

Retard sur gel – Application

Le but de cette rubrique est de vous expliquer comment analyser les résultats d'une expérience d'un retard sur gel, en utilisant un exemple.

Toutefois, il est important au préalable de faire le rappel suivant afin de partir sur de bonnes bases. Vous devez toujours (et cela vaut pour toutes les expériences auxquelles vous êtes confronté, quelles qu'elles soient), vous posez les trois questions suivantes avant d'effectuer l'analyse.

- 1) A quoi correspond cette technique (quel est son principe) ?
- 2) Quel est son but et quelle(s) information(s) apporte-t-elle ? En répondant à cette question vous avez presque la réponse à votre analyse.

- 3) Quelles en sont les limites ? Cette question très importante pour éviter de faire de la « science fiction ». Il faut être sûr que l'expérience choisie permet de répondre à la question expérimentale posée et surtout ne pas aller au-delà des limites de l'expérience afin d'éviter de mauvaises interprétations (ou des sur-interprétations).

Le principe :

Le retard sur gel, dit aussi EMSA (ElectroMobility Shift Assay), repose sur le fait qu'un complexe ADN-protéine ou ARN-protéine migrera moins vite dans un gel non-dénaturant que le même ADN ou un ARN nu (c'est-à-dire seul, en l'absence de la protéine). La détection du complexe s'effectue grâce au marquage radioactif de l'acide nucléique cible.

Le but :

C'est une technique permettant d'étudier une interaction entre un acide nucléique et des protéines. Elle permet de voir si une protéine (ou une partie d'une protéine) est capable de se fixer sur un ADN (ou un ARN) cible ou de mettre en évidence l'existence de site de fixation pour une protéine connue dans la séquence d'un acide nucléique en cours d'étude.

Les limites :

Cette technique ne permet pas *a priori* de savoir si l'interaction détectée est spécifique de l'acide nucléique testé (la sonde) ou si la protéine en question est capable de se fixer sur tout acide nucléique de même nature (ADN ou ARN). Pour le savoir, il faut alors compléter l'analyse par des expériences de compétition.

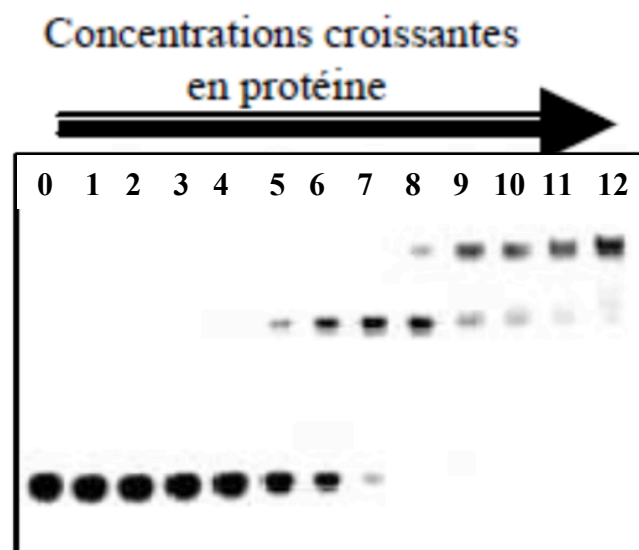
Cette technique n'indique pas non plus si la reconnaissance de l'acide nucléique par la protéine est basée sur la structure primaire de l'acide nucléique (sa séquence) et/ou sa structure secondaire (présence d'éventuelle tige-boucle par exemple).

Pour cet exemple, le code couleur est le suivant :

- la réponse attendue est donnée en **bleu** ;
- les informations explicatives (mais hors réponse attendue) sont données en **vert** ;
- les conseils et les pièges à éviter en **orange**.

Énoncé du problème :

La transcription du gène *GDI* est induite en présence de maltose dans le milieu. Il a été démontré, lors d'expériences préalables, que l'activateur transcriptionnel MalT est responsable de l'induction, en présence de maltose, de nombreux gènes. Afin de savoir si MalT régule directement le gène *GDI*, une expérience de retard sur gel a été entreprise en utilisant comme sonde la région promotrice du gène *GDI* (fragment d'ADN allant de la position -250 à +1, la numérotation étant donnée par rapport au +1 de transcription), marquée au phosphore 32 à ses extrémités 5', et la protéine MalT purifiée. Différentes quantités de protéine MalT allant de 1 à 12 ng ont été utilisées (quantités indiquées au dessus des pistes). Après incubation, les différents mélanges ont été déposés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant. Après migration, la révélation a été effectuée par autoradiographie dont le résultat est présenté ci-dessous.



Avant tout (et bien sûr en ayant au préalable reconnu une expérience de retard sur gel si cela n'est pas précisé dans le texte), il est fondamental de bien identifier la nature de la sonde.

- Est ce un ADN ? Au quel cas nous avons à faire à un EMSA, qui va nous indiquer si oui ou non la protéine se fixe bien sur le fragment d'ADN utilisé. Si ce fragment est issu d'une région promotrice, cela suggère alors que le gène correspondant est régulé au niveau de la transcription par la protéine testée.

- Est ce un ARN ? Au quel cas nous avons à faire à un REMSA, qui va nous indiquer si oui ou non la protéine se fixe sur ce fragment d'ARN. Dans ce cas cela peut nous permettre de mettre en évidence soit une régulation affectant la stabilité de l'ARN et/ou l'initiation de la traduction dans le cas par exemple d'ARNm.

Il est donc très important d'être attentif à la nature de la sonde utilisée pour correctement analyser le problème biologique étudié.

Avant de commencer l'analyse de ce résultat, vous devez déjà identifier l'expérience (ici un retard sur gel de type EMSA), énoncer clairement son but (cela vous aidera à clarifier votre pensée), rappeler en une phrase son principe et identifier les témoins. Puis procédez à l'analyse du résultat. Il est important d'utiliser un vocabulaire précis et scientifique (par exemple, ne pas utiliser le mot « tache » pour désigner une bande

de migration sur le gel). Et enfin posez une conclusion (ou éventuellement une hypothèse).

Rappels :

1) la quantité de fragment sonde est identique dans tous les puits, seule la quantité de protéine peut varier, ce qui est le cas dans cette expérience ;

2) l'autoradiographie permet uniquement de visualiser les molécules radioactives, autrement dit soit la sonde seule, soit le complexe Protéine-sonde, en raison de la radioactivité portée par la sonde. L'intensité du signal est proportionnel aux nombres de molécules sondes présentes à cet endroit dans le gel.

L'expérience présentée correspond à un EMSA, réalisé dans le but de voir si la protéine MalT se fixe ou non dans la région promotrice du gène *GDI* (région allant de la position -250 à +1). Si la protéine MalT se fixe sur la sonde, la migration de cette dernière sera alors retardée par rapport à celle de la sonde libre (laquelle constitue le témoin en piste 0).

En présence de 1 à 4 ng de protéine MalT, aucun retard n'est mis en évidence : la totalité des sondes migrent au même niveau que celui du témoin correspondant à la sonde libre (piste 0).

A partir de 5ng de MalT, un retard est mis en évidence. La faible intensité du signal indique que peu de molécules de sonde ont été fixées. Il faut donc une certaine concentration en protéine MalT en contact avec la sonde avant d'être en mesure de mettre en évidence la formation du complexe Sonde-Protéine MalT.

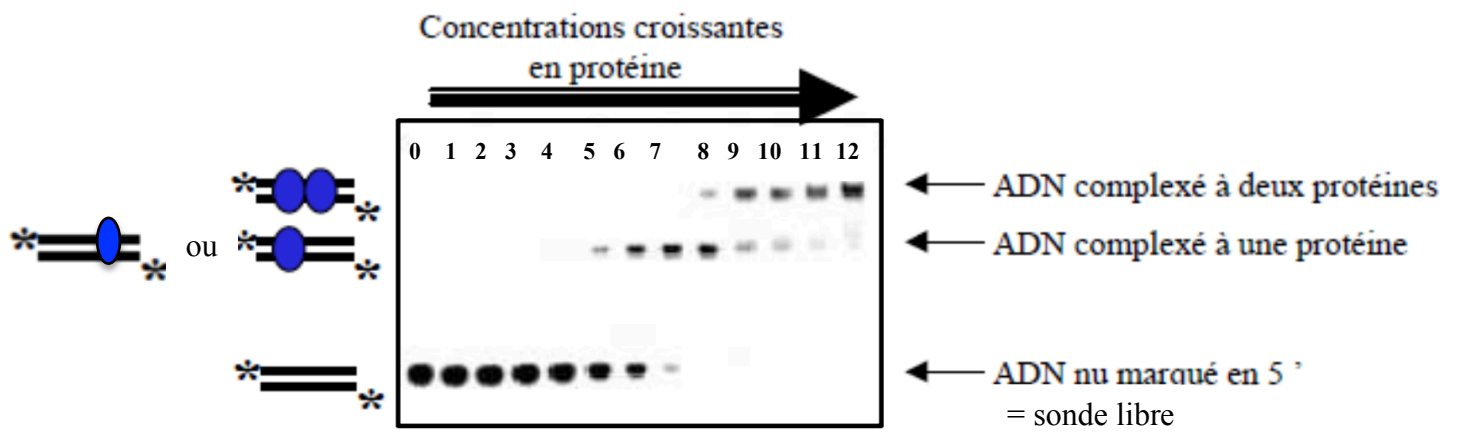
En présence de 5 à 7 ng de MalT, plus la concentration en protéine augmente et plus la proportion de complexe obtenu par la fixation de MalT sur la sonde augmente. Dans le puits 7, il ne reste quasiment plus de sonde libre, donc quasi 100% des molécules de sonde sont fixées à la protéine MalT.

En présence de 8 à 12 ng de MalT, un second niveau de retard apparaît, avec une distance de migration encore moins importante que la précédente. L'intensité du signal correspondant à ce second retard augmente avec la quantité de MalT alors qu'inversement, celle du premier retard diminue jusqu'à disparaître. Cela suggère que la sonde contient non pas un seul site mais deux sites de fixation pour la protéine MalT. Ainsi de 5 à 7 ng de MalT le complexe mis en évidence correspond à la fixation de MalT sur un des deux sites et ceci jusqu'à ce que toutes les molécules de sonde aient un de leur deux sites occupés pour une quantité de protéine MalT entre 7 et 8 ng. Puis comme la quantité de protéine MalT augmente encore, alors une seconde protéine va pouvoir se fixer sur l'autre site présent sur la sonde, c'est pourquoi en piste 8 nous avons une disparition complète des molécules de sonde libre, un fort signal pour les complexes à « une protéine » et un faible signal de plus haut poids moléculaire correspondant à des complexes comprenant deux protéines par molécule de sonde. Là encore, plus la concentration en protéine augmente et plus on augmente la proportion en complexe contenant deux protéines par rapport à ceux n'en contenant qu'une seule. Pour finir en piste 12, quasiment 100% de molécules de sonde portent deux protéines : il y a saturation des deux sites.

En conclusion : La région promotrice (-250 à +1) du gène *GDI*, possède deux sites de fixation pour la protéine MalT. La régulation transcriptionnelle du gène *GDI* par MalT se fait donc par interaction directe de MalT sur la région promotrice du gène *GDI*.

Voir schéma explicatif page suivante

Schéma résumant l'analyse du gel retard :



Attention : ici on ne peut faire la différence entre les complexes avec 1 protéine MalT sur le site 1 et ceux avec une protéine fixée sur le site 2