



SEQUENÇAGE DE GENOME

SCIENCE EN TETE BIOLOGIE 2021-2022

Le but des techniques de séquençage est de dévoiler les informations génétiques propre aux séquences d'ADN d'un organisme dans le but de comprendre des phénomènes biologiques au niveau moléculaire et cellulaire ou de classer des organismes. Le principe est de déterminer la séquence en nucléotide d'un fragment d'ADN grâce à la polymérase et à des nucléotides modifiés.

1. METHODE SANGER : SEQUENÇAGE DE PREMIERE GENERATION

La technique repose sur la manière dont l'ADN est répliqué, on l'utilise habituellement pour les petits séquençages.

Tout d'abord on initie la réplication dans quatre tubes à essais pour se faire nous avons besoin d'un brin d'ADN matrice, d'amorce, de la polymérase I, de désoxynucléotides. Dans chaque tube il y a un type de nucléotide qui est modifié et marqué : ce sont des di-désoxynucléotides (ddNTP).

Puis l'élongation c'est-à-dire la synthèse de l'ADN à lieu cependant à chaque fois qu'un ddNTP est intégré à la séquence du brin néoformé la synthèse d'ADN s'arrête. La polymérase ne peut créer de liaison phosphodiester avec un autre dNTP vu que le ddNTP n'a pas d'atome d'oxygène sur le carbone 3' (figure 1). Ainsi à la fin de l'expérience on obtient des séquences d'ADN de différentes tailles dans tous les tubes. Puis on effectue

une électrophorèse sur gel pour séparer les séquences par taille et déterminer la séquence en nucléotide de notre fragment d'ADN. (figure 2A) La lecture se fait manuellement.

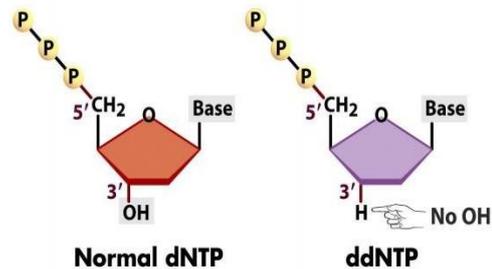


Figure 1 : structure des ddNTPs [4]

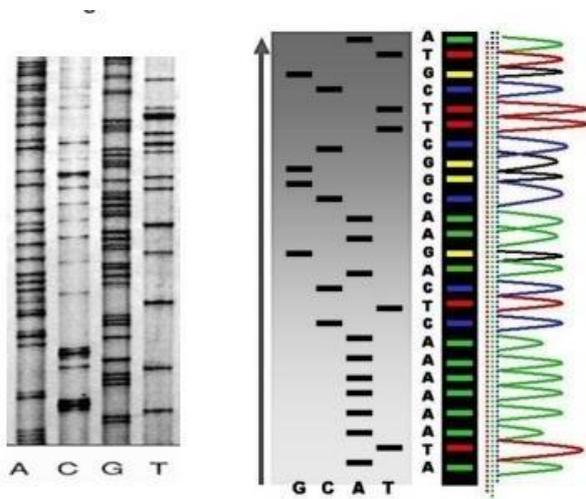


Figure 2 : résultats type du séquençage manuel (A) et automatique (B)[3]

2. SEQUENÇAGE DE DEUXIEME GENERATION : LE SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT

De par les progrès en nanotechnologie et en informatique de nouvelle méthode de séquençage rapide ont vu le jour comme la technologie 454 et la technologie illumina. Le principe de ces techniques



reposesur la coupure de l'ADN d'intérêt en de nombreux fragments et leur association à des adaptateurs. Ces adaptateurs seront reconnus par une séquence présente sur un support afin d'amplifié les fragments par PCR. Puis ils seront séquencés de différente manière soit par pyroséquençage soit par un séquençage de synthèse

1) Le pyroséquençage

Cela consiste à incorporer des nucléotides marqués un à un avec une enzyme de réplication par complémentarité des bases. Ces nucléotides sont capables de réagir avec la luciférase pouvant émettre de la lumière. L'intensité du signal lumineux est proportionnelle au nombre de nucléotide incorporé. Ce signal est capté par une caméra qui pourra déterminer le nombre de nucléotides incorporé et ainsi reconstitué la séquence du fragment d'ADN.

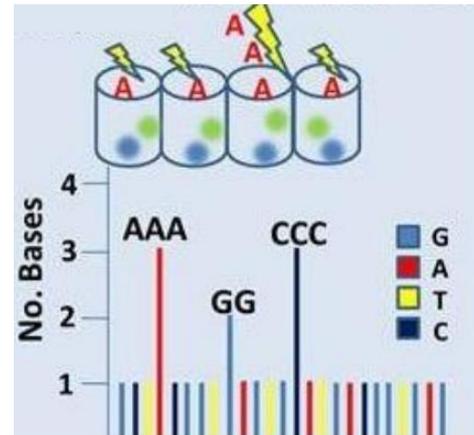


Figure 3 : le pyroséquençage [4]

2) Séquençage de synthèse

Le cycle de séquençage débute par l'ajout de quatre nucléotides marqués. Un fois qu'un nucléotide est incorporé on l'excite à l'aide d'un laser pour activer sa fluorescence. Puis une caméra prend une image, une fois cela fait on enlève la fluorescence émise par la première base identifiée. On recommence l'opération jusqu'à ce que la séquence entière soit connue.

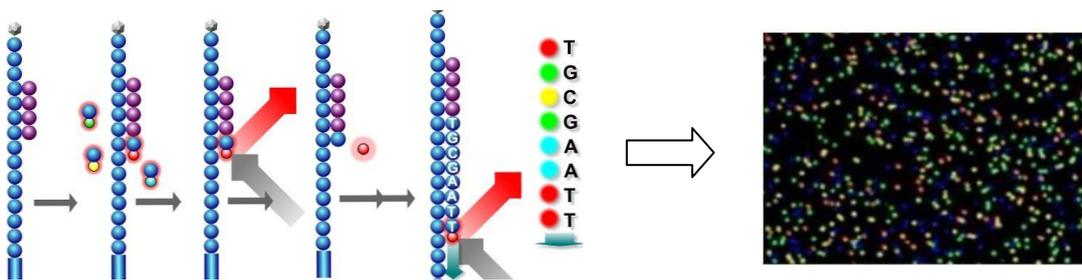


Figure 4 : principe et résultat du séquençage par synthèse [4,5]

L'avantage de ces nouvelles techniques c'est que l'on peut obtenir la première base de tous les fragments d'ADN présent sur le support.



LES APPLICATIONS

Le séquençage permet d'avoir accès à notre génome ainsi on peut comprendre la provenance de certaines maladies aux composantes génétique c'est-à-dire lié à des mutations comme le cancer ou les maladies héréditaire. On l'utilise aussi pour le dépistage prénatal de maladie génétique comme la trisomie 21. De plus en biologie évolutive le séquençage permet de comprendre les interactions entre les espèces et leur descendance.

AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Méthode	Différence
Première génération :	Cher, très lent (500 mille nucléotides par jour)
Seconde génération :	Moins cher et plus rapide que la 1 ^{er} génération, plus rapide (1 milliards de nucléotide en quelque heure)

SEQUENCAGE ARN

Le séquençage d'un génome peut aussi s'effectuée grâce aux ARNs. Cela implique alors plusieurs étapes : après avoir isolé les ARNs, on effectue une reverse transcriptase pour ainsi obtenir des ADNc. Ces derniers sont ensuite amplifiés par PCR et sont séquencés grâce notamment aux méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS). Ce séquençage permet alors de reconstruire et d'identifier les zones transcrites du génome et permet donc de créer une banque de données d'ADNc correspondant pour ainsi affiner le séquençage du génome grâce aux informations données par les ARNs.

Le RNAseq offre alors plusieurs voies d'études, notamment sur l'études des modifications post traductionnelles ou encore sur les petits ARNs (miARN, siARN) intervenants dans la méthode des RNAi. Elle permet également d'annoter le génome notamment l'emplacement des gènes transcrits.

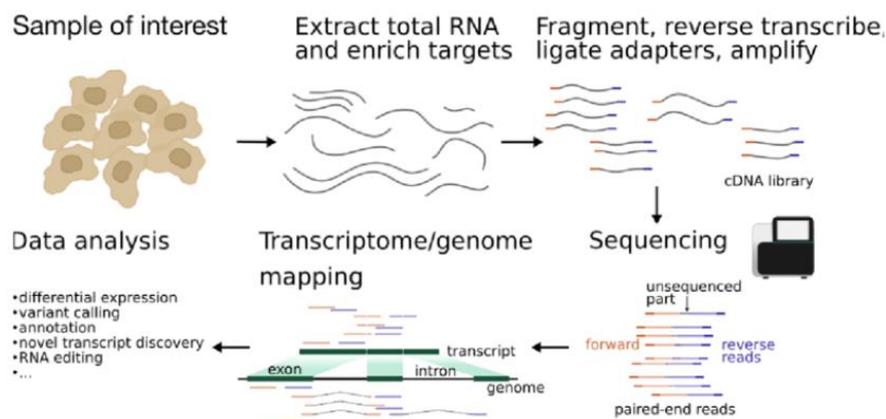


Figure 5 : Schématisation des étapes expérimentales du séquençage par ARN



- [1] https://fr.wikipedia.org/wiki/S%C3%A9quen%C3%A7age_de_l%27ADN
- [2] <https://boowiki.info/art/genetique/le-sequencage.html>
- [3] <http://storage.canalblog.com/02/30/390867/63333550.pdf>
- [4] Nardjis Amieur, méthode d'analyse de l'expression des génomes
file:///C:/Users/Jenny/Downloads/Ing%C3%A9
bio_M%C3%A9thode%20d'analyse%20des%20g%C3%A9nomes_2020_Partie%201.pdf
- [5] <https://fr.sawakinome.com/articles/science/how-does-illumina-sequencing-work.html>
- [6] Inserm, le séquençage du génome, 2018, <https://youtu.be/TCnG7R50IIU>
- [7] <https://en.wikipedia.org/wiki/RNA-Seq>
- [8] https://get.genotoul.fr/wp-content/uploads/2017/04/161010_RNAseq_M2P.pdf
- [9] Image : https://www.researchgate.net/figure/Overview-of-the-experimental-steps-in-a-RNA-seq-protocol-The-cDNA-library-is-generated_fig1_328347872