

Western-blot – Application

Le but de cette rubrique est de vous expliquer comment analyser les résultats d'une expérience de western-blot, en utilisant deux exemples.

Mais avant toute chose, un petit rappel, à faire systématiquement sur votre brouillon afin de partir sur de bonnes bases : vous devez toujours (et ceci vaut pour toute expérience et pas seulement pour un western-blot), vous poser trois questions avant d'effectuer l'analyse.

- 1) A quoi correspond cette technique ? Autrement dit, quel est son principe ?
- 2) Quelle(s) information(s) apporte(nt)-elle ? Quel est son but ? En répondant à cette question vous avez presque la réponse à votre analyse.
- 3) Quelles en sont les limites ? Cette dernière question est 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.

Le principe : Les protéines présentes dans l'échantillon sont séparées en fonction de leur taille en utilisant la technique du **SDS-PAGE**, puis transférées sur une membrane en conservant leur position relative sur le gel. La révélation de la protéine étudiée s'effectue grâce à des anticorps dirigés contre cette protéine. L'abondance relative de la protéine cible se traduira par un signal plus ou moins intense et large.

Le but : Le western-blot a pour but de visualiser une espèce particulière de protéine au sein d'un extrait cellulaire, afin d'en connaître sa taille et son niveau d'**accumulation**.

Les limites :

1) Expérience **semi-quantitative** : tout comme le northern-blot, le western-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 grâce à un **témoin de charge**.

2) Le western-blot donne accès à l'**accumulation** d'une protéine précise, c'est-à-dire à la somme de sa synthèse et de sa disparition (stabilité). Par conséquent, les résultats d'un western ne reflètent pas directement le **taux de synthèse*** de la protéine identifiée, la demi-vie de cette protéine intervient également.

* **Attention** : Ici, le taux de synthèse d'une protéine n'est pas synonyme uniquement de taux de traduction (voir fiche technique et ci-dessous)

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 à éviter sont en **orange**.

Énoncé du problème :

Des chercheurs s'intéressent à la régulation de l'expression de deux protéines, la protéine A et la protéine B chez un microorganisme eucaryote cultivé en présence (+) ou non (-) d'hème (source de fer). Un western-blot a donc été réalisé en déposant des échantillons de protéines extraites à partir des cultures effectuées dans les différentes conditions. Trois anticorps primaires ont été mis en contact avec la membrane de western-blot :

- un Ac anti-protéine A ;
- un Ac anti-protéine B ;
- un Ac anti-actine.

Il est rappelé que l'actine est exprimée de façon constitutive dans les différentes conditions de culture utilisées.

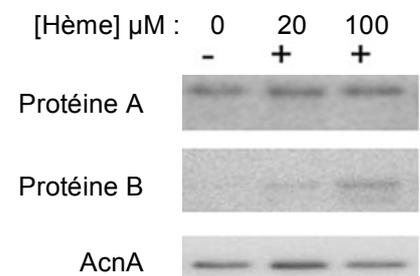
La position des Ac I sur la membrane est révélée par la fixation d'un anticorps secondaire (Ac II) couplé à une peroxydase, laquelle émet des photons en présence de son substrat, le luminol.

Les résultats sont présentés figure 1.

Figure 1 : Résultats du western-blot

Extraits protéique issus du microorganisme eucaryote cultivé en présence (+) ou non (-) d'hème. La concentration en hème est indiquée au dessus.

Les trois protéines immuno-détectées par les trois Ac I sont indiquées sur le côté.



Question 1 : Analysez les résultats obtenus pour la protéine A. Que pouvez-vous en conclure ?

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

Le témoin de charge correspond à une protéine accumulée de façon identique quelles que soient les conditions analysées et qui va nous permettre de normaliser les dépôts. En effet l'accumulation de cette protéine étant constante, toute différence entre les pistes au niveau de l'intensité des signaux pour cette protéine, traduira une différence de quantité de protéines totales (ensemble des protéines présentes dans l'extrait) déposée. Dans notre exemple, le témoin de charge correspond à la protéine actine.

La marche à suivre est donc la suivante :

- 1) analyser le résultat pour la protéine Actine (Témoin de charge) ;
- 2) analyser le résultat pour la protéine A ;
- 3) conclure (surtout ne pas oublier cette partie !).

Rappel : pour de quantités équivalentes de protéines totales déposées, plus le signal est fort et plus la protéine reconnue par l'Ac I correspondant est présente en grande quantité dans l'échantillon.

Analyse du témoin de charge (Protéine Actine) :

Dans l'expérience présentée, la protéine actine constitue le témoin de charge. Les signaux obtenus pour cette protéine sont quasiment identiques dans les 3 pistes, on note un signal très légèrement supérieur pour le dépôt central. Par conséquent, cela indique que la même quantité de protéines totales a été déposée dans les puits 1 et 3, et très légèrement plus dans le puits 2. Nous devons en tenir compte dans l'analyse des résultats obtenus pour les protéines A et B.

Autrement dit : cela nous indique que toute variation importante de l'intensité du signal entre les 3 pistes pour nos protéines A et B ne sera pas due à un problème de manipulation (quantités différentes de protéines déposées dans les puits) mais sera bien le reflet d'une différence d'accumulation de nos protéines A et B en fonction de la concentration en hème.

Analyse des résultats pour la protéine A:

On observe un signal pour la protéine A d'intensité quasiment identique dans les trois pistes, avec toutefois un niveau très légèrement supérieur dans la piste 2. En fait, les variations d'intensité du signal de la protéine A suivent celles observées pour l'actine.

Conclusion : l'accumulation de la protéine A n'est pas affectée par la concentration en hème dans le milieu de culture.

Question 2 : Analysez les résultats obtenus pour la protéine B. Que pouvez-vous en conclure ?

Contrairement à la protéine A, on observe que l'intensité du signal varie en fonction de la présence en hème dans le milieu de culture. Ainsi, le taux d'accumulation de la protéine B augmente en fonction de la concentration en hème.

Attention : **ici il ne faut surtout pas dire** « Plus forte synthèse de protéine B en présence d'hème ». Pourquoi ? Car le western-blot permet de suivre l'accumulation d'une protéine, or l'accumulation correspond à la somme de la synthèse et de la dégradation (stabilité). En effet, il y a trois façons d'augmenter la quantité relative d'une protéine donnée dans une cellule : 1) en synthétiser plus ; 2) en dégrader moins ; 3) en synthétiser plus tout en en dégradant moins. Donc la **demi-vie** de la protéine entre aussi en ligne de compte. Si vous parlez uniquement de synthèse vous risquez de faire fausse route et d'omettre une régulation jouant sur la stabilité de la protéine étudiée (régulation post-traductionnelle), et donc de vous tromper dans votre analyse !

Conclusion : le niveau d'accumulation de la protéine B augmente avec la concentration en hème, en raison :

- 1) soit d'une synthèse accrue de la protéine en présence d'hème (attention ici sans information sur l'accumulation de l'ARNm correspondant, on ne peut pas conclure directement à une régulation au niveau de la traduction – voir ci-dessous) ;

- 2) Soit d'une stabilisation accrue ou dégradation diminuée de la protéine B en présence d'hème
- 3) Soit encore une addition des phénomènes 1) et 2).

Question 3 : Avec un simple résultat de western blot, peut-on conclure directement à une régulation traductionnelle ou bien est-ce impossible ? Justifiez votre réponse.

Il est effectivement impossible de conclure directement à une régulation traductionnelle (variation du taux de traduction) avec un simple résultat de western-blot et ceci pour deux raisons.

- 1) Comme signalé précédemment, cette technique donne accès à l'accumulation des protéines et non uniquement à la synthèse de cette protéine. On peut néanmoins effectuer par western-blot un suivi de la cinétique de dégradation de la protéine, afin d'en déterminer la demi-vie, mais cela nécessite de bloquer toute nouvelle initiation de la traduction *in vivo* en cultivant l'organisme étudié en présence d'un inhibiteur de la traduction ayant cette action.

- 2) Il ne faut pas oublier que la variation du taux de traduction n'est pas le seul moyen de faire varier le taux de synthèse d'une protéine. En effet, si le taux d'accumulation d'un ARNm augmente, soit en augmentant son taux de transcription et/ou sa demi-vie, alors à taux de traduction constant, cela aboutira à une augmentation dans les cellules de la quantité de la protéine codée par cet ARNm.

Il faut donc avoir également des informations sur l'accumulation de l'ARNm correspondant à la protéine étudiée avant de pouvoir conclure.

Question 4 : Peut-on considérer que la protéine A est plus accumulée dans les cellules que la protéine B en présence de 100 μM d'hème dans le milieu de culture ? Justifiez votre réponse.

La réponse est NON !. On ne peut pas comparer les intensités de signaux obtenus avec la révélation de l'Ac I dirigé contre la protéine A avec ceux obtenus pour l'Ac II dirigé contre la protéine B, et ceci pour plusieurs raisons :

- 1) l'Ac II n'a pas forcément la même affinité *chacun des deux* Ac I (une telle différence d'affinité aurait pour conséquence de faire varier la quantité d'Ac II fixée et donc la quantité d'enzyme peroxydase, ce qui aboutirait à une variation d'intensité du signal, à savoir de l'émission des photons) ;

- 2) les deux Ac I n'ont pas non plus les mêmes affinités *vis-à-vis* de leur antigène respectif (protéine A ou protéine B), modifiant ainsi également l'intensité du signal émis.

Comme vous pouvez le constater, l'analyse d'un western-blot ne se borne pas à dire : « On voit une tache plus grosse dans la piste 3 et pas de tache dans la piste 1, alors que pour l'actine ce sont les mêmes taches. »

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 western-blot, comme de tout autre résultat d'expérience, nécessite une procédure rigoureuse, méthodique et une argumentation (justification) systématique.

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

Des chercheurs s'intéressent à la régulation de l'expression de deux protéines, la protéine A et la protéine B chez un microorganisme eucaryote cultivé en présence (+) ou non (-) d'hème (source de fer). Un western-blot a donc été réalisé en déposant des échantillons de protéines extraites à partir des cultures effectuées dans les différentes conditions. Trois anticorps primaires ont été mis en contact avec la membrane de western-blot :

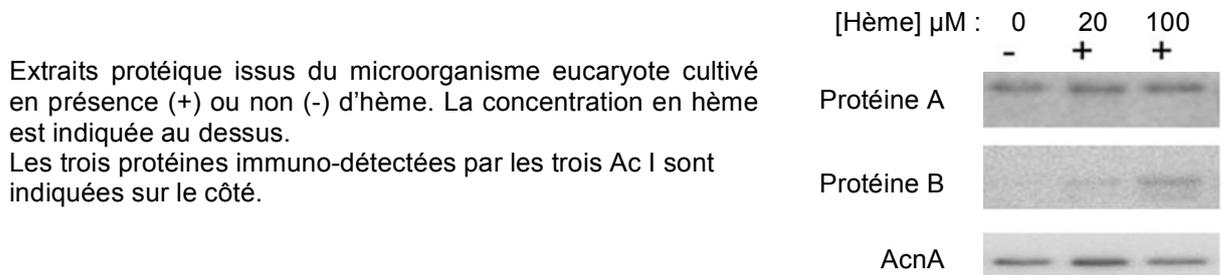
- un Ac anti-protéine A ;
- un Ac anti-protéine B ;
- un Ac anti-actine.

Il est rappelé que l'actine est exprimée de façon constitutive dans les différentes conditions de culture utilisées.

La position des Ac I sur la membrane est révélée par la fixation d'un anticorps secondaire (Ac II) couplé à une peroxydase, laquelle émet des photons en présence de son substrat, le luminol.

Les résultats sont présentés figure 1.

Figure 1 : Résultats du western-blot



Question 1 : Analysez les résultats obtenus pour la protéine A. Que pouvez-vous en conclure ?

Analyse du témoin de charge (Protéine Actine) :

Dans l'expérience présentée, la protéine actine constitue le témoin de charge. Les signaux obtenus pour cette protéine sont quasiment identiques dans les 3 pistes, on note un signal très légèrement supérieur pour le dépôt central. Par conséquent, cela indique que la même quantité de protéines totales a été déposée dans les puits 1 et 3, et très légèrement plus dans le puits 2. Nous devons en tenir compte dans l'analyse des résultats obtenus pour les protéines A et B.

Analyse des résultats pour la protéine A:

On observe un signal pour la protéine A d'intensité quasiment identique dans les trois pistes, avec toutefois un niveau très légèrement supérieur dans la piste 2. En fait, les variations d'intensité du signal de la protéine A suivent celles observées pour l'actine.

Conclusion : l'accumulation de la protéine A n'est pas affectée par la concentration en hème dans le milieu de culture.

Question 2 : Analysez les résultats obtenus pour la protéine B. Que pouvez-vous en conclure ?

Contrairement à la protéine A, on observe que l'intensité du signal varie en fonction de la présence en hème dans le milieu de culture. Ainsi, le taux d'accumulation de la protéine B augmente en fonction de la concentration en hème.

Conclusion : le niveau d'accumulation de la protéine B augmente avec la concentration en hème, en raison :

- 1) soit d'une synthèse accrue de la protéine en présence d'hème (attention ici sans information sur l'accumulation de l'ARNm correspondant, on ne peut pas conclure directement à une régulation au niveau de la traduction – voir ci-dessous) ;
- 2) Soit d'une stabilisation accrue ou dégradation diminuée de la protéine B en présence d'hème
- 3) Soit encore une addition des phénomènes 1) et 2).

Question 3 : Avec un simple résultat de western blot, peut-on conclure directement à une régulation traductionnelle ou bien est-ce impossible ? Justifiez votre réponse.

Il est effectivement impossible de conclure directement à une régulation traductionnelle (variation du taux de traduction) avec un simple résultat de western-blot et ceci pour deux raisons.

- 1) Comme signalé précédemment, cette technique donne accès à l'accumulation des protéines et non uniquement à la synthèse de cette protéine. On peut néanmoins effectuer par western-blot un suivi de la cinétique de dégradation de la protéine, afin d'en déterminer la demi-vie, mais cela nécessite de bloquer toute nouvelle initiation de la traduction *in vivo* en cultivant l'organisme étudié en présence d'un inhibiteur de la traduction ayant cette action.

- 2) Il ne faut pas oublier que la variation du taux de traduction n'est pas le seul moyen de faire varier le taux de synthèse d'une protéine. En effet, si le taux d'accumulation d'un ARNm augmente, soit en augmentant son taux de transcription et/ou sa demi-vie, alors à taux de traduction constant, cela aboutira à une augmentation dans les cellules de la quantité de la protéine codée par cet ARNm.

Il faut donc avoir également des informations sur l'accumulation des ARNm correspondants à la protéine étudiée avant de pouvoir conclure.

Question 4 : *Peut-on considérer que la protéine A est plus accumulée dans les cellules que la protéine B en présence de 100 μ M d'hème dans le milieu de culture ? Justifiez votre réponse.*

La réponse est NON !. On ne peut pas comparer les intensités de signaux obtenus avec la révélation de l'Ac I dirigé contre la protéine A avec ceux obtenus pour l'Ac II dirigé contre la protéine B, et ceci pour plusieurs raisons :

- 1) l'Ac II n'a pas forcément la même affinité *chacun des deux* Ac I (une telle différence d'affinité aurait pour conséquence de faire varier la quantité d'Ac II fixée et donc la quantité d'enzyme peroxydase, ce qui aboutirait à une variation d'intensité du signal, à savoir de l'émission des photons) ;

- 2) les deux Ac I n'ont pas non plus les mêmes affinités *vis-à-vis* de leur antigène respectif (protéine A ou protéine B), modifiant ainsi également l'intensité du signal émis.