

TD 03 : Southern blot, Northern blot, Western blot, Dot blot

I. Southern blot principe et technique :

Le Southern blot est une technique décrite par Edwin M. Southern en 1975 pour rechercher spécifiquement des fragments de DNA sur électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire marquée par un radioisotope.

Les étapes successives de cette technique sont les suivantes (Figure 1):

1. Extraction et purification de l'ADN génomique.
2. L'ADN à étudier est digéré à l'aide des enzymes de restriction différentes en de très nombreux fragments par exemple dans le tube 1, une digestion par l'enzyme 1 est réalisée, dans le tube 2 une digestion par l'enzyme 2 ;etc....
3. Le mélange des fragments est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose.
4. Le gel d'électrophorèse est ensuite immergé dans une solution alcaline (hydroxyde de sodium) afin de permettre la dénaturation de l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire.
5. Afin de repérer les fragments d'intérêt, il faut en premier les hybrider. L'hybridation ne peut pas être effectuée sur le gel dont la structure immobiliserait les sondes, de ce fait il faut transférer les fragments sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon.

L'emplacement des fragments séparés par l'électrophorèse est conservé au cours du transfert.

6. En pratique, un montage est réalisé en disposant par-dessus le gel, une feuille de membrane de nitrocellulose ou de nylon recouverte d'une pile de papier absorbant puis en comprimant gentiment l'ensemble par un poids, les fragments sont transférés grâce à une montée par simple capillarité de tampon imprégnant le gel puis la membrane où le DNA va se fixer par des liaisons stables (Figure 2).

7. afin de fixer de manière permanente l'ADN sur la membrane, cette dernière est alors chauffée dans le cas de nitrocellulose ou exposée au rayonnement UV s'il s'agit de nylon.

8. La membrane avec l'ADN fixé est ensuite incubée dans une solution contenant une sonde marquée complémentaire du fragment de DNA que l'on recherche a révélé la position, la température d'incubation est assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire.

9. La membrane est ultérieurement lavée des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire.

10. Selon le type de sonde utilisée, la position sera déterminée par autoradiographie ou par fluorescence. L'information obtenue est double : la présence de marquage confirme la présence de la séquence d'intérêt et sa position permet de déterminer la taille du fragment de restriction.

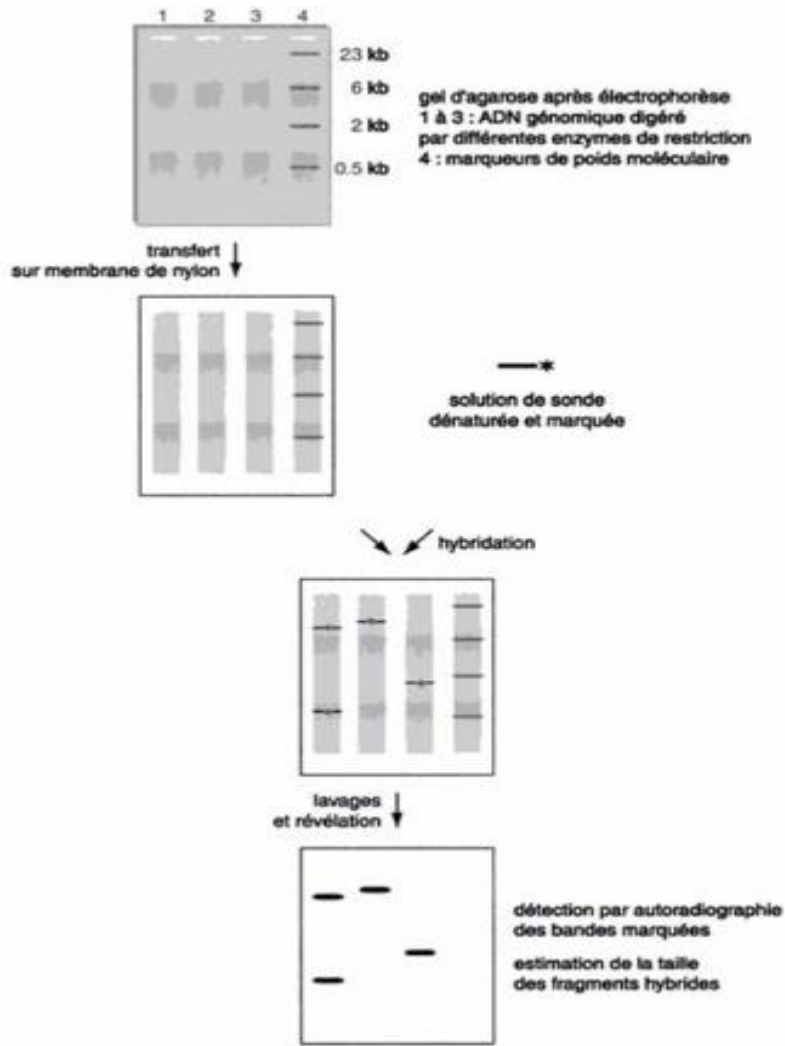
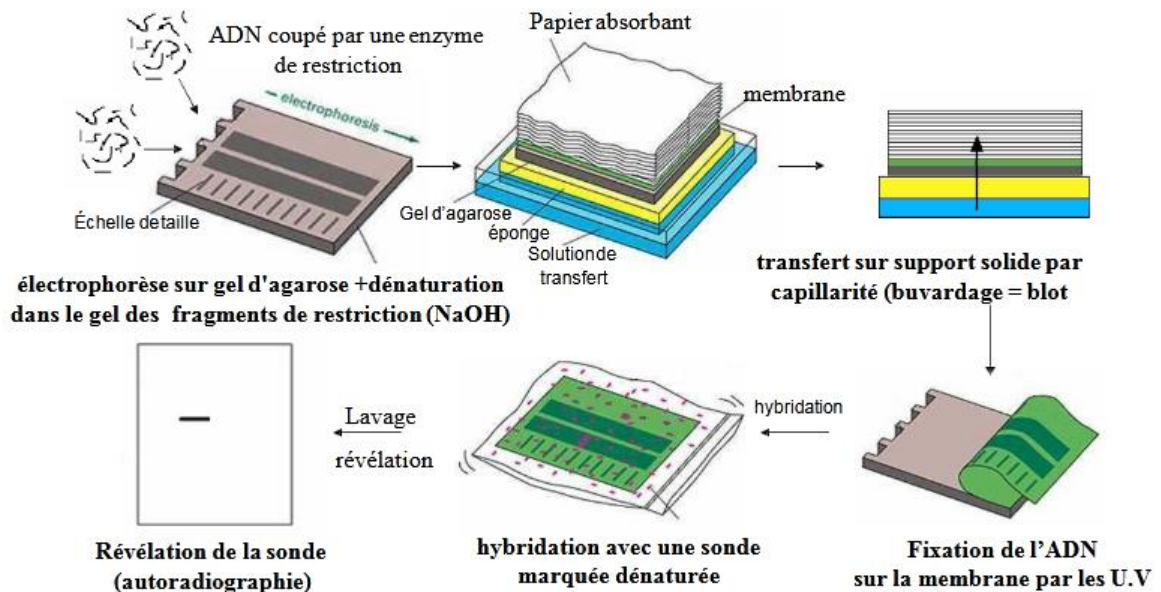


Figure 01 : Technique du Southern blot

SOUTHERN-BLOT



- **Application de la technique du Southern blot :**

Le Southern blot peut détecter la présence des gènes homologues entre les espèces. Par exemple, si un gène d'intérêt biologique a été localisé chez le rat, il est possible de construire une sonde marquée à partir du gène de rat et de l'utiliser pour rechercher un gène homologue chez l'homme par analyse Southern blot. Le transfert d'ADN peut également être utilisé pour évaluer le nombre de copies d'un gène spécifique, ce qui constitue une réponse à l'effet des conditions particulières de l'environnement et explique souvent la résistance aux médicaments dans les cellules de mammifères. L'analyse Southern permet d'identifier des mutations, des délétions ou des réarrangements qui altèrent l'intégrité d'un gène spécifique, ce qui peut être utile dans le pronostic de certains types de cancer et dans le diagnostic prénatal de maladies génétiques.

De plus, le Southern blot est un outil précieux pour le clonage moléculaire, offrant un mécanisme de localisation des séquences spécifiques dans des clones d'ADN de bactériophages et de cosmides.

II. Northern blot principe et technique :

Cette technique a été appelée en référence au Southern blot. Le northern blot est une technique simple et couramment utilisée pour la détection et la quantification d'ARN spécifiques provenant d'un type de cellule ou de tissu particulier. Dans cette méthode, les molécules d'ARN total ou d'ARNm sont isolées et séparées par électrophorèse sur gel d'agarose selon leurs tailles. Le gel est préparé avec du formaldéhyde pour dénaturer l'ARN et empêcher la formation de structures secondaires. Après la séparation sur le gel d'agarose, l'ARN est coloré au bromure d'éthidium et visualisé à la lumière ultraviolette.

Les ARN complémentaires de la sonde sont identifiés après transfert sur une membrane de Nylon ou de nitrocellulose qui est ensuite soumise à l'hybridation. La sonde peut être une molécule d'ADN ou d'ARN, marquée chimiquement ou radioactivement. Selon le type de marquage les molécules d'ARN seront déterminées par autoradiographie ou par fluorescence.

Application de la technique du Northern blot :

Le Northern blot et ses variations sont utilisés dans la recherche en biologie moléculaire afin d'évaluer la taille de l'ARN étudié ainsi que la taux d'expression et d'accumulation d'une population d'ARN dans un tissu donné (feuille, racine, tige,,,) à un moment déterminé de son développement (différentes phases de l'embryogenèse) ou sous l'effet d'un stress biotique ou abiotique. Aussi elle permet d'étudier la dégradation de l'ARN et leur demi-vie. Enfin cette technique sert à détecter les intermédiaires de maturation et les différentes formes d'épissage des ARN.

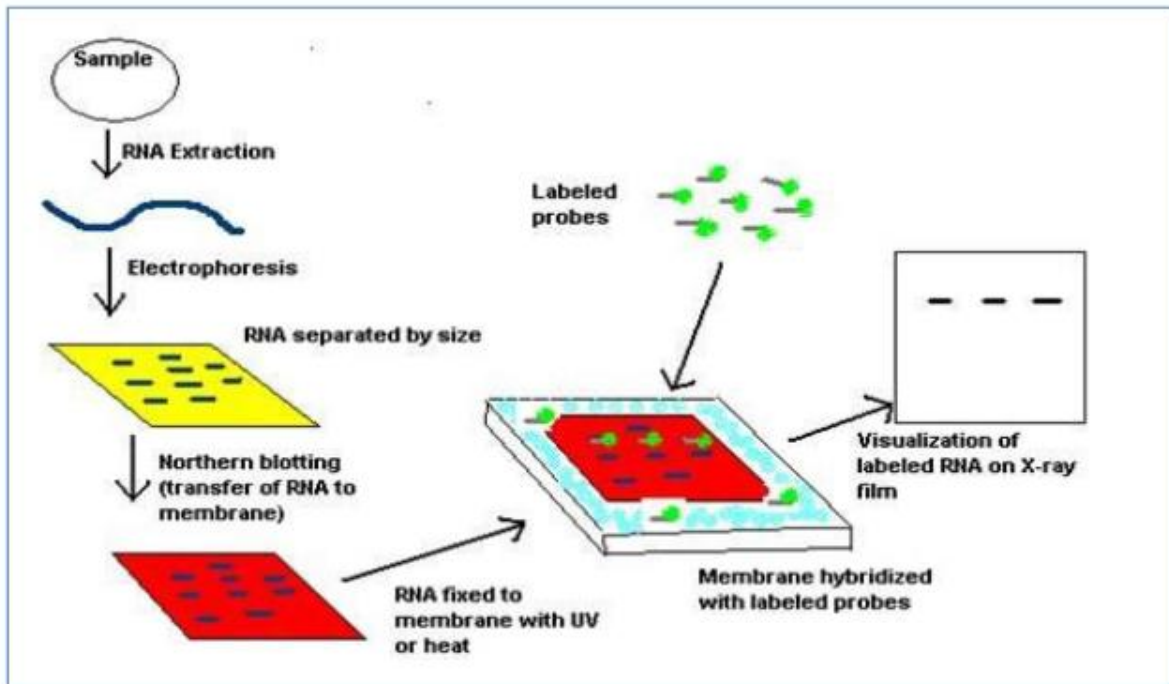


Figure 2 : Technique du Northern Blot

III. Western blot principe et technique :

En 1979, H. Towbin et ses collaborateurs ont mis au point la technique de Western Blot ou immunoblot pour détecter une protéine nouvellement codée par une cellule transformée. Son principe repose sur la réaction antigène-anticorps; il s'agit donc d'une technique d'immunodétection. Dans cette méthode, les sondes d'acide nucléique radiomarquées ne sont pas utilisées. Cette technique se déroule en plusieurs étapes:

- Extraction des protéines à partir des cellules et séparation par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) en fonction de leur taille, le SDS servant de détergent pour l'électrophorèse et de dénaturant pour les protéines à structure tridimensionnelle.
- Une fois que les protéines ont migré, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF). La liaison des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines.
- Incubation de la membrane de nitrocellulose avec un anticorps primaire, qui est un anticorps spécifique qui se lie aux protéines et forme un complexe anticorps – protéines d'intérêt. Le lavage de la membrane est effectué à l'aide d'une solution de lavage pour éliminer tous les anticorps non hybridés.
- Addition d'un anticorps secondaire qui est conjugué à de la couleur, de la radioactivité ou une enzyme aux fins de la détection, par exemple : un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à de la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase ;

HRP) qui est considéré comme une enzyme conjuguée permettant la visualisation de la protéine d'intérêt.

□ Incubation dans un milieu réactionnel spécifique de l'enzyme pour visualisé sont action. Les bandes sont visible une fois il y a formation du complexe protéine- anticorps primaire-anticorps secondaires – enzyme. Un filme radiographique est exposé au gel et les séquences hybrides sont détectées par autoradiographie. Les bandes montrent la présence de protéines rechchées.

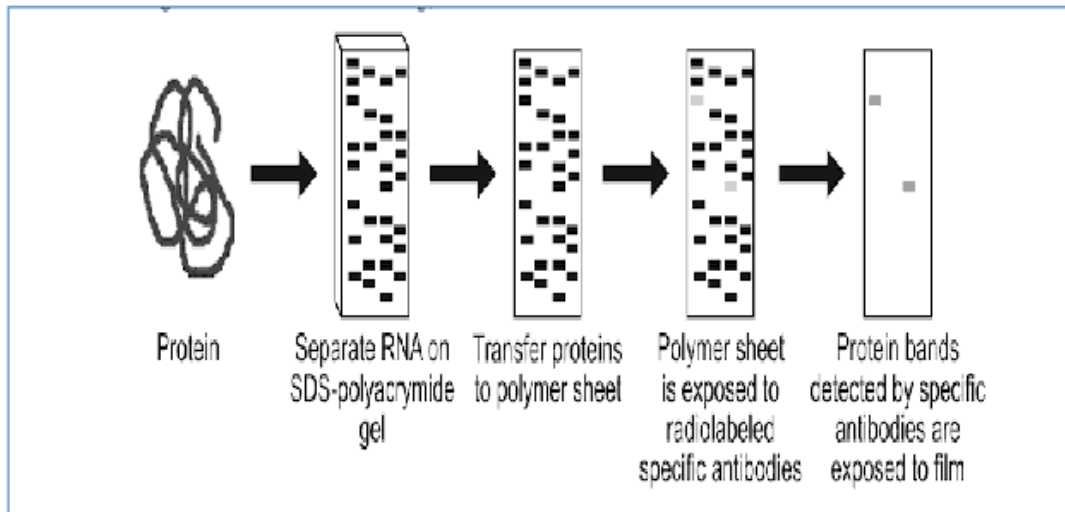


Figure 3 : Représentation de la technique de western blot

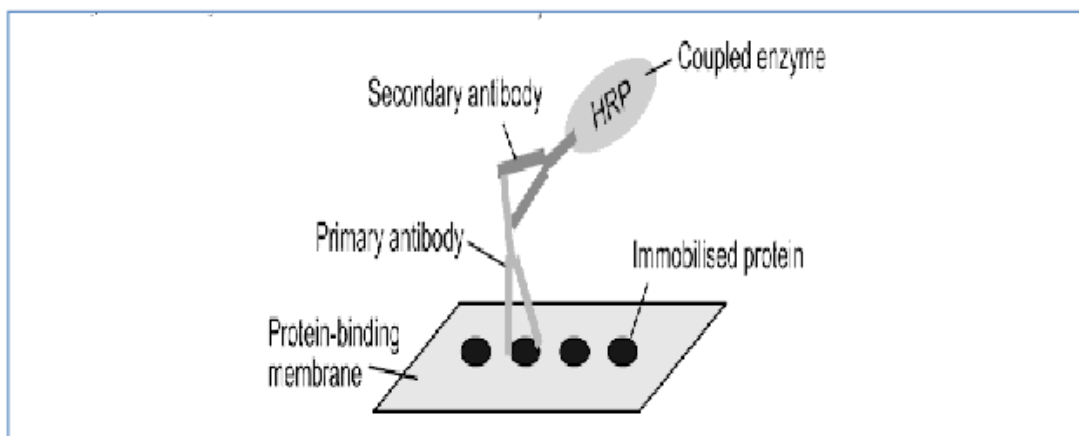


Figure 4 : Un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à de la peroxydase de raifort (HRP) pour détection des protéines d'intérêt

- **Les avantages et applications de la technique de western blot :**

Le Western blot présentes beaucoup d'avantages par rapport à d'autres dosages d'immuno-absorption tels que la méthode d'ELISA. Le Western blot permet la séparation du mélange protéique par taille, charge et/ou conformation par rapport au test ELISA dont le concept est différent. La méthode d'élimination décrite permet de détecter plusieurs cibles, contrairement au test ELISA qui permet de ne détecter qu'une seule protéine. Étant donné que l'électrophorèse de protéines sur gel sépare les protéines en bandes, il est possible de déterminer la taille de la protéine/du polypeptide cible. Il est également possible de (semi) quantifier la protéine d'intérêt en exécutant en parallèle une analyse interne de quantité sur les échantillons dans le gel. De la

même manière, la teneur en protéines des échantillons peut être comparée (échantillon A comporte plus de protéines que l'échantillon B).

Les applications du western blot dans les laboratoires de recherche sont nombreuses englobant:

- La détection et l'analyse de la nature des protéines à faible abondances dans un milieu biologique.
- L'analyse d'expression des protéines recombinantes et la détection des protéines contaminants.
- La combinaison entre les réactions immunologique et l'analyse des tailles des molécules protéiques possible par la méthode du western blot a permis l'analyse des modifications post-traductionnel des protéines.
- La Détermination de la taille et la quantité de protéines dans un échantillon donné.
- Le diagnostic des maladies: détecte les anticorps anti-virus ou les bactéries présentes dans le sérum.
- La technique de Western blot est le test de confirmation du VIH. Il détecte les anticorps anti-VIH dans le sérum du patient (Gurtler, 1996).
- Utile pour détecter les protéines défectueuses.
- Test définitif des maladies de : Creutzfeldt-Jacob, de Lyme, de l'hépatite B et de l'herpès.

IV. Dot blot principe et technique :

La dot blot est une technique simple de détection des molécules d'ADN, d'ARN ou de protéines. Cette méthode permet de transféré directement les acides nucléiques (ADN ou ARN) depuis un milieu liquide sur une membrane sans passé pas les étapes de séparation et d'électrophorèse. Les étapes de cette technique sont les suivantes :

- Extraction et purification d'ADN ou d'ARN de différente source.
- Appliquer directement sous forme de petits points sur la membrane de nitrocellulose.
- Si il s'agit de molécule d'ADN, dénaturer le par un traitement alcalin au NaOH 0,4M pour former des brins simples.
- Les échantillons sont immobilisés sur la membrane par chauffage à 80°C pendant 2 à 3 Heures.
- Incuber la membrane portant les différents échantillons dans une solution de sondes marquées, qui vont s'hybridées avec les molécules d'ADN ou d'ARN spécifiques.
- Illimitation des sondes non liée par lavage.
- Les sondes utilisées sont radioactive est sont détectées par autoradiographie. Sur la membrane les points noirs représentent les échantillons dans lesquels l'ADN ou l'ARN cible est présent ou la sonde s'est liée.

La mise en place des points des échantillons sur la membrane peut être sous forme de rond ou effectuée à l'aide d'un appareil où le dépôt se fait en fente, dans ce cas on parle de Slot blot qui est la même technique que le dot blot.

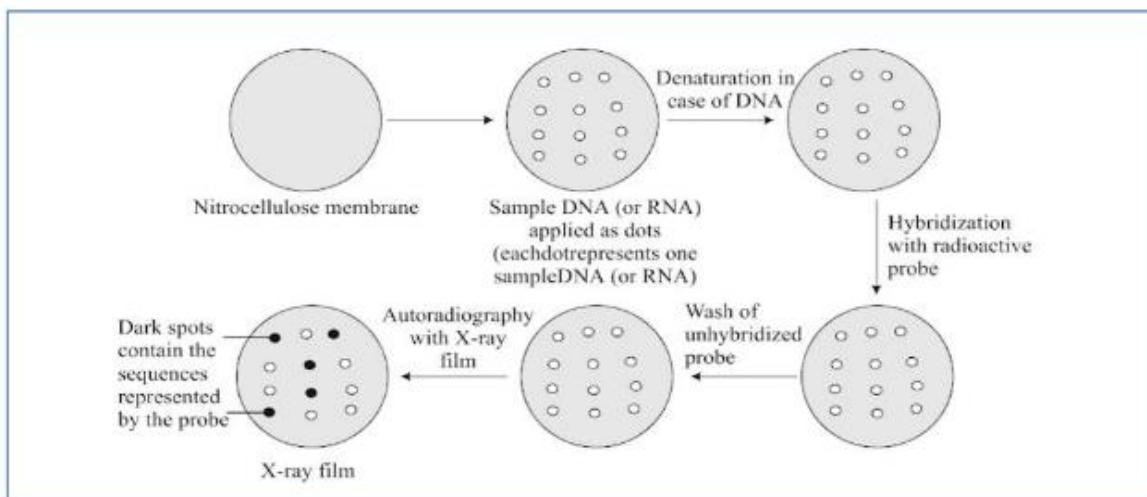


Figure 5 : Représentation de la technique de Dot blot