

SÉQUENÇAGE DE GÉNOME

SCIENCES EN TÊTE BIOLOGIE-ANNÉE 2021-2022

Le but des techniques de séquençage est de dévoiler les informations génétiques propres aux séquences ADN d'un organisme. Il est ainsi possible de comprendre certains phénomènes biologiques aux niveaux moléculaire et cellulaire ou encore de classifier 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]

1. MÉTHODE SANGER : SÉQUENÇAGE DE PREMIÈRE GÉNÉRATION

La méthode Sanger repose sur la manière dont l'ADN est répliqué. Cette technique habituellement utilisée pour les petits séquençages, se décompose en 3 grandes étapes :

- 1) **La réplication** est initiée dans 4 tubes à essais avec un brin d'ADN matrice, une amorce, la polymérase et des désoxynucléotides. Dans chaque tube, il y a un type de nucléotide qui est modifié et marqué : les di-désoxynucléotides (ddNTPs).^[2]

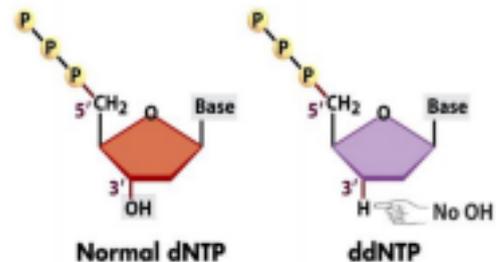
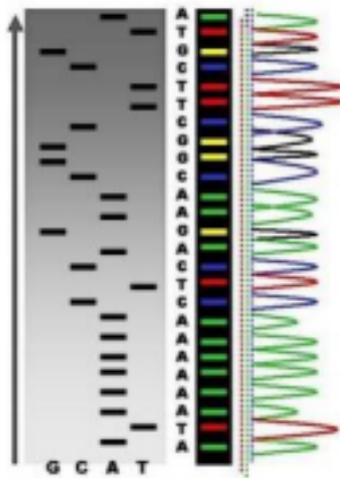
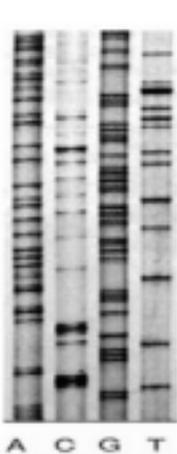


Figure 1 : structure des ddNTPs ^[4]

- 2) Alors que **l'élongation** a lieu, 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 ADN de différentes tailles.
- 3) **Électrophorèse** sur gel pour séparer les séquences par taille et déterminer la séquence nucléotidique du fragment d'ADN d'intérêt.



On utilise alors des **fluorochromes** pour marquer les ddNTP qui, après excitation, produisent une fluorescence différente en fonction de leur nature.^{[3][4]}

Cette avancée a permis de réaliser un seul mélange réactionnel au lieu de 4. La lecture devient alors automatique, l'ordinateur détecte les différents fluorochromes par l'intermédiaire des pics de fréquence ayant des longueurs d'onde différentes (figure 2B).^[5] Ainsi il est possible de séquencer 800 000 nucléotides en une journée. De plus, grâce à la méthode Sanger, il a été possible de séquencer le premier génome humain pour 3.10⁹ € (Projet génome humain).^[6]

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

2. SÉQUENÇAGE DE DEUXIÈME GÉNÉRATION : LE SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT

De par les progrès en nanotechnologie et en informatique, de nouvelles méthodes de séquençage rapide ont vu le jour comme les technologies 454 et Illumina. Le principe de ces techniques repose sur la coupure de l'ADN d'intérêt en de nombreux fragments et leurs associations à des adaptateurs. Ces adaptateurs seront reconnus par une séquence présente sur un support afin d'amplifier les fragments par PCR. Ces derniers seront enfin séquencés par pyroséquençage ou par un séquençage de synthèse.

- **Pyroséquençage**

Cette technique consiste à incorporer des nucléotides marqués un à un avec une enzyme de réplication par complémentarité des bases. Les nucléotides sont capables de réagir avec la luciférase pouvant émettre de la lumière. L'intensité du signal lumineux est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. Ce signal est capté par une caméra qui déterminera le nombre de nucléotides incorporés et ainsi reconstituer la séquence du fragment d'ADN.^{[3][4]}

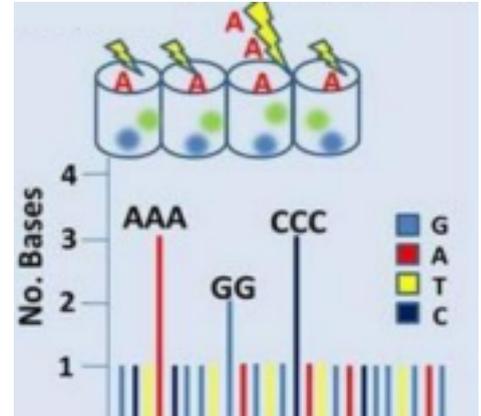


Figure 3 : principe pyroséquençage ^[4]

- **Séquençage de synthèse**

Le cycle de séquençage débute par l'ajout de 4 nucléotides marqués. Une fois qu'un nucléotide est incorporé, ce dernier est excité à l'aide d'un laser pour activer sa fluorescence. Une caméra prend alors une image et la fluorescence émise par la première base identifiée. L'opération est répétée jusqu'à ce que la séquence entière soit connue.^[4]

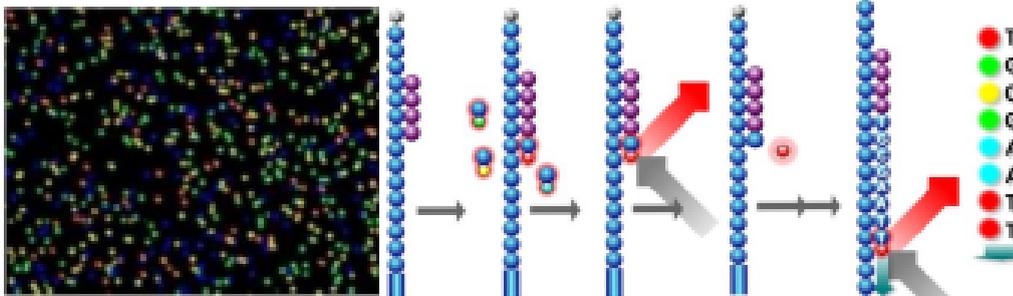


Figure 4 : principe et résultat du séquençage par synthèse ^{[4][5]}

APPLICATIONS

Le séquençage permet d'avoir accès au génome et ainsi de comprendre la provenance de certaines maladies génétiques, telles que le cancer ou les maladies héréditaires. Le séquençage est alors utilisé pour le dépistage prénatal de certaines maladies (trisomie 21). En biologie évolutive, le séquençage permet de comprendre les interactions entre les espèces et leur descendance.



AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

Méthode	Différence
Première génération	Cher, très lent (500 000 nucléotides par jour)
Seconde génération	Moins cher et plus rapide : 10^9 nucléotides en quelques heures On peut obtenir la première base de tous les fragments d'ADN présents sur le support.

SOURCES

- [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
- [5] <https://fr.sawakinome.com/articles/science/how-does-illumina-sequencing-work.html>
- [6] Inserm, le séquençage du génome, 2018, <https://youtu.be/TCnG7R50IU>