

Northern-blot – Application

Le but de cette rubrique est de vous expliquer comment analyser les résultats d'une expérience de northern-blot, en utilisant deux exemples, mais avant un petit rappel, à faire systématiquement sur votre brouillon afin de partir sur de bonnes bases : Vous devez toujours (quelque soit l'expérience présentée, pas uniquement un northern-blot), vous posez trois questions avant d'effectuer l'analyse :

- A quoi correspond cette technique ? Autrement dit quel est son principe ?
- Quelle information apporte-t-elle ? Quel est son but ? En répondant à cette question vous avez presque la réponse à votre analyse.
- Quelles en sont les limites ? 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'expériences afin d'éviter de mauvaises interprétations.

Le principe : Séparation des ARN présents dans l'échantillon en fonction de leur taille sur un gel d'électrophorèse, puis transfert sur une membrane. Hybridation avec une sonde marquée et complémentaire à l'ARNm cible puis révélation. La quantité de cet ARNm se traduira par un signal plus ou moins intense et large.

Le but : Le northern-blot permet de visualiser un ARNm précis, parmi tous les ARN présents dans l'échantillon et apporte une information qualitative (la taille de l'ARNm étudié) et une information semi-quantitative (l'accumulation de cet ARNm dans l'échantillon).

Les 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 quantifier puis normaliser les dépôts grâce à un **témoin de charge**.

2) Le northern-blot permet d'estimer l'**accumulation** d'un ARNm précis, c'est-à-dire à 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 étudié, la demi-vie de l'ARNm intervient également.

Attention : sur un northern-blot c'est l'ARN en entier (une molécule complète) qui est détecté par la sonde et non un fragment !

Pour les deux exemples qui suivent, 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 pièges ou les « dangers » en orange.

Énoncé du problème I :

Des chercheurs s'intéressent à la régulation de l'expression du gène *GDI* (*GDI* = Gène D'Intérêt...) chez un microorganisme eucaryote cultivé sous deux conditions (conditions 1 et 2). Un northern-blot a donc été réalisé en déposant des échantillons d'ARN totaux extraits à partir des cultures effectuées dans les conditions 1 et 2. La membrane de northern a été hybridée avec deux sondes radiomarquées :

- la sonde *GDI*, correspondant à un fragment du gène *GDI*.
- la sonde *acnA*, correspondant à un fragment du gène *acnA* codant l'actine.

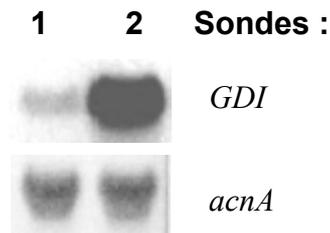
Ce gène *acnA* est exprimé de façon constitutive dans les deux conditions de culture. Les résultats de l'autoradiographie sont présentés figure 1.

Figure 1 : Autoradiogramme du Northern blot A

ARNs extraits d'un eucaryote cultivé sous deux conditions différentes (1 et 2) :

La membrane a été hybridée avec deux sondes :

- La sonde *GDI* : notre gène d'intérêt.
- La sonde du gène *acnA* (codant l'actine).



Question 1 : Analysez ces résultats. Que pouvez-vous en conclure ?

Première chose à faire : identifier et analyser le témoin de charge :

Le témoin de charge correspond à un ARNm produit de façon constitutive quelque soit les conditions analysées et qui va nous permettre de normaliser les dépôts. En effet l'accumulation de cet ARNm étant constante, toute différence entre les pistes au niveau de l'intensité des signaux pour cet ARN, traduira une différence de quantité d'ARN total déposée (l'ARN total faisant référence à tous les ARN présents dans les échantillons à l'issue de l'extraction = les ARNr + ARNt + ARNm ...). Dans notre exemple ici le témoin de charge correspond à l'ARNm *acnA*.

Donc marche à suivre :

- 1) Analyser le résultat pour l'ARN *acnA* (Témoin de charge)
- 2) Analyser le résultat pour l'ARN *GDI*
- 3) conclure.

Rappel : l'intensité d'un signal sur un autoradiogramme est proportionnelle à la quantité de sonde (mise en excès) hybridée sur l'ARNm étudié et donc retenue sur la membrane. Donc plus le signal est fort et plus l'ARNm correspondant est présent en grande quantité dans l'échantillon.

Analyse du témoin de charge (ARNm *acnA*) :

Dans l'expérience présentée, l'ARNm révélé par la sonde *acnA* constitue le témoin de charge. Les signaux obtenus avec cette sonde sont identiques dans les 2 pistes, par conséquent, cela indique que la même quantité d'ARN totaux a été déposée dans les puits 1 et 2. Il est donc possible d'analyser (comparer) directement, sans normaliser, les résultats obtenus avec la sonde *GDI*.

Autrement dit : cela nous indique que toute variation de l'intensité du signal entre les pistes 1 et 2 pour notre gène *GDI* ne sera pas due à un problème de manipulation

(quantités différentes d'ARN déposées dans les puits) mais sera bien le reflet d'une différence d'accumulation de nos ARNm *GDI* dans l'eucaryote cultivé en condition 1 et en condition 2.

Analyse des résultats pour la sonde *GDI* :

On observe un signal pour le gène *GDI* dans les 2 pistes, mais ce signal est plus fort dans la piste 2. Sachant, grâce à l'hybridation de la sonde révélant l'ARNm de l'actine, qu'il y a eu autant d'ARN totaux déposés dans les deux puits, nous pouvons en déduire que l'accumulation du messager du gène *GDI* est plus forte dans l'eucaryote cultivé en condition 2 que dans celui cultivé en condition 1.

Attention : ici il ne faut surtout pas dire : Plus forte synthèse d'ARN *GDI* en condition 2 ou le gène *GDI* est plus transcrit en condition 2. Pourquoi : Car le northern-blot permet de suivre une accumulation d'ARNm à un temps donné, or l'accumulation correspond à la somme de la synthèse et de la stabilité.

En effet, il y a trois façons d'augmenter la quantité relative d'un ARNm donné dans une cellule : 1) en synthétiser plus ou 2) en dégrader moins ou 3) en synthétiser plus tout en en dégradant moins. Donc la **demi-vie** des ARNm entre aussi en ligne de compte. Si vous parlez uniquement de la synthèse (c'est-à-dire la transcription) vous risquez de faire fausse route et d'omettre une régulation jouant sur la stabilité de l'ARNm étudié, et donc de vous trompez dans votre analyse !

Conclusion :

D'après ce northern-blot, le niveau d'accumulation de l'ARNm *GDI* est plus fort en condition de culture 2, en raison :

- 1) Soit d'une régulation transcriptionnelle (augmentation du taux de synthèse en condition 2 par rapport à la 1)
- 2) Soit d'une régulation post-transcriptionnelle (stabilisation de l'ARNm *GDI* en condition 2 ou dégradation accrue en condition 1)
- 3) Soit les deux niveaux de régulation ensemble.

Question 2 : Avec un simple résultat de northern blot peut-on conclure directement à une régulation transcriptionnelle ou bien est-ce impossible ? Justifiez votre réponse.

Il est effectivement impossible de conclure directement à une régulation de la transcription avec un résultat de northern-blot car cette technique donne accès à l'accumulation des ARNm et non uniquement à la synthèse de cet ARNm. On peut néanmoins effectuer par northern-blot un suivi de la cinétique de dégradation des ARNm, afin d'en déterminer la demi-vie, mais cela nécessite de bloquer toute nouvelle initiation de la transcription en cultivant les cellules ou l'organisme entier étudié en présence d'un composé chimique ayant cette action.

En résumé, en enlevant les parties vertes et orange, voici comment on analyse une expérience de northern-blot :

Des chercheurs s'intéressent à la régulation de l'expression du gène *GDI* (*GDI* = Gène d'intérêt...) chez un microorganisme eucaryote cultivé sous deux conditions (conditions 1 et 2). Un northern-blot a donc été réalisé en déposant des échantillons d'ARN totaux extraits à partir des cultures effectuées dans les conditions 1 et 2. La membrane de northern a été hybridée avec deux sondes radioactives :

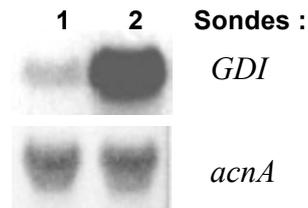
- la sonde *GDI*, correspondant à un fragment du gène *GDI*.
 - la sonde *actA*, correspondant à un fragment du gène *actA* codant l'actine. Ce gène *actA* est exprimé de façon constitutive dans les deux conditions de culture.
- Les résultats de l'autoradiographie sont présentés figure 1.

Figure 1 : Autoradiogramme du Northern blot A

ARNs extraits d'un eucaryote cultivé sous deux conditions différentes (1 et 2) :

La membrane a été hybridée avec deux sondes :

- La sonde *GDI* : notre gène d'intérêt.
- La sonde du gène *acnA* (codant l'actine).



Question 1 : Analysez ces résultats. Que pouvez-vous en conclure ?

Analyse du témoin de charge (ARNm *acnA*) :

Dans l'expérience présentée, l'ARNm révélé par la sonde *acnA* constitue le témoin de charge. Les signaux obtenus avec cette sonde sont identiques dans les 2 pistes, par conséquent, cela indique que la même quantité d'ARN total a été déposée dans les puits 1 et 2. Il est donc possible d'analyser directement, sans normaliser, les résultats obtenus avec la sonde *GDI*.

Analyse des résultats pour la sonde *GDI* :

On observe un signal pour le gène *GDI* dans les 2 pistes, mais ce signal est plus fort dans la piste 2. Sachant, grâce à l'hybridation de l'ARNm de l'actine, qu'il y a eu autant d'ARN totaux déposés dans les deux puits, nous pouvons en déduire que l'accumulation de l'ARNm du gène *GDI* est plus forte dans cet organisme cultivé en condition 2 que dans celui cultivé en condition 1.

Conclusion :

D'après ce northern-blot, le niveau d'accumulation de l'ARNm *GDI* est plus fort en condition de culture 2, en raison :

- 1) Soit d'une régulation transcriptionnelle (augmentation du taux de synthèse en condition 2 par rapport à la 1)
- 2) Soit d'une régulation post-transcriptionnelle (stabilisation de l'ARNm *GDI* en condition 2 ou dégradation accrue en condition 1)
- 3) Soit les deux niveaux de régulation ensemble.

Question 2 : Avec un simple résultat de northern blot peut-on conclure directement à une régulation transcriptionnelle ou bien est-ce impossible ? Justifiez votre réponse.

Il est effectivement impossible de conclure directement à une régulation de la transcription avec un résultat de northern-blot car cette technique donne accès à l'accumulation des ARNm. On peut néanmoins effectuer par northern-blot un suivi de la cinétique de dégradation des ARNm, afin d'en déterminer la demi-vie, mais cela nécessite de bloquer toute nouvelle initiation de la transcription dans cet organisme en cultivant des cellules ou l'organisme entier étudié en présence d'un composé chimique ayant cette action.

Comme vous pouvez le constater, l'analyse d'un northern-blot ne se borne pas à dire : « on voit une tache plus grosse dans le puits 2 par rapport au puits 1, alors que pour *acnA* c'est les mêmes taches. »

NON ! Non seulement le mot tache est totalement inapproprié et ne doit pas être utilisé, qu'il s'agisse d'une analyse de western-, de northern-, southern-blot, d'une simple migration électrophorétique, d'un retard sur gel, etc, mais l'analyse d'un northern-blot, comme de tout autre résultat d'expérience, nécessite une procédure rigoureuse, méthodique, une argumentation (justification) systématique et une utilisation de la bonne terminologie.

Énoncé du problème II :

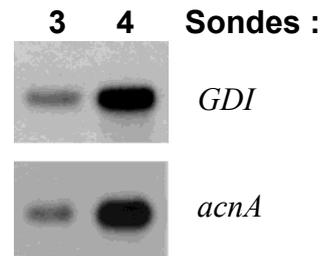
Deux nouvelles conditions de culture sont testées (conditions 3 et 4) afin de voir leur impact sur l'accumulation de l'ARNm *GDI*. Les résultats de l'autoradiographie sont présentés figure 2.

Figure 2 : Autoradiogramme du northern blot B

ARNs extraits d'un eucaryote cultivé sous deux conditions différentes (3 et 4) :

La membrane a été hybridée avec deux sondes :

- La sonde *GDI* : notre gène d'intérêt.
- La sonde du gène *acnA* (codant l'actine).



Question 1 : Analysez ces résultats. Que pouvez-vous en conclure ?

Donc on reprend le même schéma d'analyse que précédemment :

- 1) analyse du témoin de charge
- 2) analyse du résultat avec la sonde *GDI*
- 3) conclusion.

Analyse du témoin de charge (ARNm *acnA*) :

Le signal obtenu avec la sonde *acnA* est beaucoup moins intense dans la piste 3 par rapport à la piste 4. Cela indique qu'une quantité d'ARN totaux plus faible a été déposée dans le puits 3 par rapport au puits 4. Par conséquent l'analyse de ce northern-blot ne peut s'effectuer qu'après quantification et normalisation des dépôts.

Il ne faut pas oublier que l'ARNm *acnA* est notre témoin de charge, que sa quantité dans la cellule est constante et identique en condition 3 ou 4. Donc si on observe un signal différent entre les pistes 3 et 4, cela indique que les quantités d'ARN totaux déposées sont différentes. En effet, cette quantité va dépendre :

- d'une part de la quantité de cellule qui a été utilisée pour réaliser l'extrait. En partant du principe que dans une cellule donnée il y a une quantité **Q** d'ARN total (donc q d'ARNm *acnA*), si vous utilisez 1000 cellules vous aurez 1000 Q d'ARN dans votre extrait au maximum, et 100 Q si vous avez utilisé 100 cellules. Or la densité cellulaire est variable d'une culture à une autre, notamment en raison de conditions de culture différentes (par exemple : Concernant la source de carbone, les bactéries assimilent plus facilement le glucose que le lactose, elles proliféreront donc mieux sur Milieu + glucose par rapport au milieu + lactose).

- D'autre part, du rendement de l'extraction. Ce rendement est variable d'un extrait à un autre (y compris au sein d'une même souche cultivée dans les mêmes conditions).

Autrement dit, en théorie, pour chaque extrait d'ARN réalisé sur des cellules on peut obtenir une quantité d'ARN total extraite = $n \times Q \times r$

n = nombre de cellules

Q = quantité d'ARN totale présente dans une cellule

r = rendement (varie entre 0 et 1)

n et r sont variables d'un extrait à un autre.

Mais surtout vous n'avez pas le droit de dire que l'ARNm *acnA* est moins présent dans la condition 3 par rapport à la 4. C'est par définition faux, car on sait que cet ARNm est accumulé de façon constante. Par conséquent, c'est la quantité d'ARN totaux déposée par puits qui varie entre les puits 3 et 4.

Normalisation des dépôts :

Ici cette normalisation peut-être réalisée aisément :

On remarque également que l'intensité du signal obtenu avec la sonde *GDI* suit les mêmes variations que celles du signal *acnA* : plus faible en 3 qu'en 4, avec globalement le même rapport entre signal *GDI* / signal *acnA* pour chaque piste.

Si cela n'était pas le cas, les valeurs des rapports d'intensités des signaux (Signal *GDI* / Signal *acnA*) vous aurez été proposées. L'intensité d'un signal est déterminé sur l'image du gel grâce à un logiciel capable de calculer le nombre de pixels contenus dans ce signal.

Analyse des résultats pour la sonde *GDI* :

Par conséquent, l'ARNm du gène *GDI* est accumulé de la même façon dans les deux conditions. Autrement dit : les conditions de culture utilisées en 3 et en 4 n'interviennent pas sur le taux d'accumulation de l'ARNm *GDI*.

Conclusion :

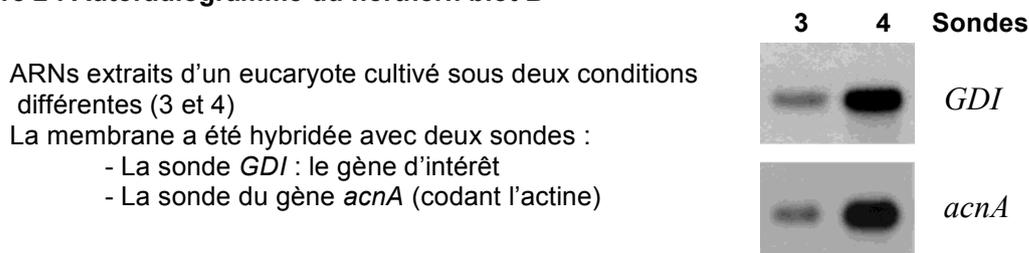
Les conditions de culture 3 ou 4 n'ont pas d'impact sur le taux d'accumulation de l'ARNm du gène *GDI*, mais cela ne veut pas dire que les niveaux de synthèse ou de dégradation ne sont pas modifiés, c'est la résultante entre « synthèse et dégradation » qui est l'Accumulation de l'ARNm qui reste constante.

Remarque : vous avez bien compris le rôle du témoin de charge (permettre de comparer les signaux obtenus entre les différentes pistes pour une MÊME sonde *GDI*). Mais attention si jamais nous suivons l'expression de plusieurs gènes (gène *GDI*, gène *HEJ* ou gène *IFK* ... etc) il est formellement interdit de comparer les signaux entre sondes qui ciblent des ARNm différents (signal piste 1 de l'ARNm *GDI* avec celui de l'ARNm *HEJ* de la même piste), car quand on compare des signaux obtenus avec différentes sondes, une autre variable entre en jeu : l'activité spécifique de chaque sonde, c'est-à-dire la quantité de radioactivité incorporée par mole d'ADN qui varie entre deux sondes différentes.

En résumé, en enlevant les parties vertes et orange, voici comment on analyse une expérience de northern-blot :

Deux nouvelles conditions de culture sont testées (conditions 3 et 4) afin de voir leur impact sur l'accumulation de l'ARNm *GDI*. Les résultats de l'autoradiographie sont présentés figure 2.

Figure 2 : Autoradiogramme du northern blot B



Question 1 : Analysez ces résultats. Que pouvez-vous en conclure ?

Analyse du témoin de charge (ARNm *acnA*) :

Le signal obtenu avec la sonde *acnA* est beaucoup moins intense dans la piste 3 par rapport à la piste 4. Cela indique qu'une quantité d'ARN totaux plus faible a été déposée dans le puits 3 par rapport au puits 4. Par conséquent l'analyse de ce northern-blot ne peut s'effectuer qu'après quantification des signaux et normalisation des dépôts.

Normalisation des dépôts :

On remarque également que l'intensité du signal obtenu avec la sonde *GDI* suit les mêmes variations que celles du signal *acnA* : plus faible en 3 qu'en 4, avec globalement le même rapport entre signal *GDI* / signal *acnA* pour chaque piste.

Analyse des résultats pour la sonde *GDI* :

Par conséquent, l'ARNm du gène *GDI* est accumulé de la même façon dans les deux conditions. Autrement dit : les conditions de culture utilisées en 3 et en 4 n'interviennent pas sur le taux d'accumulation de l'ARNm *GDI*.

Conclusion :

Les conditions de culture 3 ou 4 n'ont pas d'impact sur l'accumulation de l'ARNm du gène *GDI*, mais cela ne veut pas dire que les niveaux de synthèse ou de dégradation ne sont pas modifiés, c'est la résultante entre les deux, appelée Accumulation qui reste constante.