

## TP B3-4-5-6. Base de biologie cellulaire et moléculaire éléments de correction

### IV. 2. b. Electrophorèse en conditions natives

Exercice d'application : montrez grâce à cette électrophorèse que AHSP et l' $\alpha$ -globine interagissent de façon spécifique.

Analyse du protocole expérimental : on fait migrer en conditions **non dénaturantes** des globines  $\alpha$  ou  $\beta$  en présence ou non de AHSP. Comme cette électrophorèse est non dénaturante, les éventuelles interactions entre protéines sont **non perturbées**. Si la globine interagit avec AHSP, l'association globine-AHSP sera plus volumineuse et chargée différemment que la globine seule, et on devra donc observer une **distance de migration** différente pour la globine seule que pour globine-AHSP. La piste globine  $\beta$ -AHSP permet de tester la **spécificité** de l'interaction : en admettant qu'il y ait interaction, si on ne l'observe que pour la globine  $\alpha$  et pas pour la globine  $\beta$ , cela signifiera que l'interaction est **exclusive à la globine  $\alpha$** , c'est-à-dire **spécifique**. Enfin, on a coloré les protéines avec une molécule qui colore spécifiquement les hèmes : on ne détecte donc **que** les globines, et **pas** AHSP.

Observation : on observe que la globine  $\alpha$  migre à une distance donnée, considérée comme référence. On constate qu'une nouvelle tache apparaît lorsqu'on ajoute AHSP, avec une distance de migration plus grande. Plus la quantité de AHSP est grande, plus cette tache est intense, et plus la tache correspondant à la globine  $\alpha$  seule est peu intense. La tache correspondant à la globine  $\alpha$  seule disparaît totalement lorsque le rapport AHSP/globine est de 1.

Interprétation : on en déduit que AHSP interagit avec la globine, avec une AHSP pour une globine (rapport 1:1).

Observation : on observe que la globine  $\beta$  migre à une distance donnée, considérée comme référence. La légende du document indique même que la tache correspond en réalité à un tétramère  $\beta_4$ . Avec ajout de AHSP, la tache correspondant à la globine  $\beta$  n'est pas modifiée, et on trouve toujours une migration du tétramère au même niveau.

Interprétation : donc AHSP n'influe pas sur la migration de la globine  $\beta$ , donc AHSP n'interagit pas avec la globine  $\beta$ . On en déduit donc que AHSP interagit **spécifiquement** avec la globine  $\alpha$ .

Ces résultats n'auraient pas pu être obtenus si la protéine avait migré dans des conditions non dénaturantes.

### IV. 3. Le blotting

Exercice d'application : l'inondation du riz

Analyse du protocole expérimental : on étudie deux variétés, qui diffèrent par le génotype (qui est donc le paramètre variant). Par une électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) suivie d'un transfert sur membrane et d'une détection spécifique (western blot), on étudie la production de la protéine SLRL1 chez ces deux mutants (par l'utilisation d'anticorps anti-SLRL1). On cherche donc à connaître l'influence du génotype sur la production de la protéine SLRL1. La détection de l'actine correspond à un **témoin de charge** : l'actine est une protéine répandue dans toutes les cellules, en quantités *a priori* stables. Cette piste permet simplement de vérifier que la manipulation s'est déroulée dans de bonnes conditions :

- s'il y a une variation de la quantité d'actine, cela signifie qu'une erreur de manipulation a été faite, et les variations de la quantité de SLRL1 ne sont alors pas interprétables.
- si en revanche il n'y a aucune variation de la quantité d'actine, alors il n'y a *a priori* aucune erreur de prélèvement des protéines, et une variation observée de la quantité de SLRL1 peut effectivement être interprétée comme une variation réelle de la quantité de SLRL1 dans les cellules.

Pour l'actine, toutes les taches sont d'intensité identique, donc le témoin de charge est valide, donc l'analyse des résultats est possible.

Observation : on observe que chez M202, la quantité de SLRL1 diminue au cours des 14 jours de l'étude, alors que cette quantité reste constante chez M202(Sub1).

Interprétation : donc le génotype a une influence sur la production de la protéine SLRL1. La diminution de la production de SLRL1 chez le sauvage provoque donc une levée de l'inhibition de croissance, et donc une reprise de croissance en réponse à l'immersion. Le mutant M202(sub1) résisterait à l'immersion en conservant une taille faible, ce qui aurait pour conséquence de limiter l'épuisement des plants par une croissance trop importante.

On peut proposer l'hypothèse que M202 et M202(sub1) diffèrent par les allèles d'un gène dont la version sauvage répond à l'immersion par une diminution de l'expression du gène de SLRL1, et dont la version mutante est