**Thème**: *Etude des interactions entre les protéines*

Double Hybride

*Principe d’utilisation de la technique du Double-Hybride :*

Il s’agit d’une technique de biologie moléculaire qui permet de mettre en évidence une interaction physique entre deux protéines.

Pour utiliser cette méthode, il faut utiliser deux protéines différentes. Une de ces protéines doit avoir à une de ses extrémités un site de fixation à une séquence activatrice. L’autre protéine doit activer la transcription du gène rapporteur étudié. Une fois ces deux protéines choisies, on va synthétiser deux protéines hybrides. Pour ce faireon utilise une protéine test (telle Gal4) dont une des extrémités peut se fixer à une séquence activatrice, et l'autre activer la transcription du gène rapporteur (comme lacZ) mis sous contrôle de cette séquence. Par génie génétique, on synthétise ensuite deux protéines hybrides : une constituée de l'une des extrémités de la protéine test fusionnée avec la première protéine d'intérêt, l'autre formée de l'autre extrémité fusionnée à l'autre protéine d'intérêt. Si les deux protéines interagissent physiquement, ces deux hybrides vont se rapprocher et permettre la transcription du gène rapporteur..

 *Nota :* La transcription du gène rapporteur n’aura lieu que si ces deux hybrides formés interagissent physiquement entre eux.

Cette technique a été utilisée de nombreuses fois pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* afin de mettre en évidence des gènes rapporteurs comme Gal4.

Le tableau ci-dessous permet de voir quels sont les avantages et inconvénients de cette technique.

|  |
| --- |
| **Double Hybride** |
| *Avantages* | Facile à mettre en place (après avoir fait les clonages appropriés)* Analyse qualitative
* Analyse quantitative (dépend uniquement du gène rapporteur utilisé
 |
| *Inconvénients*  | * Faux positifs si les interactions préexistent chez la levure (présence de de protéines de la même famille par exemple)
* Faux négatifs : problème d’expression des protéines cibles chez la levure ou de certains facteurs de transcription
* Non applicable aux protéines membranaires (une technique spécifique aux prot. membranaires existe.
 |
| *Applications* | * Identification des interactions
* Criblage de banque de protéines
 |

Tableau 1 : Avantages et Inconvénients de l'utilisation de double hybride (Fields et al., Nature, 1989)

Figure 1 : Principe de la technique du double hybride (FT = facteur de transcription spécifique au gène rapporteur)

GÈNE RAPPORTEUR

FT

Clivage aux protéines étudiées

PAS INTERACTIONS

INTERACTIONS

Reconstitution du FT

Activation du gène rapporteur

Coloration du milieu du culture en bleu

Grâce à X-GAL

Pas de reconstitution du FT

Pas de coloration