP qui constituent un récepteur à un ligand. Chaque ligand est spécifique d'un récepteur, ils peuvent être exprimés à la surface d'une cellule voisine, ce qui va modifier la conformation et activer les voies de signalisation dans la cellule : événements moléculaires qui vont permettre de moduler les effets biologiques de la cellule.

Certaines protéines exprimées au nv de la MP constituent un ligand pour les cellules voisines qui vont activer des événements intra c dans les cellules voisines.

- **Adhésion** : Interaction entre cellules ou interaction avec la matrice extra c

- **Fluidité** → « **mosaïque fluide** » : MP constituée de molécules hétérogènes + mobiles

Mobilité + migration + prolifération + endo/exocytose

II. Architecture générale de la MP

Épaisseur MP ≈ 5 nm (ME)

Deux feuilles denses aux électrons : feuillet extra c et feuillet cytosolique → bicouche lipidique

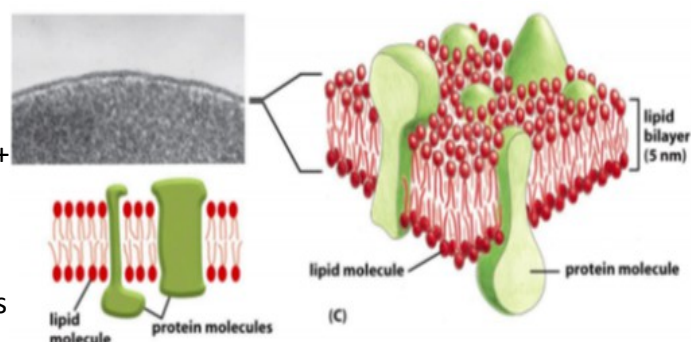
Composés de : Lipides +++ + Protéines

≠ types de lipides :

→ Phospholipides : glycérophospholipides + sphingomyéline

→ Cholestérol (rôle dans rigidification de la mb)

→ glycolipides:lipides avec gr oligosaccharidiques

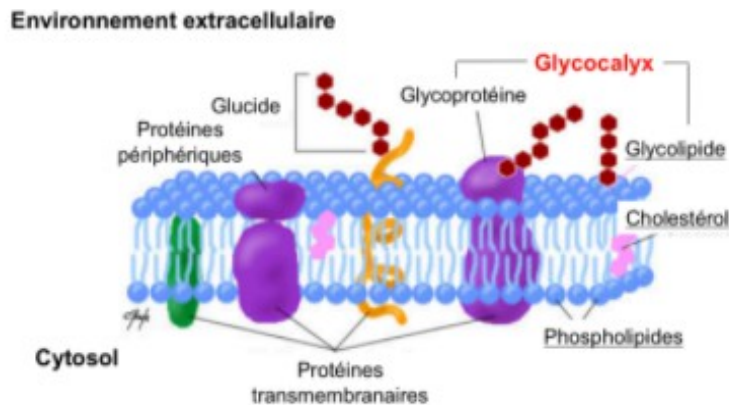


Lipides: **phospholipides** (glycérophospholipides et sphingomyéline)
Cholestérol, glycolipides: **Bicouche**

Protéines transmembranaires / périphériques

Protéines :

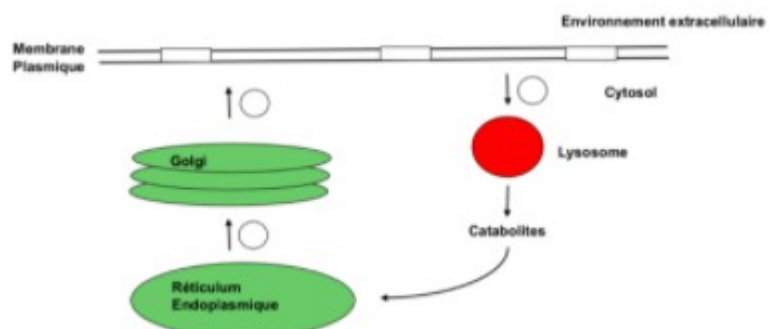
- protéines TM avec domaines hydrophobes
- protéines périphériques : n'ont pas de domaines TM hydrophobes



Glycocalyx → structure associée coté extra c, ensemble des gr oligosaccharidiques liés de façon covalentes soit à des protéines (= glycoprot) soit à des lipides (= glycolipides), manteau protecteur de la cellule

Caractéristiques MP

- **Bicouche lipidique**
- **Protéines et/ou glycoprotéines insérées ou associées à cette bicouche**
- Constituants mb mobiles : **Mosaïque fluide**
- Organisation **asymétrique** : composition moléculaire du feuillet interne différente du feuillet externe
- Composition chimique **hétérogène** (existence de micro-domaines : rectangles blancs) : constitution moléculaire différente de tous les autres endroits de la mb
- **Système endomb** (RE, pp de Golgi, endosomes, lysosomes) contribue à la biosynthèse et au renouvellement de la MP : **Turn-over**
 - **RE** : synthèse P et L → **App. Golgi** (maturation synthèse lipides) → **MP** : fusion de la vésicule avec la MP (achemine de nouvelles molécules jusqu'à la MP)
 - Endocytose : vésicule émane de la **MP** → **endosomes / lysosomes** → dégradation du contenu par des enzymes (lipases, protéases, glycosylases) → catabolites (prds de dégradation) → certains seront réutilisés au nv de **RE** (synthèse de nouvelles molécules)



III. Les principaux lipides de la MP

A. Les glycérophospholipides

1 glycérol central lié à :

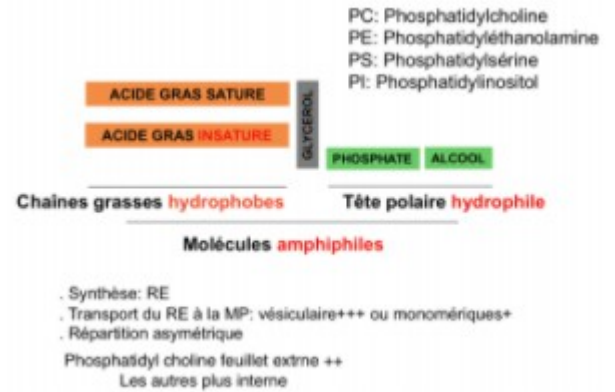
- une partie hydrophobe= chaînes grasses : AG saturé (1) + AG insaturé (2) → Liaison COVALENTE
- une partie hydrophile = tête polaire : Phosphate (3) + alcool :

choline = phosphatidyl choline **PC**

éthanolamine = phosphatidyl éthanolamine **PE**

sérine = phosphatidyl sérine **PS**

inositol = phosphatidyl inositol **PI**



→ molécule **AMPHIPHILE**

Répartition asymétrique des glycérophospholipides sur la MP

Synthèse dans la **RE**

Transport vésiculaire +++ : RE → App. de Golgi → MP

OU

Transporteurs monomériques : petites protéines qui vont capter un lipide, l'extraire de la MP, le véhiculer via le cytosol pour l'intégrer à une autre mb.

ENZ : Phospholipase A2 → hydrolyse glycérophospholipides en position 2 : crée des monoacylglycérophospholipides + AG

NB : liposome → micelle

Origine : venin de serpent → fragilise mb globules rouges → lyse des GR

B. Sphingolipides

Base commune avec la molécule de céramide :

- 2 ch. grasses
- Sérine

→ molécule hydrophobe +++ + petite partie hydrophile (OH) : molécule **AMPHIPHILE**

Céramide synthé dans **RE**

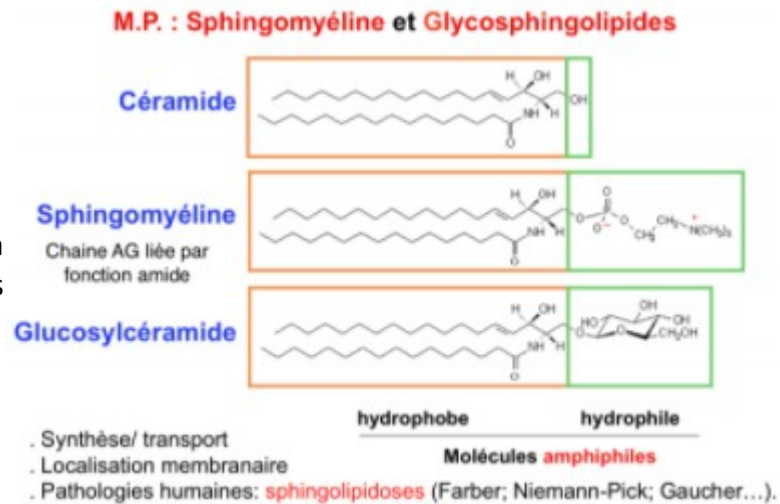
Transport vésiculaire OU transporteur monomérique : RE → Golgi → métabolisation en sphingomyéline ou en glucosylcéramide

Sphingomyéline : céramide + PhosphoCholine ,
localisation mb : feuillet externe ++

Glucosylcéramide : Glc + céramide

Peut servir de précurseur pour la conception de glycosphingolipides (liaisons covalentes avec d'autres sucres) ,

localisation : QUE feuillet externe de la MP



PATHO : Sphingolipidoses : Pathos rares de surcharge lysosomales

- **Farber** : déficit en **Céramidase acide** → accumulation de céramide dans le lysosome
- **Niemann-Pick** : défaut du **Sphingomyélinase acide** dans les lysosomes : acc de sphingomyéline dans lysosome
- **Gaucher** : défaut de **Glucosylcéramidase acide** : acc de glucosylcéramide

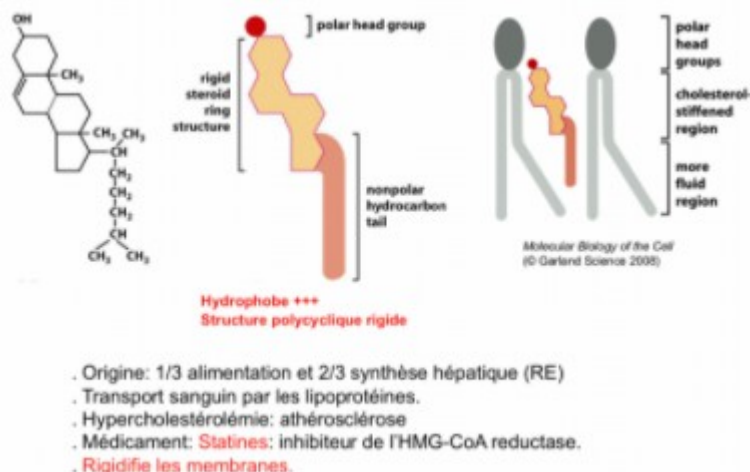
C. Cholestérol

A 37°C : la fonction principale du chol est de **rigidifier les mb**

Gr. polaire : hydroxyle OH orienté vers l'env extra
 c + noyau polycyclique hydrophobe orienté vers l'intérieur de la MP → **hydrophobe ++**

2 origines :

- endogène (⅔) : synthé au nv du **foie**
- exogène (⅓) : alimentation



Chol transporté dans le sang via des lipoprotéines, on dose chez les patients la **cholestérolémie**, si hypercholestérolémie : pré-disposition a dvlp **athérosclérose** : surcharge chol au nv des parois des vaisseaux → formation de **thrombus**.

Réguler cholestérolémie :

- régime alim
- Médicaments : **Statines** : inhibiteur HMG-CoA Reductase

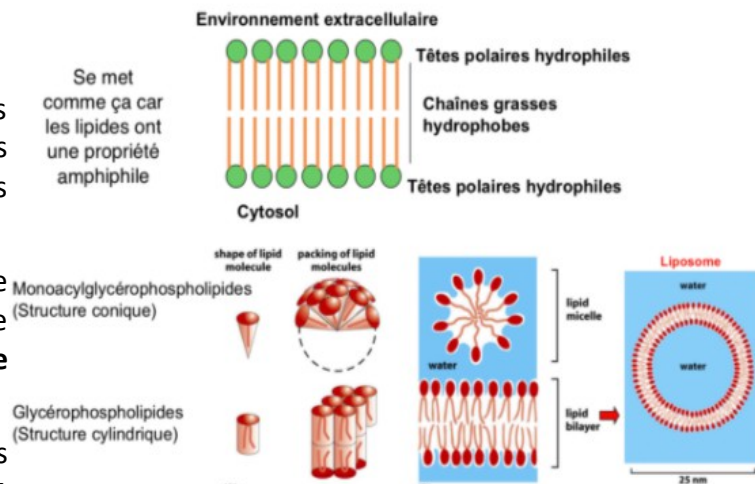
D. Organisation des lipides dans la MP

• DOUBLE FEUILLET :

L'organisation lipidique se fait de telle sorte qu'ils se mettent tête bêche avec les portions hydrophobes vers l'intérieur et les parties hydrophiles vers l'environnement extra c.

Glycérophospholipides (avec ont une structure cylindrique : spontanément ils sont capables de s'agencer en une structure de ch. D'AG) **double feuillet lipidique** → **Liposomes**

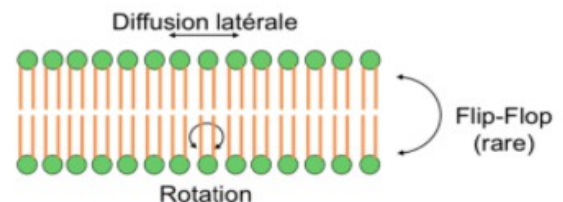
Si les lipides sont des **monoacylglycérophospholipides** : **1 seul feuillet de molécules** → **Micelle**



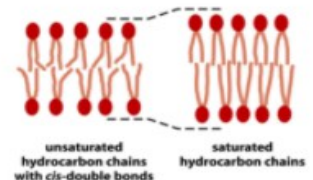
• FLUIDITE MB :

Lipides non figés, 3 types de mouv :

- **diffusion latérale** au sein d'une couche lipidique (freq)
- **rotation** lipide sur lui-même (freq)
- **Flip-Flop** : basculement d'un lipide d'un feuillet vers un autre feuillet (rare)



Fluidité membranaire:
Diminue avec le cholestérol
Diminue avec la longueur des chaînes d'AG
Augmente avec le degré d'insaturation des AG

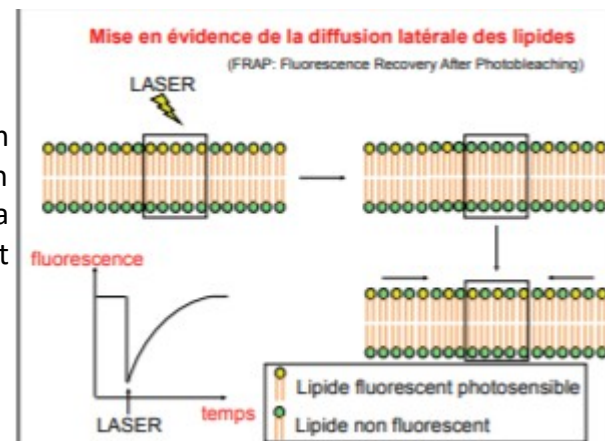


Fluidité ∝ avec : richesse en chol + longueur des AG

↗ avec : degré d'insaturation des AG (formation de coudes et limitent les interactions hydrophobes avec les lipides voisins)

Méthode pour mettre en évidence la fluidité mb: FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) : Incubation de cellules avec un analogue lipidique fluorescent (photosensible).

Ici lipide fluo synthétisé puis accumulé sur le feuillet externe, on irradie une partie de la mb avec un laser ce qui va induire un photoblanchiment (chute de la fluo) et on récupère la fluorescence avec le temps → les lipides ont un mouvement latéral.



- **% DE LIPIDES DANS LA MP**

Varie selon le type cellulaire.

Les lipides les + abondants sont les PC+ chol + sphingomyéline

Lipides les – abondants : PI+ DAG + ac. phosphatidique + céramide

	hépatocytes	GR	E. Coli
Phosphatidylcholine	24	17	0
Phosphatidyléthanolamine	7	18	70
Phosphatidylsérine	4	7	trace
Cholestérol	17	23	0
Sphingomyéline	19	18	0
Glycolipides	7	3	0
Autres*	22	14	30

*Diacylglycérol, Acide phosphatidique, céramide, phosphoinositides...

N.B. Procaryotes:
- Un PL majoritaire (PE)
- Pas de cholestérol (paroi)

Mais peuvent ↗ de façon transitoire (voie de signalisation intra c)

Chez E. Coli : pas de chol (il est donc nécessaire d'avoir une paroi autour de la MP qui va permettre de la protéger physiquement des agressions extérieures) + PE sont les lipides les + abondants.

- **DISRIBUTION LIPIDIQUE ASYMETRIQUE ENTRE LES 2 FEUILLETS DE LA MP**

Feuillet ext: PC + sphingomyéline (Lipide avec tête polaire + PC) + glycolipides (glycosphingolipides) + chol

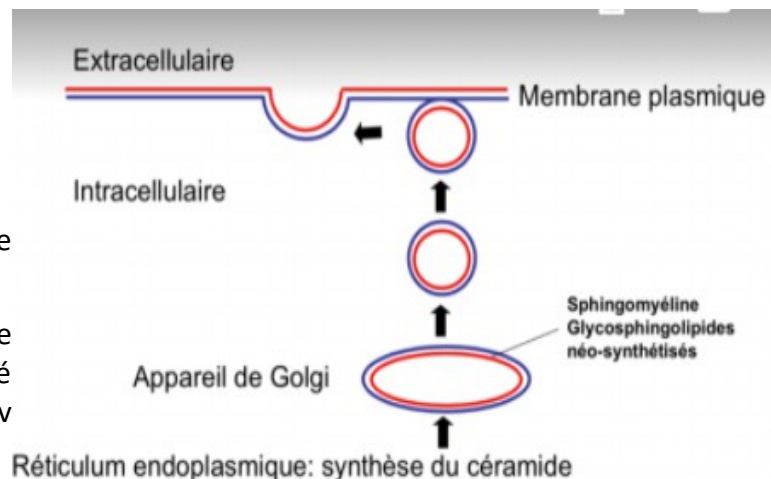
Feuillet int : PS exclusivement + PE + PI + chol

Pq la MP est asymétrique ?

→ ex des sphingolipides :

Les Sphingolipides sont synthé au nv de l'App. de Golgi (feuillet interne) → trafic vésiculaire → MP.

Tout ce qui est synthé au nv luminal se retrouve exposé vers l'env extra c et tout ce qui a été synthé au nv du feuillet cytosolique sera exposé vers l'env intra c.



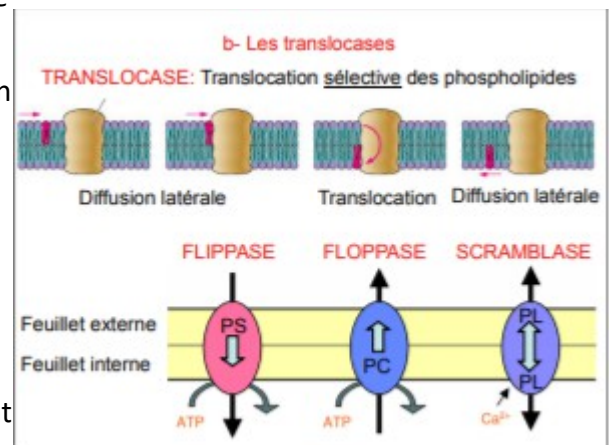
→ Translocases :

Pourquoi les glycérophospholipides se répartissent de manière asymétrique ?

Il existe des translocases qui font passer un lipide d'un feuillet à un autre.

Sélective (pas spé d'une seule espèce lipidique) :

- les **Flipases** : PS → feuillet interne (In)
- Les **Flopases** : PC → feuillet externe (Out)
→ Flipases et flopases ATP dep
- **Scramblases** : PL d'un feuillet à un autre → mélangent les phospholipides → rompent l'asymétrie de la MP,



→ act \nearrow par le Ca intrac

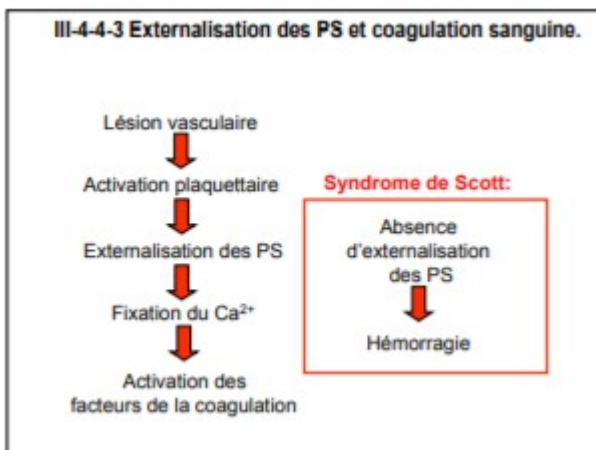
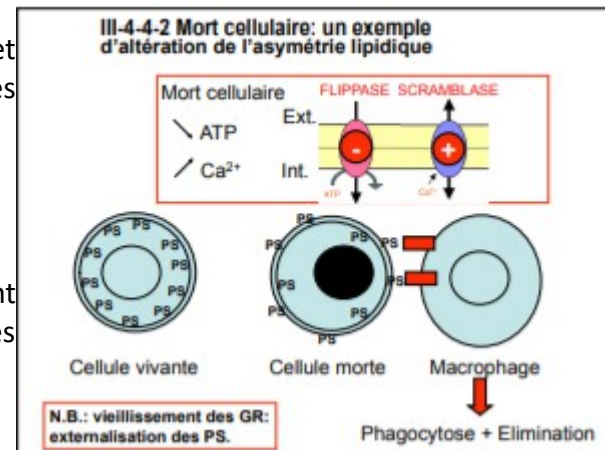
→ Mort cellulaire : un exemple d'altération de l'asymétrie lipidique de la MP

Quand la c meurt → \searrow ATP → \searrow act flipases

→ \nearrow Ca intra cytosolique → \nearrow act scramblases

→ externalisation PS (normalement elles sont sur le feuillet interne), les PS vont être reconnu par des Récepteurs exprimés sur la surface des macrophages → phagocytose des c

Vieillessement GR : \searrow stocks ATP → progressivement externalisation des PS → reconnaissance par les macrophages → phagocytose



→ Externalisation PS et coagulation sanguine

Afin d'éviter les hémorragies, un système d'externalisation se met en place au nv des **plaquettes**. Les PS sont chargées – donc elles fixent le Ca à la surface des cellules ce qui permet l'interaction avec des facteurs de coagulation et la formation d'agrégats.

PATHO : Sd de Scott : Pas d'externalisation des PS (défaut de la scramblase) → hémorragies freq

→ Micro-domaines mb :

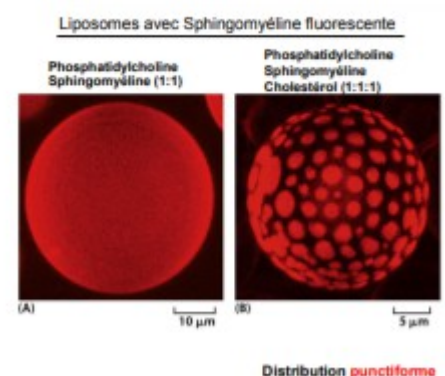
Association spontanée de certains lipides sous forme de micro domaines.

Expérimentalement : micro-domaines sans la présence de protéines !

Liposomes avec sphingomyéline fluo :

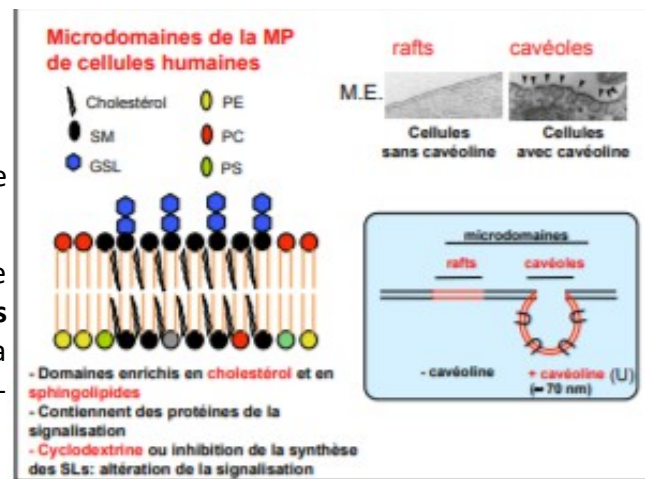
- A gauche : liposomes avec PC et sphingomyéline (qté équimolaire) : distribution homogène de la sphingomyéline fluo
- A droite : liposomes avec PC, sphingomyéline + chol (rapport équimolaire) : Distribution de la fluorescence sous forme de clusters enrichis en sphingomyéline + chol : ce sont les micro-domaines mb → distribution **punctiforme**.

III-4-5 notion de microdomaines membranaires



2 types de micro-domaines :

- **raft** : pas de structure caractéristique : pas de cavéoline
- **cavéoles** : invaginations de la MP. On les retrouve dans les cellules qui ont des **cavéolines** (protéines) qui permettent de s'insérer au nv de la MP pour faciliter l'invagination des micro-domaines.



+ protéines de signalisation

Il est possible de désorganiser les micro-domaines par 2 approches:

- incubation des cellules avec de la **CycloDextrine** : interagit avec le chol de la MP → facilite son extraction → déstructuration raft et cavéoles
- **inhibition synthèse sphingolipides** : altération des micro-domaines mb

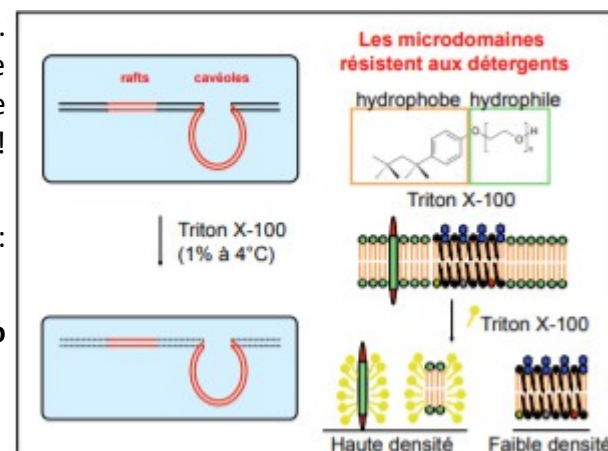
→ altération des voies de signalisation intra c

Tech. pour isoler les micro-domaines et étudier leur compo moléculaire :

Les micro-domaines peuvent résister à l'action des détergents . Comme le **Triton X-100** (partie hydrophobe + partie hydrophile → **amphiphile**), si on incube des c avec une solution à **1%** de Triton X-100 à **4°C** : des portions de mb vont être solubilisés !! SAUF LES MICRO-DOMAINES !!

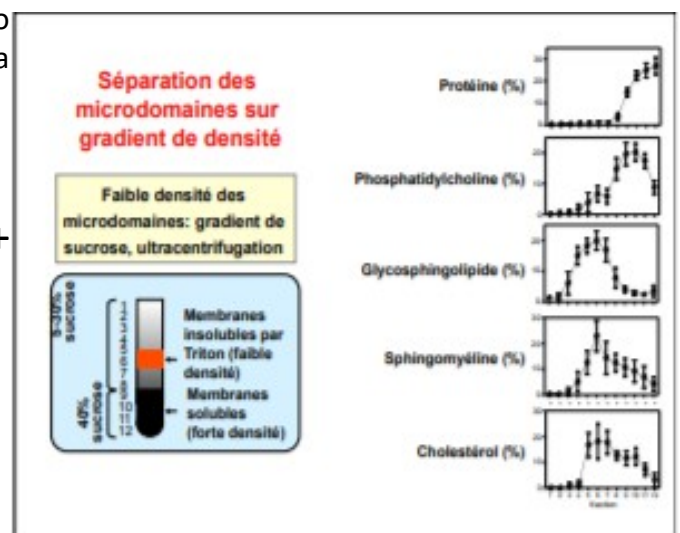
→ formation de composés de **haute densité** : **P + L** : interagissent avec de nb mol de Triton

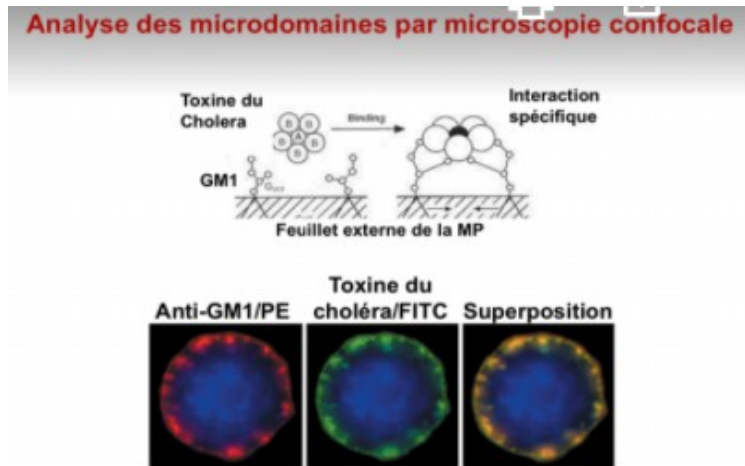
→ Formation de composés de **faible densité** : **micro domaines** mb qui n'interagissent pas avec Triton



On peut utiliser ces \neq de densité pour séparer les micro domaines sur gradients de densité par ultra centrifugation zonale (gradient de sucrose) :

- 10-11-12 : Haute densité : Prot + PC
- 5-6-7 : microdomaines mb : chol + sphingolipides





La microscopie permet de visualiser les micro-domaines par **microscopie confocale**.

Ici on réalise une étude de la localisation du **ganglioside GM1** présent dans les micro-domaines membranaires. Les scientifiques marquent les cellules avec deux types de molécules fluorescentes:

- Ac anti ganglioside GM1 couplé avec un fluorochrome qui fluorescent dans le rouge
- SU B de la toxine du choléra qui est phosphorescente dans le vert. La toxine du choléra est constituée de deux sous unités A et B. B interagit avec la cellule grâce à sa capacité de lier le ganglioside GM1 avec une haute toxicité. La toxine (SU A +++)va pouvoir entrer dans la cellule exprimer son pouvoir toxique, elle va pouvoir interagir avec le ganglioside GM1.

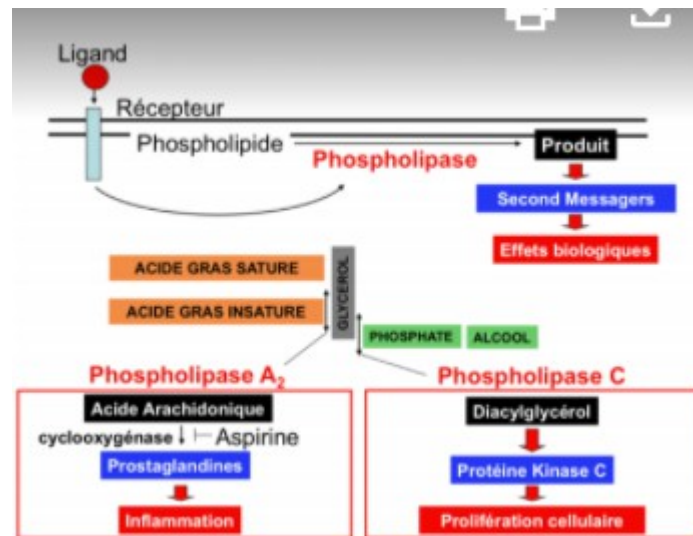
→ Co-marquage, sur une même « tranche » on peut analyser la fluorescence rouge et verte. On fait une superposition des 2 images : si colocalisation : rouge + vert = jaune

Avec ces deux types d'outils on peut parfaitement identifier les micro-domaines membranaires. Avantage de cette technique: on n'utilise pas de triton pour visualiser les micro-domaines= non invasive mais on repère quand même les micro-domaines.

En pratique on utilise pas Ac + Toxine du Choléra mais qu'un seul des deux. La plus part du temps on utilise la sous unité de la toxine du choléra car elle permet de localiser spécifiquement les gangliosides GM1.

E. Lipides et signalisation intracellulaire

Les lipides ont pas que des fonctions de structure mais aussi des fonctions de signalisation cellulaire pour induire des effets biologiques.



On a un ligand (1er message extra-cellulaire) au niveau de l'environnement extra-cellulaire. Le ligand est un premier message qui va stimuler un récepteur et donc la phospholipase et déclencher les environnements moléculaires de la cellule qui sont des second messages dans la cellule. Ils prennent le relais du ligand pour modifier les effets biologiques de la cellule (mort, croissance etc...). Les lipides jouent des rôles importants dans ces voies de signalisation.

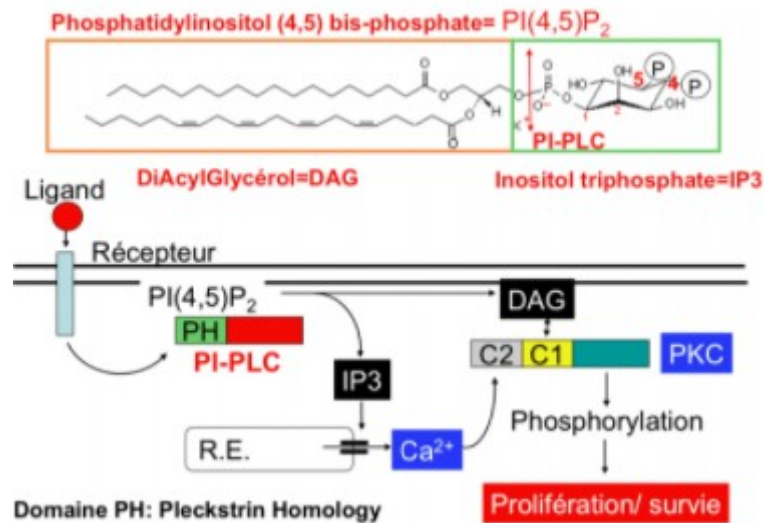
La PhospholipaseA2 (extra cellulaire donc pas de fragilisation de la cellule!) agit au niveau du feuillet interne, hydrolyse un pool de glycérophospholipides restreint. Elle va pouvoir cliver les glycérophospholipides au niveau du 2 pour libérer un AG insaturé souvent de l'acide arachidonique.

Il va être métabolisé par des enzymes: les cyclooxygénase (COX) qui produisent des seconds messages lipidiques: la prostaglandine (PG). Ils sont pro-inflammatoires (favorisent l'expression de gènes de mol qui favorisent l'action d'enzymes). Ainsi, les prostaglandines permettent une série d'événements déclenchés par l'inflammation. Certaines PG ne sont pas pro-inflammatoires. L'aspirine cible les cyclooxygénase et prévient la production de PG: elle limite l'inflammation dans l'organisme.

La Phospholipase C est la première voie de signalisation normalement présentée. Elle clive les glycérophospholipides au niveau juste avant le phosphate, on génère un produit: le diacylglycérol (squelette glycérol associé à deux AG) c'est une molécule très hydrophobe qui reste associée aux membranes. Ce diacylglycérol va pouvoir recruter certaines protéines comme notamment les protéines kinases C qui une fois recrutées au niveau de la membrane seront activées et elles vont alors pouvoir phosphoryler leur substrat (protéines) ce qui conduit à la prolifération et à la survie des cellules.

1. Exemple de la voie de signalisation des PI-PLC

La PI-PLC est capable d'hydrolyser un phosphatidylinositol phosphorylé en position 4 et 5 du groupement inositol : Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphate, aussi être appelé PIP_2 . Le PIP_2 est retrouvé au niveau du feuillet interne de la membrane



L'activation du PI PLC qui interagit avec PIP_2 , cela donne 2 prdts :

- Diacyl Glycérol \rightarrow Hydrophobe ++, reste associé au nv du feuillet interne, recrute PKC

Ce domaine permet l'interaction avec le substrat: la PIPLC peut hydrolyser et créer le diacylglicérol, il peut recruter les kinases C car il existe dans la **PKC** un domaine **C1** qui a la particularité d'avoir une grande affinité avec le diacylglycérol \rightarrow dès que le diacylglycérol est produit cela permet le recrutement de la PKC au nv du feuillet interne de la mb plasmique.

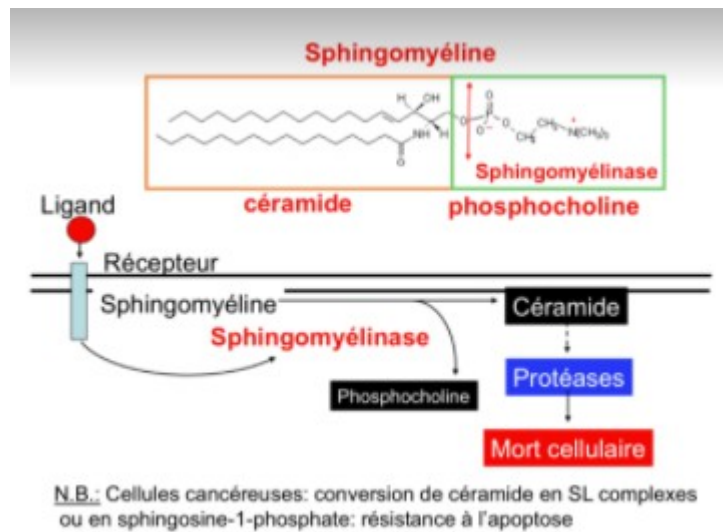
La PKC a aussi un domaine **C2** qui s'active avec le calcium cytosolique : phosphoryle les substrats protéiques pour permettre la prolifération cellulaire

- inositol tri phosphate (**IP3**): soluté hydrophile qui peut se retrouver dans le cytosol.

Ce soluté a une forte affinité pour des canaux calciques retrouvés au niveau de la membrane du RE (réservoir principal du calcium). Dès que l' IP_3 produit par la PI PLC se fixe sur les canaux, cela ouvre les canaux \rightarrow ceci favorise le passage du calcium du RE vers le cytosol = **Mobilisation du calcium intracellulaire**

Au niveau de la PIPLC on a un domaine le domaine PH très important pour permettre à la PIPLC d'être à la membrane et d'activer le substrat. Toute une série de protéines dans la cellule ont un domaine PH qui facilite donc l'interaction avec le substrat.

2. Exemple de voie de signalisation : Shingomyéline Synthase



Cette Voie consiste en l'hydrolyse de sphingomyéline par une sphingomyélinase pour générer deux produits: le céramide et la phosphocholine.

La sphingomyéline qui est hydrolysée est une sphingomyéline présente sur le feuillet interne de la MP.

La céramide est très hydrophobe, elle restera au nv du feuillet interne. La voie de signalisation activée conduit à la production de protéases qui mènent à la mort cellulaire.

La phosphocoline est + hydrophile et se retrouvera dans le cytosol.

Pour les cellules cancéreuses qui n'ont pas de mort cellulaire, 2 voies de signalisation sont utilisés pour éviter cette mort cellulaire :

- Métabolisation du céramide pour éviter son accumulation dans les cellules.
Métabolisation en sphingolipide complexe.
- Catabolisme du céramide en sphingosine (aussi toxique) puis métabolisation en sphingosine-1-phosphate → confère une résistance à l'apoptose

IV. Protéines de la MP

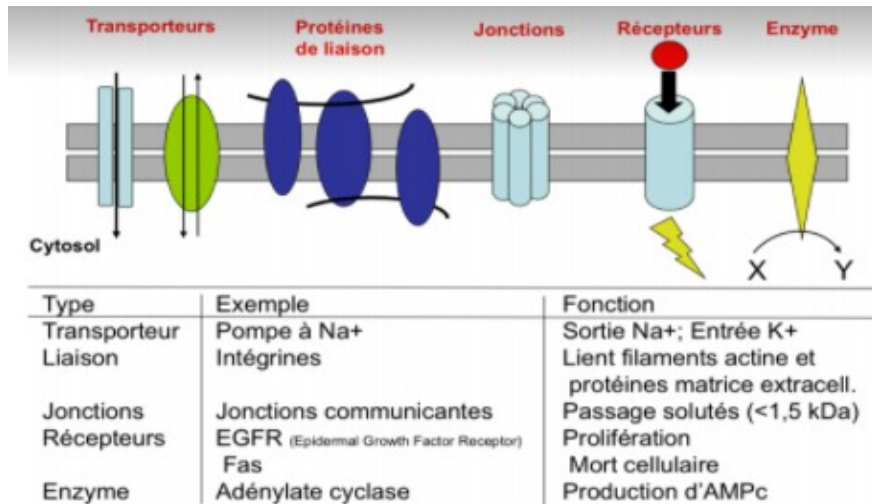
Protéines 50-100x – nb que les lipides !

MAIS 50% de la masse des mb (car MM protéines 50 à 100 x sur à la MM des lipides).

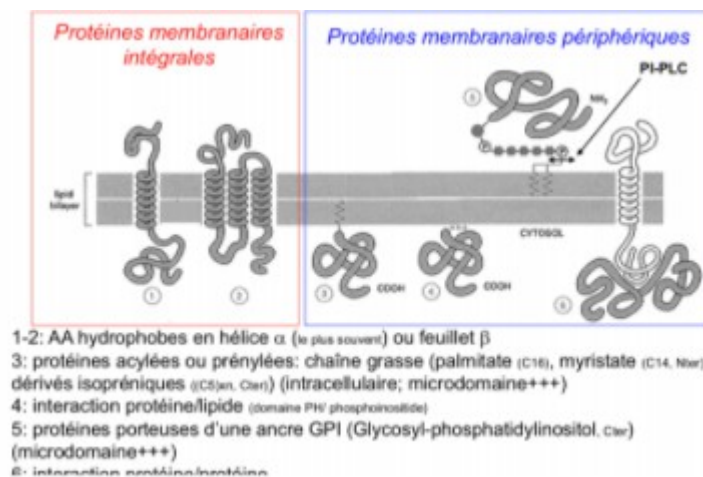
A. Protéines et fonctions associées

- Transport : facilitent le passage des ions (ex : pompe à Sodium : sortie Na et entrée K)

- Liaison : interaction cellule / cellule et cellule / MEC
- Jonctions : jonctions communicantes (passage des solutés avec MM inf à 1,5kDa)
- Récepteurs : interaction avec des ligands et activation voies de signalisation intrac (ex : EGFR → prolifération cellulaire), Récepteur Fas → mort cellulaire
- Enzymes avec domaine catalytique : ex : Adénylate Cyclase → AMP → voie de signalisation intrac



B. Association protéines/membranes



- Protéines mb intégrales :
Enchâssées au sein de la bicouche lipidique car constituées avec une domaine d'AA hydrophobes → liaisons hydrophobes avec lipides adjacents.
AA hydrophobe principalement organisés sous forme d'hélice(s) alpha
Parfois domaines hydrophobes organisés en feuillets bêta
- Protéines mb périph : plurs modalités d'association
Pas de domaine en AA hydrophobe
→ protéines acylées ou prénylées : ajout de ch. Grasse. Au nv de la protéine pour faciliter

son insertion dans un feuillet interne (micro domaines mb ++)!

Nature ch grasses : Palmitate 16C/ ac palmitique, myristate 14C/ ac myristique, dérivées isopréniques : 5C répétés n fois

Rôle : phénomène de signalisation intrac

Il existe aussi des protéines périphériques qui interagissent avec un domaine particulier: la protéine est considérée comme une protéine périphérique de la membrane. L'ajout d'une ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) retrouvée au niveau de C-term, ces protéines sont enrichies dans les **micro-domaines** riches en sphingolipides et en cholestérol, elles sont toujours orientées vers l'environnement **extra-cellulaire**.

Méthode pour savoir si protéine ancrée grâce à GPI: incuber cellules avec PIPLC recombinante exogène → clive les ancres GPI en extra cellulaire → pas d'interaction protéine/mb

Il existe deux types de protéines avec deux orientations. On parle de type 1 et de type 2 pour les protéines qui ont **un seul domaine membranaire hydrophobe TM** :

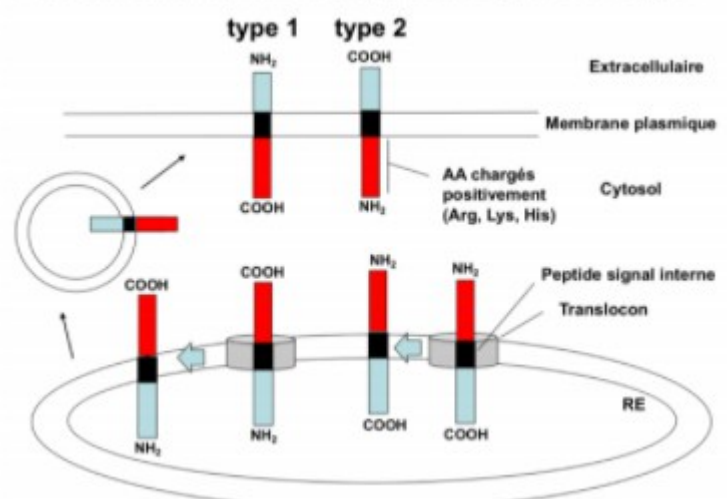
- Type 1 : N-term extrac , C-term intrac
- Type 2 : N-term intrac, C-term extrac

AA basiques et positifs à pH physiologique (Arg, Lys, His) coté intrac (→N-term ne pas franchir la MP du translocon : reste du coté cytosolique)

Protéines : synthèses débutent au nv du cytosol → peptide signal (soit **au nv N-term** de la protéine, peut être clivé soit **interne** : Non-clivable par la peptidase du signal, domaine hydrophobe de la protéine et permettra à la prot d'être enchâssé au nv de la bicouche lipidique) → reconnu par SRP qui achemine le complexe traductionnel du cytosol vers le REG au nv du translocon → N-term coté luminal du REG → ouverture latérale du translocon → diffusion latérale de la prot sur la mb du REG (C-term cytosolique, N-term luminal) → trafic vésiculaire (REG--> Golgi puis Golgi → MP)

Donc quand N-term vers la lumière du REG → elle sera du côté cytosolique de la MP

Protéines membranaires intégrales de type 1 et de type 2

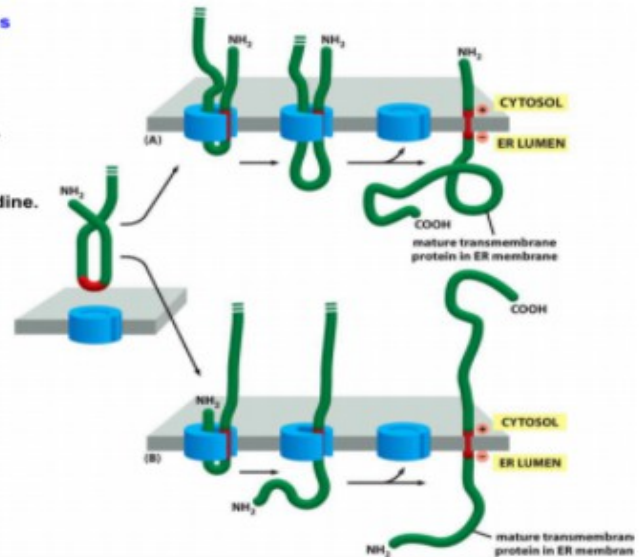


The diagram illustrates the translocation of a transmembrane protein across the ER membrane. The process is shown in four stages from left to right:

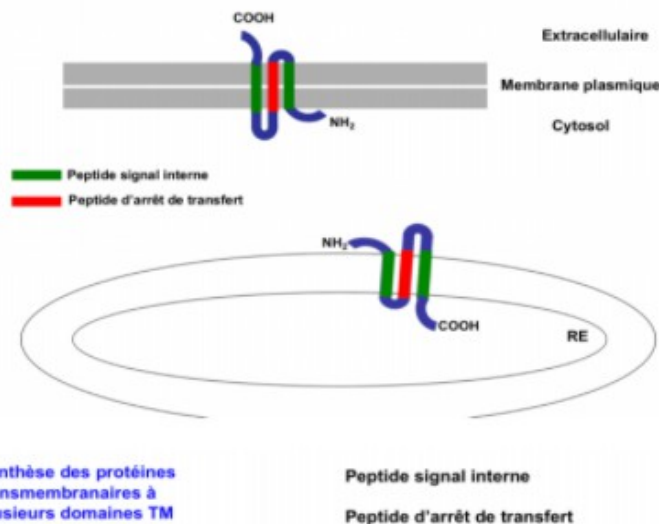
- Initiation:** A polypeptide chain with a green start-transfer sequence and a red stop-transfer sequence is being synthesized in the cytosol. The start-transfer sequence is binding to a hydrophobic start-transfer-peptide-binding site on the translocator protein (blue).
- Translocation:** The polypeptide chain is threaded through the translocator protein as it is synthesized. The start-transfer sequence is now in the ER lumen, and the stop-transfer sequence is in the cytosol.
- Release:** The stop-transfer sequence binds to a hydrophobic stop-transfer-peptide-binding site on the translocator protein. The translocator protein is then recycled, and the polypeptide chain is released into the ER lumen.
- Completion:** The mature transmembrane protein is shown in the ER membrane. It has its NH₂ terminus in the ER lumen and its COOH terminus in the cytosol. The translocator protein is shown as a separate entity, having been recycled.

Labels in the diagram include: **start-transfer sequence**, **stop-transfer sequence**, **CYTOSOL**, **ER LUMEN**, **translocator protein**, **hydrophobic stop-transfer-peptide-binding site**, **hydrophobic start-transfer-peptide-binding site**, **signal peptidase**, **NH₂**, **COOH**, and **mature transmembrane protein in ER membrane**.

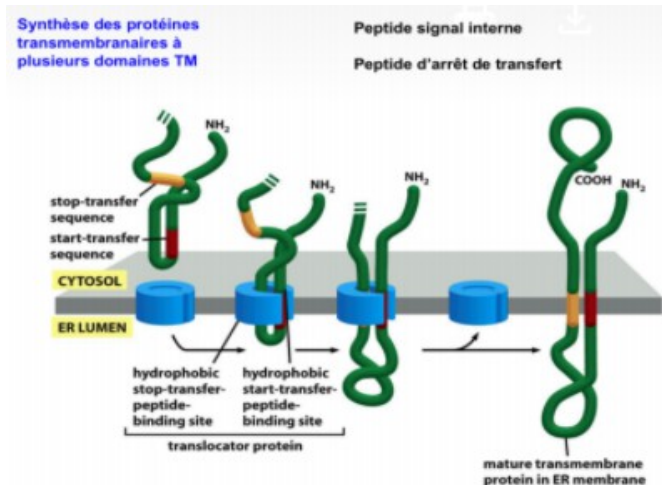
*Non clivable
par la peptidase
du signal



Protéines membranaires intégrales à plusieurs domaines TM



Par trafic vésiculaire ce qui est cytosolique se retrouve cytosolique dans la membrane plasmique, ce qui est luminal vers extra-cellulaire. (intrac reste intrac et extrac reste extrac)

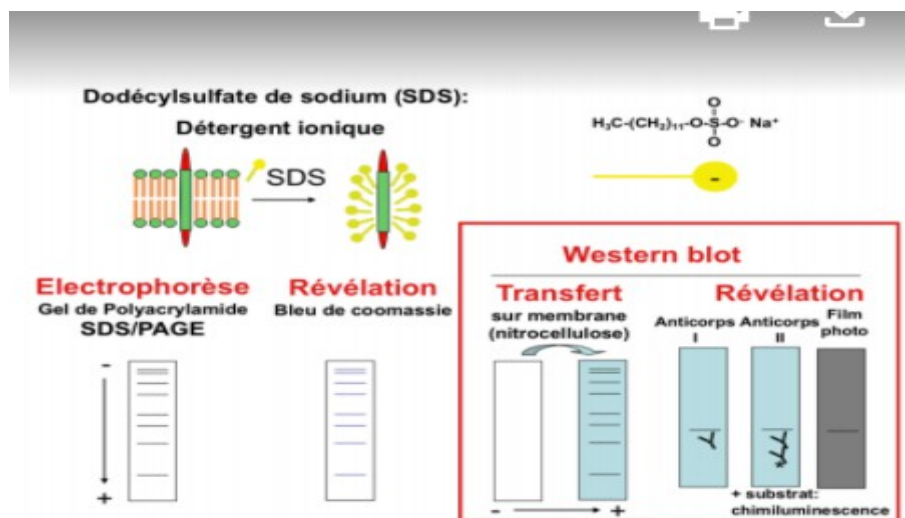


L'Initiation de transfert achemine la future protéine vers le translocon, elle contient des AA hydrophobes peuvent être dans le REG.

Si la protéine est riche en AA basiques positifs à pH neutre, N-term rentre pas dans la lumière. On a alors une reprise synthèse jusqu'à un arrêt de transfert, la suite de la synthèse protéique se fait au niveau cytosolique pour que C-term se retrouve au niveau cytosolique.

Les séquences riche en AA hydrophobes permettent d'ancrer au niveau de la bicouche lipidique. A la différence du peptide signal : celui-ci n'est pas clivable, elle reste enchâssée au niveau de la membrane.

C. Extraction et analyse des protéines membranaires



Un autre détergent, le SDS qui ressemble à un lipide avec une partie hydrophobe et une partie polaire (chargée-), lorsqu'il interagit avec les protéines, il le fait avec sa partie hydrophobe. Ainsi une multitude de SDS se fixe sur membrane hydrophobe: il extrait les protéines des membranes et charge toutes les protéines négativement. Il permet de séparer les protéines sur une technique d'électrophorèse sur gel de poly-acrylamide, avec un champ: se déplacent en fonction de leur MM.

On dépose l'extrait protéique au niveau de la cathode (-) on exerce un courant électrique, les protéines migrent vers l'anode (+), migration en fonction de la MM: inversement proportionnelle à

la MM = les petites protéines migrent beaucoup, on les retrouve proche de l'anode. Les grosses protéines migrent peu. Les protéines avec MM intermédiaire se mettent à position intermédiaire. Cette technique est SDS PAGE (page = abréviation gel polyacrylamide).

Quand on observe à l'oeil nu après l'expérience on ne voit rien. Si on veut révéler les protéines on doit utiliser un colorant des protéines, le plus fréquent utilisé est le bleu de coomassie qui permet de colorer toutes les protéines, on voit alors une série de bandes (chaque bande = série de protéines distinctes).

Ceci est peu informatif, ce qui l'est plus est de faire une révélation spécifique avec le Western Blot. Avec cette technique on cherche à identifier une protéine précisément au milieu de toutes ces bandes. On fait cette première étape de SDS page, on sépare les protéines en fonction de leur MM, on a les protéines sur le gel de polyacrylamide.

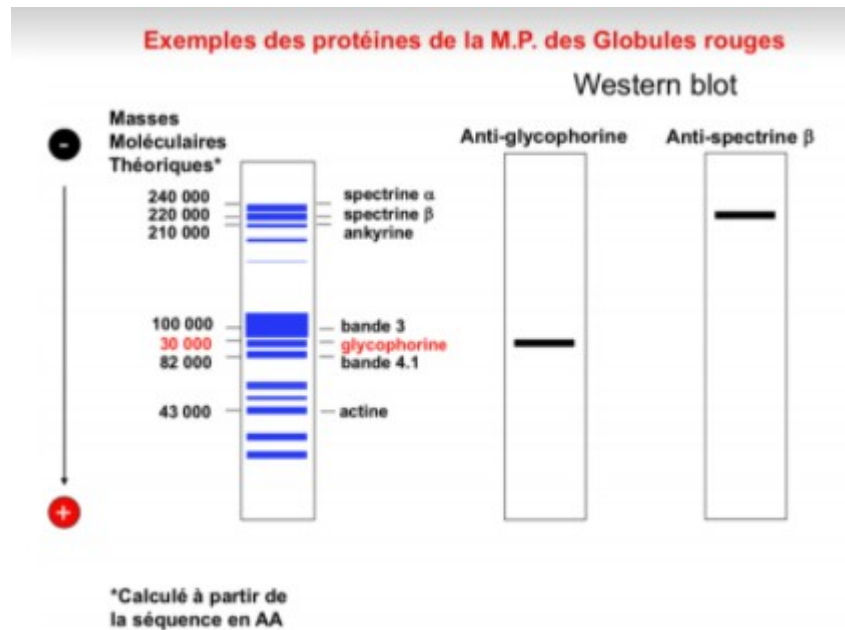
On fait une étape de transfert= transfert des protéines du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose (relativement fine), pour faire cette étape de transfert on applique directement la membrane de nitrocellulose sur le gel de polyacrylamide, on applique ensuite un gel électrique: pour que les protéines se déposent sur la membrane de nitrocellulose. A l'oeil nu on n'est pas capable d'observer les protéines. On fait une étape de révélation avec des Ac = Glycoprotéines qui sont dirigées spécifiquement contre un Ag donné.

Avec un AC on peut reconnaître très spécifiquement une protéine donnée sur une membrane de nitrocellulose. Deux Ac:

- Ac primaire très spécifique pour la protéine d'intérêt que l'on souhaite révéler (Ac interagit directement avec la protéine la réaction Ag/Ac n'est pas visible à l'oeil nu.
- Ac secondaire couplé à une enzyme: il va se produire en complexe avec la protéine/Ac primaire/Ac secondaire reconnaît l'Ac primaire. Ce complexe n'est toujours pas visible.
- On apporte ensuite le substrat de l'enzyme pour que le substrat soit transformé en produit. Suite à cette transformation il y a une émission de photon (chimie de luminescence), il imprègne une film photo: on a une empreinte qui correspond spécifiquement à la protéine d'intérêt.
- Le film photo est appliqué sur la membrane de nitrocellulose.

On peut calculer la MM théorique des protéines, c'est à dire la somme des MM de chaque AA qui rentre dans la constitution de la protéine. Ce que l'on constate après migration des protéines sur SDS page c'est la MM apparente des protéines (on s'éloigne de la théorie un profil de migration permet de calculer la MM apparente).

Exemple des protéines de la MP des Globules rouges (érythrocytes, hématies)



La **Glycophorine** se comporte de manière particulière.

Sa MM théorique correspond à une MM de 30kDa, on devrait en théorie la trouver bien plus proche de l'anode. Pourtant elle migre entre des protéines de 100 et 80 kDa = MM apparente (tient compte des modif post-trad). Il y a des contre exemples à la théorie de la migration.

La Glycophorine est une protéine glycosylée+++ , elle modifie le profil de la glycophorine. Si on fait Western Blot, on a une immuno-empreinte sur le film photo suivant l'Ac que l'on choisit. Suivant la protéine il sera + ou - proche de la cathode. Les Ac sont très spécifiques car on ne révèle pas les autres protéines.

D. Mobilité des protéines

Les Ac sont aussi utilisés pour révéler la présence de protéine intra cellulaire ou sur la membrane. Les protéines de la membrane sont mobiles, cela a été mis en évidence (notamment le mouvement latéral) grâce au marquage des protéines mb par des Ac.

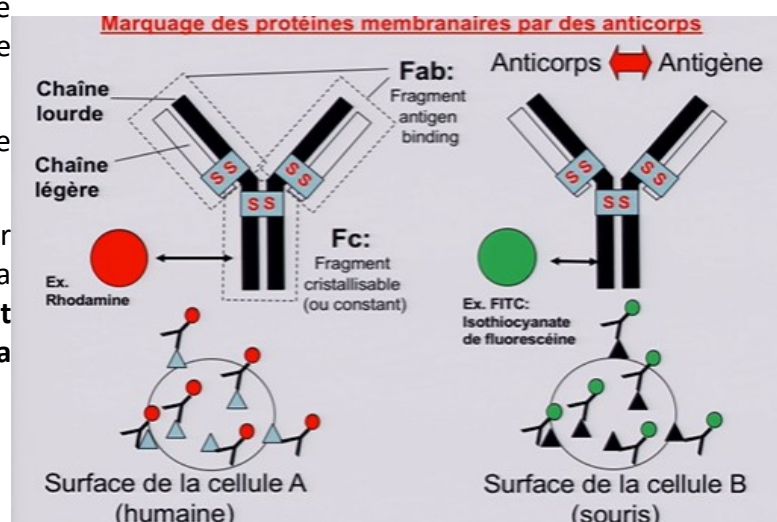
Ac \rightarrow 4 chaînes : 2 chaînes lourdes + 2 chaînes légères, reliées entre elles par l'intermédiaire de ponts disulfures.

Ac \rightarrow glycoprotéine capable de reconnaître un Ag

L'association d'une chaîne lourde avec une chaîne légère constitue le fragment **FAB (2)**= fragment de liaison à l'Ag, **variable** ++.

Les deux fragments FAB sont capables de lier le même Ag.

3ème fragment = fragment **FC** car c'est le premier fragment qui a pu être **cristallisé** pour établir la structure 3D de ce fragment, = fragment **constant** doué de propriétés qui permettent de **moduler la réponse immunitaire**.



A ce fragment cristallisable on peut associer des **fluorochromes**, le fait de lier des molécules au niveau du fragment FC rend l'Ac fluorescent sans affecter sa spécificité antigénique.

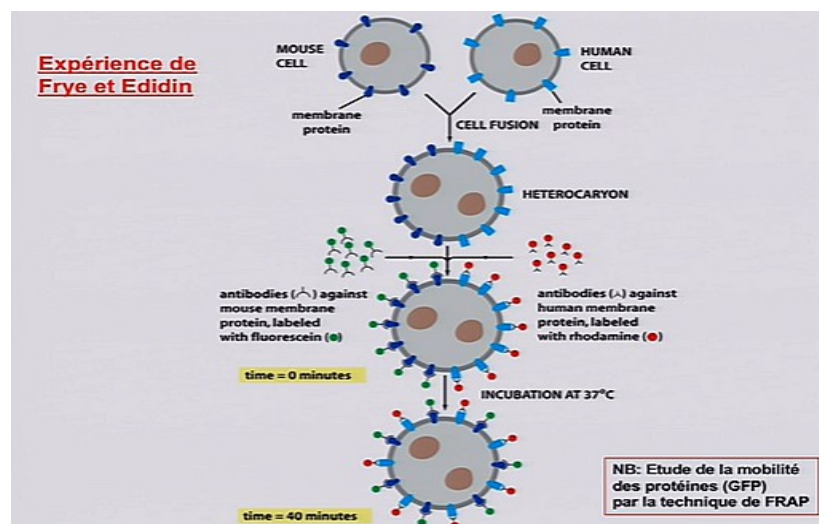
Si on utilise un Anticorps couplé à la Rhodamine (fluorescent rouge), si il est spécifique d'un Ag protéine donné, ici exprimé sur la membrane de la cellule humaine, on arrive à observer le marquage de ces protéines au niveau de la membrane plasmique.

Ils ont aussi utilisé la des Anticorps couplé à u autre type de molécules fluorescentes: le FITC (fluorescent dans le vert). Cet Ac est spécifiquement dirigé contre des protéines de souris au niveau de la membrane plasmique de cellules de souris.

Les scientifiques ont généré un **hétérocaryon** = fusion de deux cellules (c de souris + c humaines), pour générer deux cellules plus grosses avec deux noyaux (ici une humaine et l'autre humaine). On a des cellules de souris avec des protéines de la MP de souris et l'autre avec protéines humaine. Suite la fusion on se retrouve avec une polarisation des protéines de souris (bleu foncé) et cellules humaines (bleu clair), ils ont marqué les hétérocaryons avec les AC spécifiques qu'on a vu dans la première partie.

Ils observent juste après la fusion des deux cellules une polarisation de la fluorescence (tout vert à un pôle et le rouge à l'autre). Ils incubent l'hétérocaryon et observent 40 minutes après la distribution de la fluorescence avec un microscopie à fluorescence. A 40 minutes il y a un mélange des deux types de fluorescence.

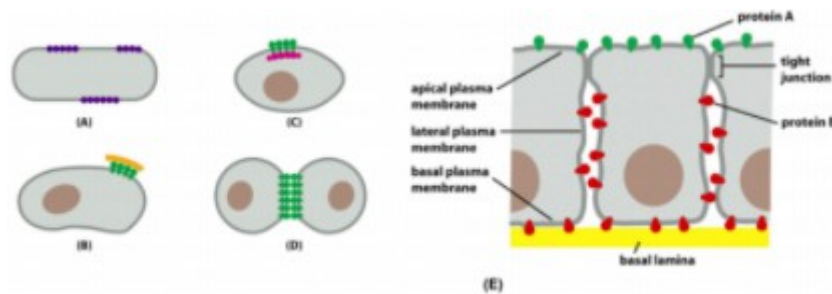
Les protéines diffusent donc latéralement de telle sorte à se mélanger. C'est une Première preuve de la mobilité des protéines, aujourd'hui d'autres techniques permettent d'évaluer le mouvement.



On peut utiliser la technique FRAP → étiquette GFP sur une protéine (=protéine qui fluoresce dans le vert) et suivre la protéine sur la membrane. On irradie avec la lumière laser une portion de la MB plasmique, ce qui amène à la perte de la fluorescence de la GFP (=photoblanchiment), cette portion est colonisée par des protéines fluorescentes → mouvement latéral pour re-coloniser.

La vitesse de diffusion de la protéine n'est pas constante, elle est modulée selon différents paramètres :

- Masse de la protéine: plus la protéine a une MM importante, plus elle a des difficultés à se mouvoir
- Agrégation de la protéine (A): Protéines capables de s'agréger (limite la mobilité latérale de ces protéines)
- Affinité de la protéine pour autres constituants de la membrane, du cytosol ou de l'environnement extracellulaire (B, C, D): Protéines qui peuvent interagir avec des protéines à la surface des autres cellules voisines → limite le mouvement
- Constitution lipidique / diffusion limitée dans les microdomaines.
- Jonctions serrées (E) au PA du Té: Il existe des jonctions serrées = tight junctions, elles établissent une frontière au niveau des cellules, elle fait tout le pourtour de la cellule, elle fait une frontière. Cette jonction permet de polariser la cellule: protéines vertes au niveau du pôle apical, ne peuvent pas diffuser au niveau du pôle baso-latéral sur lequel il y a les protéines rouges, elles aussi bloquées. Ce sont des jonctions très importantes.

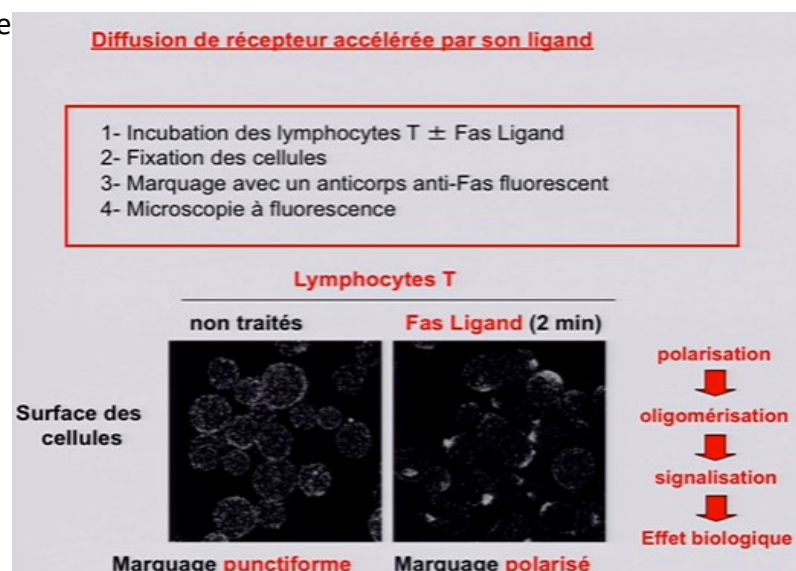


Le Récepteur FAS est un récepteur de mort cellulaire (MP de toutes les cellules, Lymphocytes T + +).

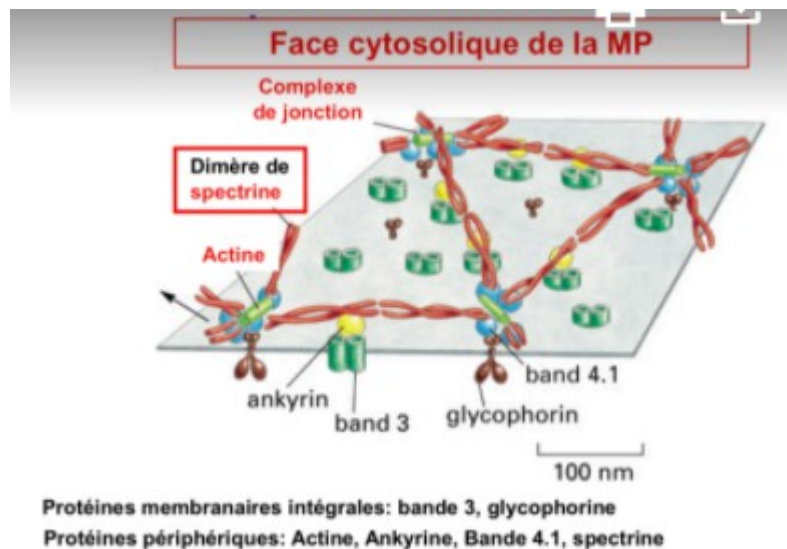
Interagit avec Fas ligand (extrac) → modifie la localisation sub-cellulaire du Récepteur Fas (accélère sa diffusion latérale) + facilite activation des voies de signalisation à l'intérieur de la cellule.

Après fixation des cellules, on marque les c avec Anti-Fas qui fluoresce, on analyse la répartition de Fas à la surface des LyT (microscopie à fluorescence)

- LyT incubés avec Fas ligand pnt min → Marquage polarisé : ensemble des R Fas se retrouvent à un pôle de la cellule → permet oligomérisation du R Fas + modif de la conformation du R → déclenchement signalisation intra c → mort cellulaire
- LyT non-traités (contrôle) → Marquage punctiforme, distribution homogène



E. Protéines du cortex cellulaire



Cortex cellulaire : Constitué de protéines mb intégrales + protéines périphériques organisées en réseau non figé sur la face cytosolique !

Fonction : renforcer et stabiliser la mb plasmique

Patho :

Maladie de Minkowski-Chauffard → sphérocytose ou ictère hémolytique congénital → lyse des globules rouges → anémie

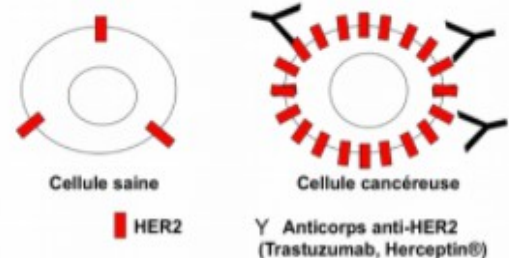
Cause : mutations de gènes codant pour les protéines du cortex (spectrine, ankyrine, bande 3 ou bande 4.1)

F. Protéines membranaires = cible de médicaments

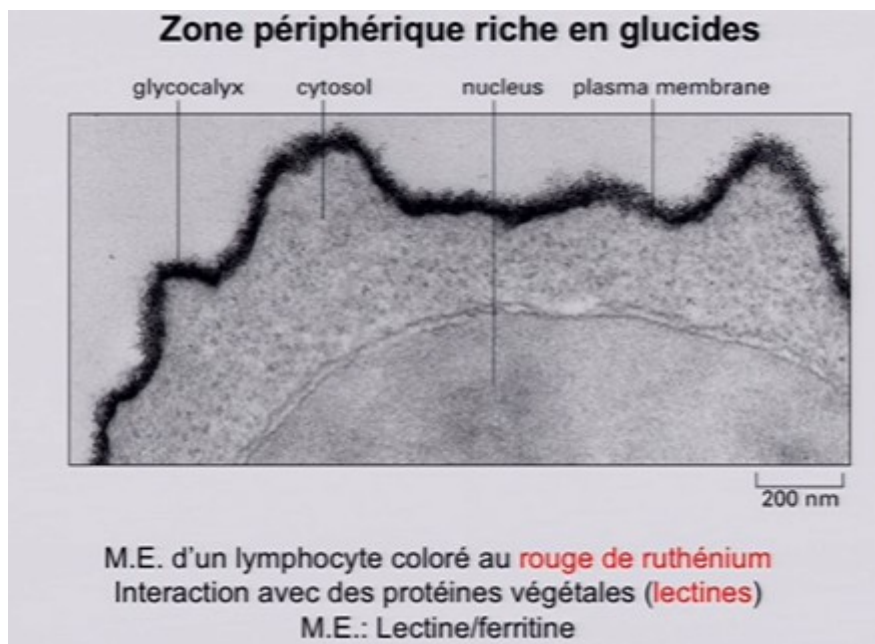
Ex : HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor 2)

- Récepteur de l'EGF
- Activité TK → active des voies de prolifération non régulée de c KC
- Sur exprimé dans 20% des cas de KC du sein
- Ac anti-HER 2 : Trastuzumab (Erceptin®)

Exemple de HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor 2) en cancérologie:
Récepteur à activité Tyrosine kinase
Surexprimé dans environ 20% des cancers du sein
Favorise la prolifération non régulée des cellules cancéreuses



V. Glycocalyx ou cell coat



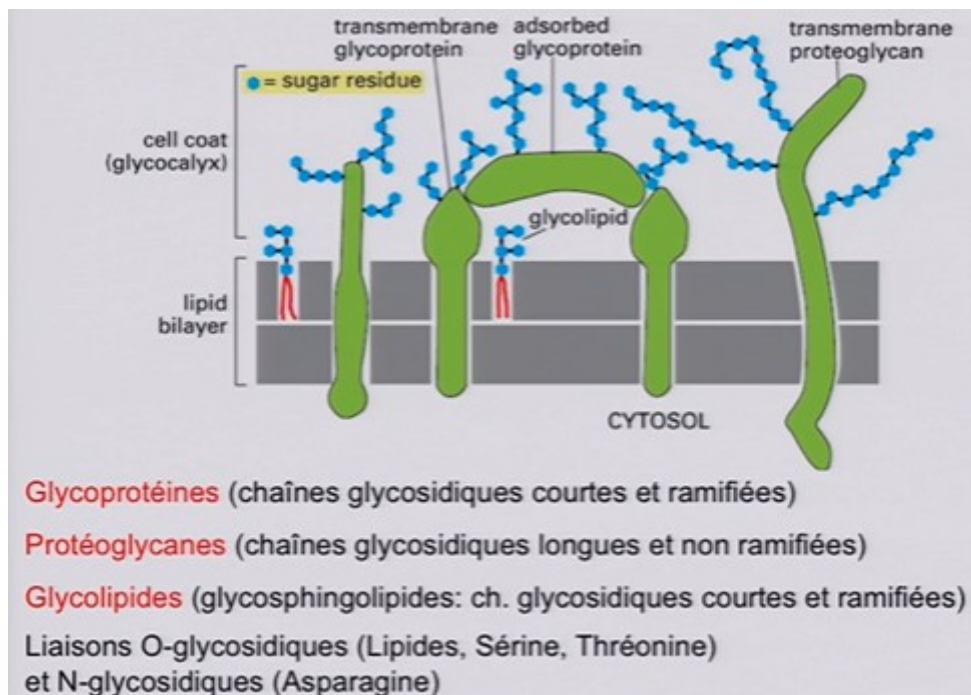
Zone périph riche en glucides → groupements oligosaccharidiques liés de façon covalente

Pas observable en ME (sauf si utilisation du rouge de ruthénium dense aux électrons).

Rouge de ruthénium → met en avant la présence de glycocalyx

Lectines → montre précisément à quel groupe les oligosacc appartiennent (+ ferritine pour pouvoir être observé en ME)

A. Constituants du glycocalyx



B. Rôles du Glycocalyx

- Protection
- Maintien de l'asymétrie mb : glycosylation empêche le passage des glycosphingolipides d'un feuillet à un autre
- Système ABO : les gr. Oligosacc sont des Ag (liés à des lipides : shingolipides ou à des protéines : glycoprotéines)
- Reconnaissance : GM1 / toxine cholérique
- Adhésion cellulaire : ex : migration des GB

Si agent infectieux → activation endothélium → interaction GB/endothélium pour permettre la migration du GB dans le tissu et éliminer l'agent infectieux.

Une des premières étapes de cette interaction met en jeu des sélectines :

→ L-sélectine (L=leucocyte) exprimé à la mb des GB

→ P-sélectine et E-sélectines exprimées au nv de l'endothélium

Sélectines avec domaines Lectine-like ont une forte affinité pour les gr oligosacc des cellules voisines (idem aux lectines) → quand le GB passe dans les vaisseaux il va être freiné par l'interaction glycocalyx des cellules leucocytaires/glycocalyx et glycocalyx cellules endothéliales/selectines leucocytaires

VI. Bilan de l'organisation de la MP

