

## Northern-blot – Fiche Technique

### Principe :

Les ARN présents dans l'échantillon sont séparés en fonction de leur taille sur un gel d'électrophorèse, puis transférés sur une membrane en conservant leur position relative sur le gel. Cette membrane est ensuite incubée avec une sonde marquée (par radioactivité ou autre) dirigée contre l'ARNm étudié. Celle-ci en s'hybridant par complémentarité de séquence avec l'ARNm cible va permettre sa révélation. L'abondance relative de cet ARNm se traduira par un signal plus ou moins intense et large.

### But :

Le northern-blot permet de visualiser un ARNm précis parmi tous les ARN présents dans l'échantillon. Il donne accès à deux informations : d'une part, une information qualitative avec la détermination de la taille de l'ARNm étudié. Et d'autre part, une information semi-quantitative concernant la quantité de cet ARNm accumulé dans l'échantillon.

### Limites :

1) Expérience **semi-quantitative** : le northern-blot donne accès à une quantité relative, c'est-à-dire propre à l'échantillon. Pour pouvoir comparer différents échantillons entre eux, il faut normaliser les dépôts sur le gel grâce à un **témoin de charge** (voir son rôle et utilisation à la fin de cette fiche).

2) Le northern-blot permet d'estimer l'**accumulation** d'un ARNm précis, c'est-à-dire la somme de sa synthèse et de sa stabilité. Par conséquent, l'analyse d'un northern ne reflète pas directement le taux de transcription du gène codant l'ARNm étudié, la demi-vie de cet ARN intervient également.

### Étapes de réalisation :

#### - 1) Extraction des ARN totaux (ARNr + ARNt + ARNm ...)

(Pour les Eucaryotes, les ARNm peuvent être isolés des ARN ribosomiques ou des ARN de transfert, grâce à leur queue polyadénylée).

#### - 2) Dénaturation des ARN.

Par chauffage à 95°C ou par action d'agents dénaturants (comme le glyoxal ou la formaldéhyde).

- Buts : 1) Éliminer les structures secondaires pour que la migration s'effectue uniquement en fonction de la taille.  
2) Rendre les ARN accessibles à l'hybridation avec une sonde.

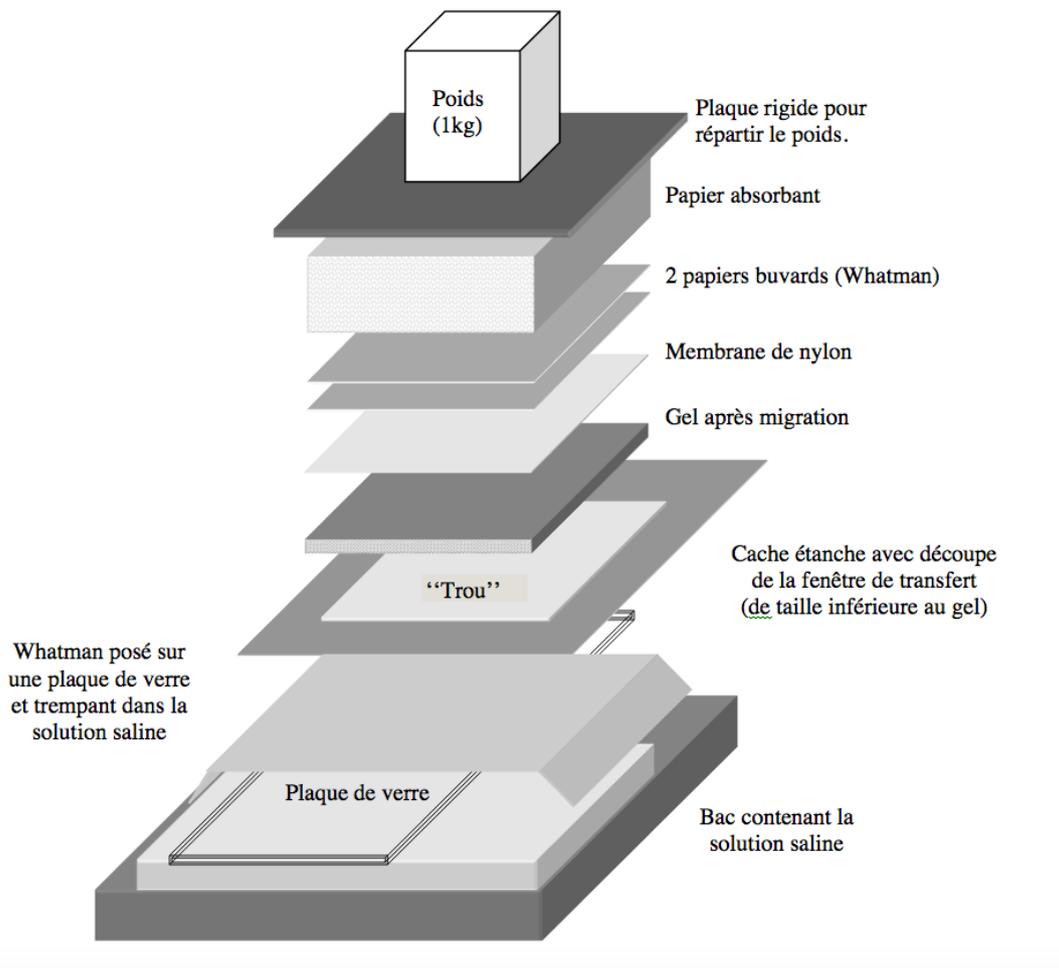
**- 3) Migration électrophorétique en gel d'agarose.**

Le gel et le tampon de migration peuvent également contenir des agents dénaturants. (Voir Poly d'annexe page 57)

But : Séparation des molécules d'ARN en fonction de leur taille.

**- 4) Transfert sur une membrane** de nylon ou de nitrocellulose.

Voir Schéma ci-dessous



Pourquoi effectuer un transfert sur une membrane ?

Pour deux raisons liées à l'étape d'hybridation :

- 1) La température d'hybridation : afin d'avoir une hybridation spécifique (100% d'homologie entre la sonde et l'ARNm cible) cette hybridation (ainsi que les lavages) doit avoir lieu à forte température (65°C ou 42°C si effectuée en présence d'agents dénaturants). Or cette température peut faire fondre le gel d'agarose.
- 2) Les étapes d'hybridation et de lavage nécessitent une certaine agitation, incompatible avec les gels d'agarose ou de polyacrylamide, qui sont trop fragiles. Par contre la membrane de nylon résiste à ces conditions.

### - 5) Hybridation avec la sonde **dénaturée**

Rappel : une sonde = un fragment d'ADN ou d'ARN rendu détectable par un marquage spécifique (voir le poly d'annexe page 60-61)

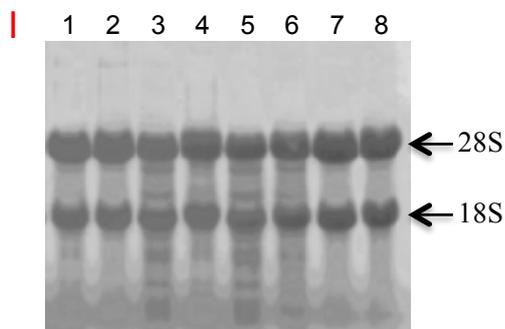
### - 6) Lavages dans un tampon

Élimination des sondes fixées directement sur la membrane ou sur d'autres ARN de façon non spécifique.

### - 7) Révélation de la position des sondes.

Pour une sonde radioactive, la révélation de la sonde sera effectuée à l'aide d'un film autoradiographique (voir Poly d'annexe page 61).

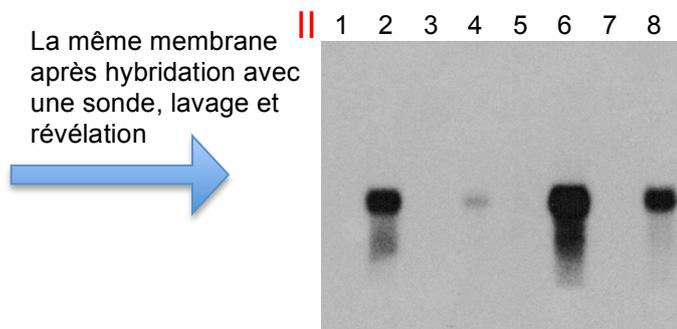
## Quelques illustrations :



Photographie de la membrane de nylon après coloration des ARN par du bleu de méthylène.

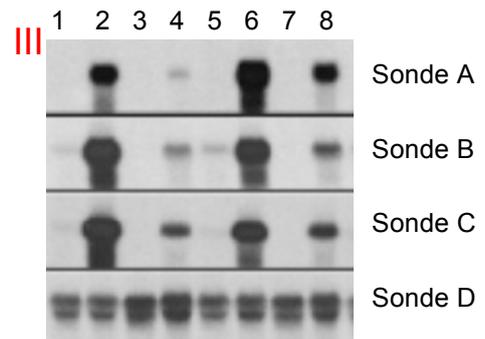
Les ARN ribosomiques 28S et 18S sont indiqués. Les ARNr 5S et les ARNt, ARN de petites tailles, ne sont pas visibles car sortis du gel au cours de la migration. Les ARNm, minoritaires en quantité, sont à peine visibles sous forme d'un « smear », une traînée, s'étalant du 28S jusqu'au bas du gel.

Il s'agit ici d'ARN extrait d'un organisme eucaryote, le champignon *Aspergillus nidulans*.



Autoradiogramme : La membrane a été mise en contact avec une sonde radioactive. Après lavage, une autoradiographie a été réalisée.

**Remarque :** Dans les publications scientifiques, les différentes hybridations réalisées sur un même northern sont présentées sous forme d'un montage sur la même figure. Voir ci-dessous.



### Utilisation du témoin de charge :

Les résultats obtenus avec la sonde A seule (photo II) sont en l'état non interprétables. En effet, dans l'absolu, le signal de forte intensité pour l'ARNm A dans la piste 2 par rapport au signal faible dans la piste 4 peut être interprété de deux façons : soit il y a beaucoup plus d'ARNm A accumulé dans l'échantillon déposé en puits 2 par rapport à celui déposé dans le puits 4. Soit il y a autant d'ARNm A dans les deux échantillons, mais la quantité d'ARN total déposée est plus grande dans le puits 2 par rapport au puits 4, en raison par exemple d'un meilleur rendement d'extraction ou d'une concentration en cellules supérieure dans l'échantillon utilisé pour faire l'extraction ...etc. De même, l'absence de signal pour la sonde A dans la

piste 1 pourrait avoir plusieurs explications : pas d'accumulation de l'ARNm A dans l'échantillon déposé en puits 1, ou pas d'ARN total déposé ou ARN dégradé suite à une contamination de l'échantillon par une RNase.

Pour avoir le droit de comparer les intensités des signaux obtenus avec la sonde A dans les différentes pistes (et pour pouvoir trancher entre les hypothèses), nous devons effectuer une hybridation avec une autre sonde qui nous permettra de révéler un **témoin de charge**. Dans l'exemple donné en photo III, il s'agit de l'ARNm révélé par la sonde D. Le témoin de charge correspond à un ARNm produit de façon constitutive, c'est-à-dire accumulé en quantité constante quel que soient les conditions utilisées pour la culture des cellules ou la nature des tissus d'où sont extraits les ARN ou bien les différentes souches utilisées. Puisque cet ARNm témoin est accumulé de façon constante, la variation de l'intensité de son signal dans les pistes sera le reflet de la quantité d'ARN total extraite et déposée dans chaque puits. Dans l'exemple donné en photo III, les échantillons d'ARN déposés en piste 3 et 4 contiennent légèrement plus d'ARN totaux que ceux des autres pistes. Il nous faut donc normaliser les dépôts effectués. Pour cela, on quantifie sur l'image de la révélation le signal obtenu avec la sonde A pour chaque piste (grâce à un logiciel spécifique qui calcule le nombre de pixels dans chaque signal) et on fait le même travail avec les signaux obtenus pour la sonde D révélant le témoin de charge. Puis on calcule pour chaque piste le rapport « signal Sonde A » divisé par « signal Sonde du témoin de charge », afin de normaliser les données. Et ce sont les données normalisées (les différents rapports ainsi obtenus) qui seront comparées entre elles. Quand le témoin de charge est identique dans toutes les pistes (même signal), alors on peut directement faire la comparaison entre les différentes pistes pour un signal donné, sans effectuer cette étape de normalisation.

**La fiche northern-blot Application** vous montre comment analyser un résultat de northern-blot.