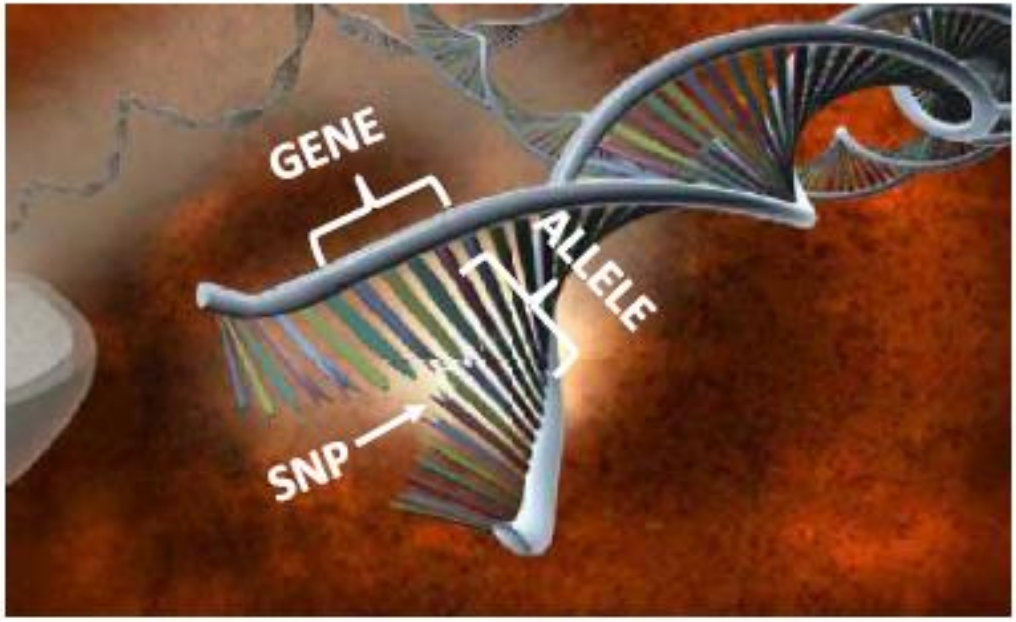
Séquençage de l'ADN

- ✓ Dresser un inventaire de l'ensemble des gènes d'un organisme (génome)
- ✓ Etudier la fonction de ces gènes et leurs interactions
- ✓ Identifier et gérer les variations génétiques

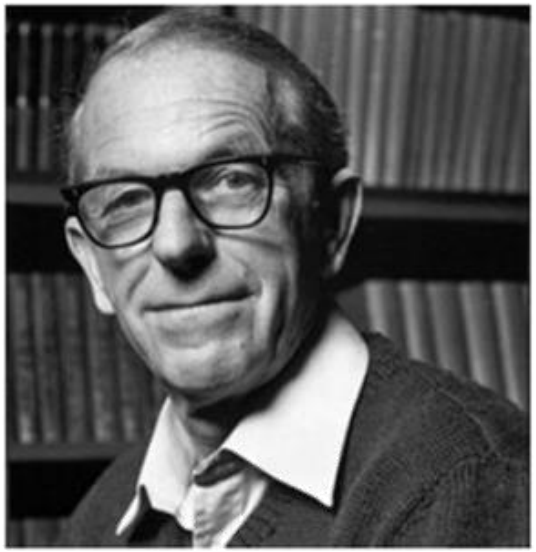


Définition

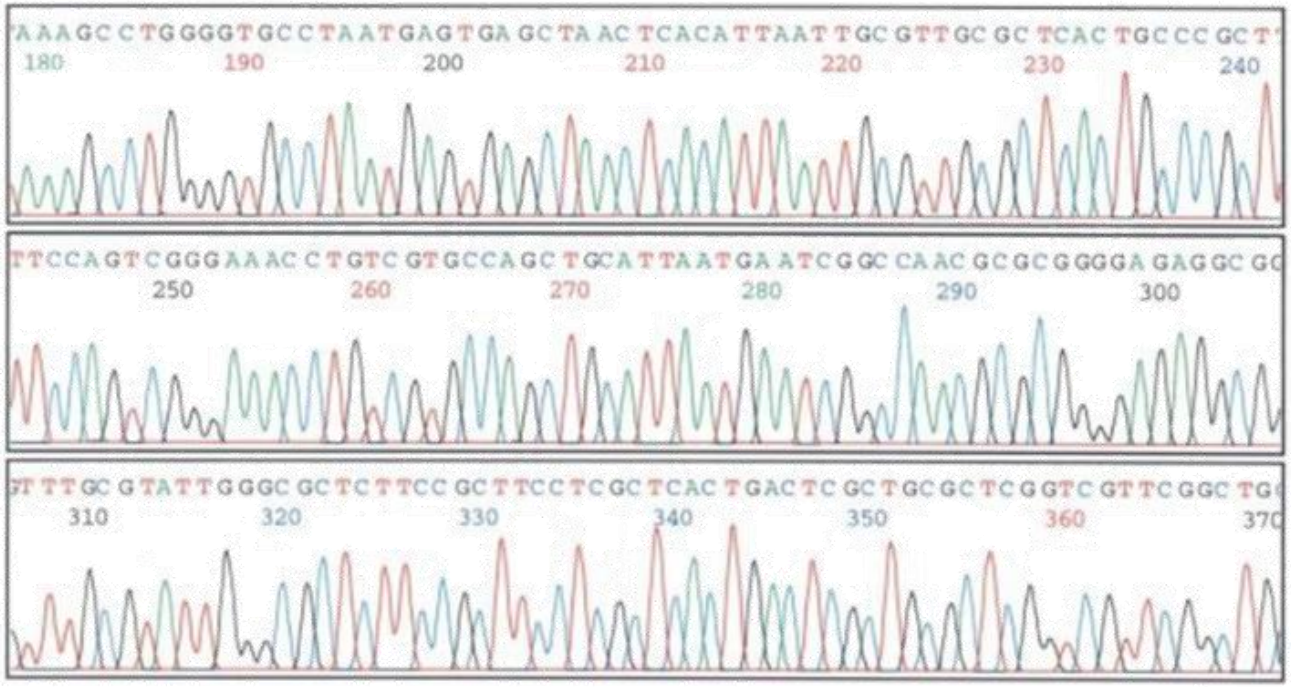
Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant.
C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie.
Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

Techniques de séquençage de l'ADN

Séquençage de Sanger



Frederick Sanger.
Prix Nobel de Chimie 1980



Séquençage de l'ADN

Technique de Sanger

Principe : méthode par synthèse enzymatique du brin complémentaire de l'ADN dont on cherche à déterminer la séquence à l'aide d'une ADN polymérase et de nucléotides « terminateurs de chaîne » **ddNTP** (didésoxyribonucléotides) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose.

Nécessite :

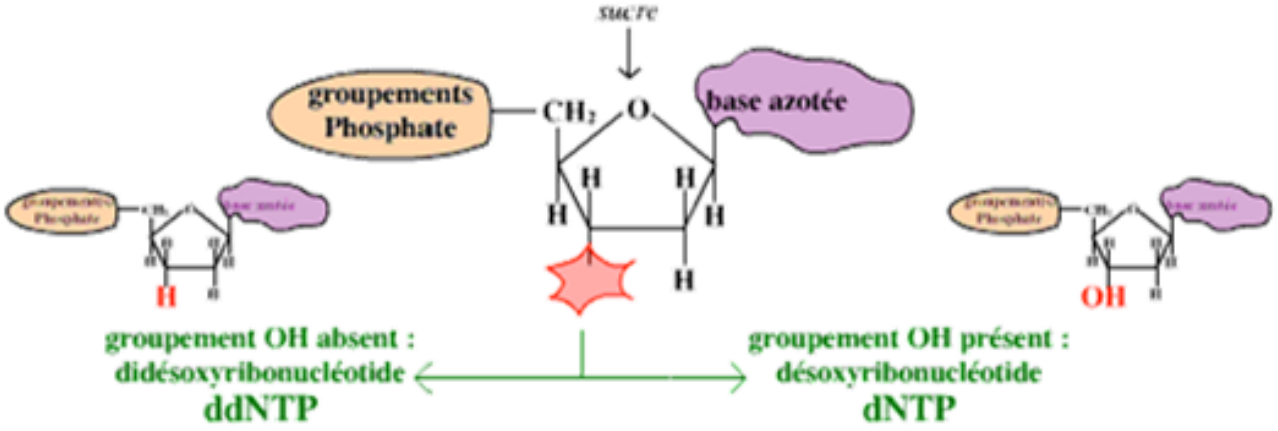
- ADN simple brin à séquencer
- ADN polymérase
- oligonucléotide amorce complémentaire
- 4 nucléotides dNTP
- dans 4 expériences différentes : chaque ddNTP

Le séquençage selon la technique de Sanger

Les ADN polymérases sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice.

Pour le séquençage des nucléotides légèrement différents sont utilisés: les didésoxyribonucléotides (ddNTP) au lieu des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP).

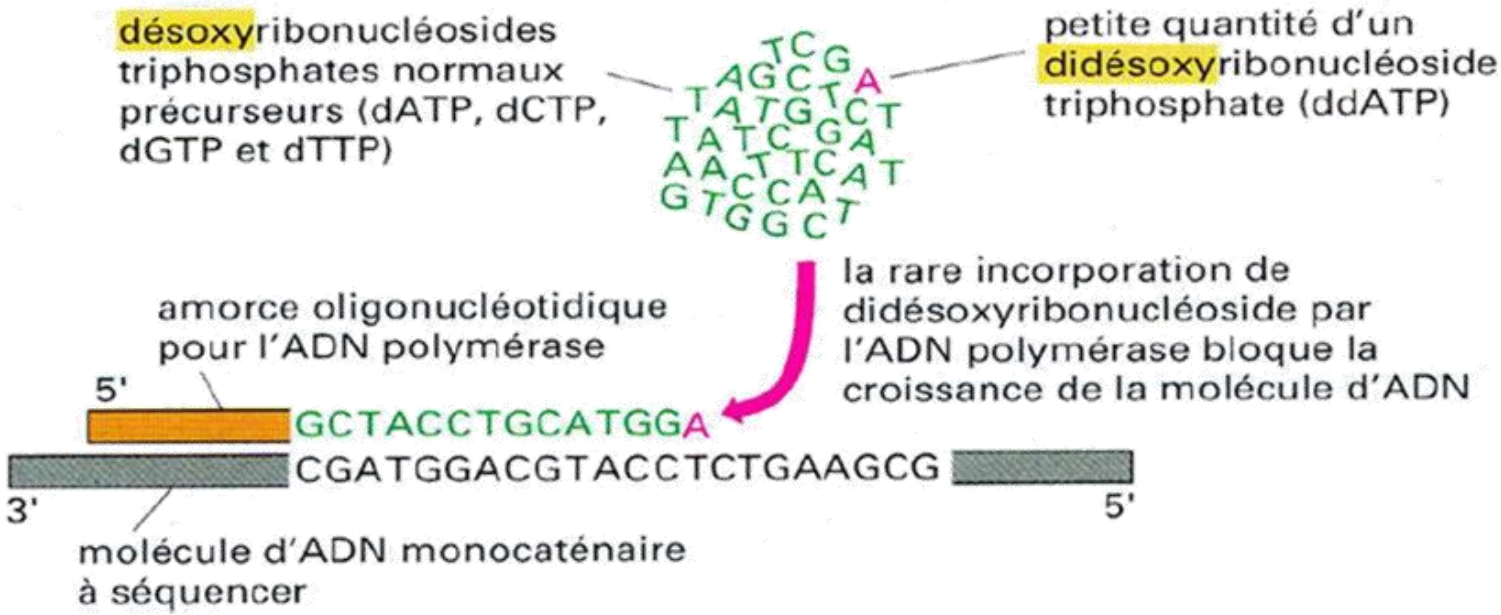
Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

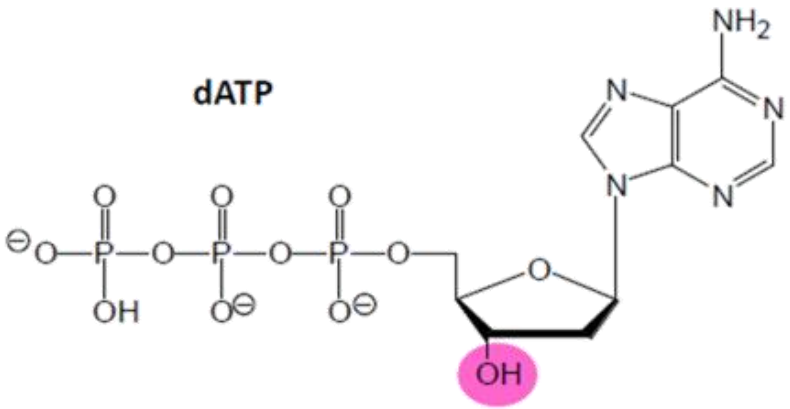


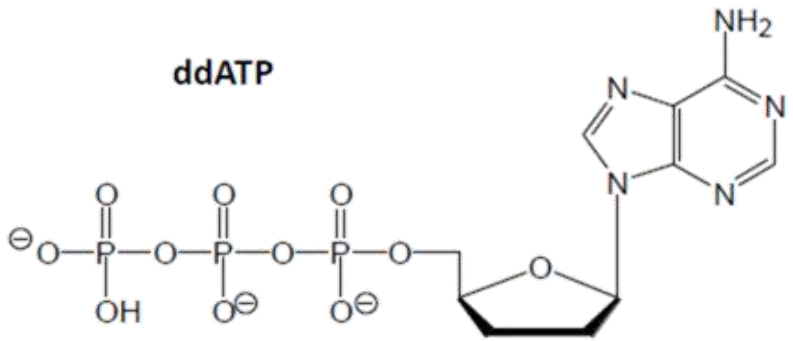
Deux types de nucléotides triphosphates

Séquençage de l'ADN

Technique de Sanger

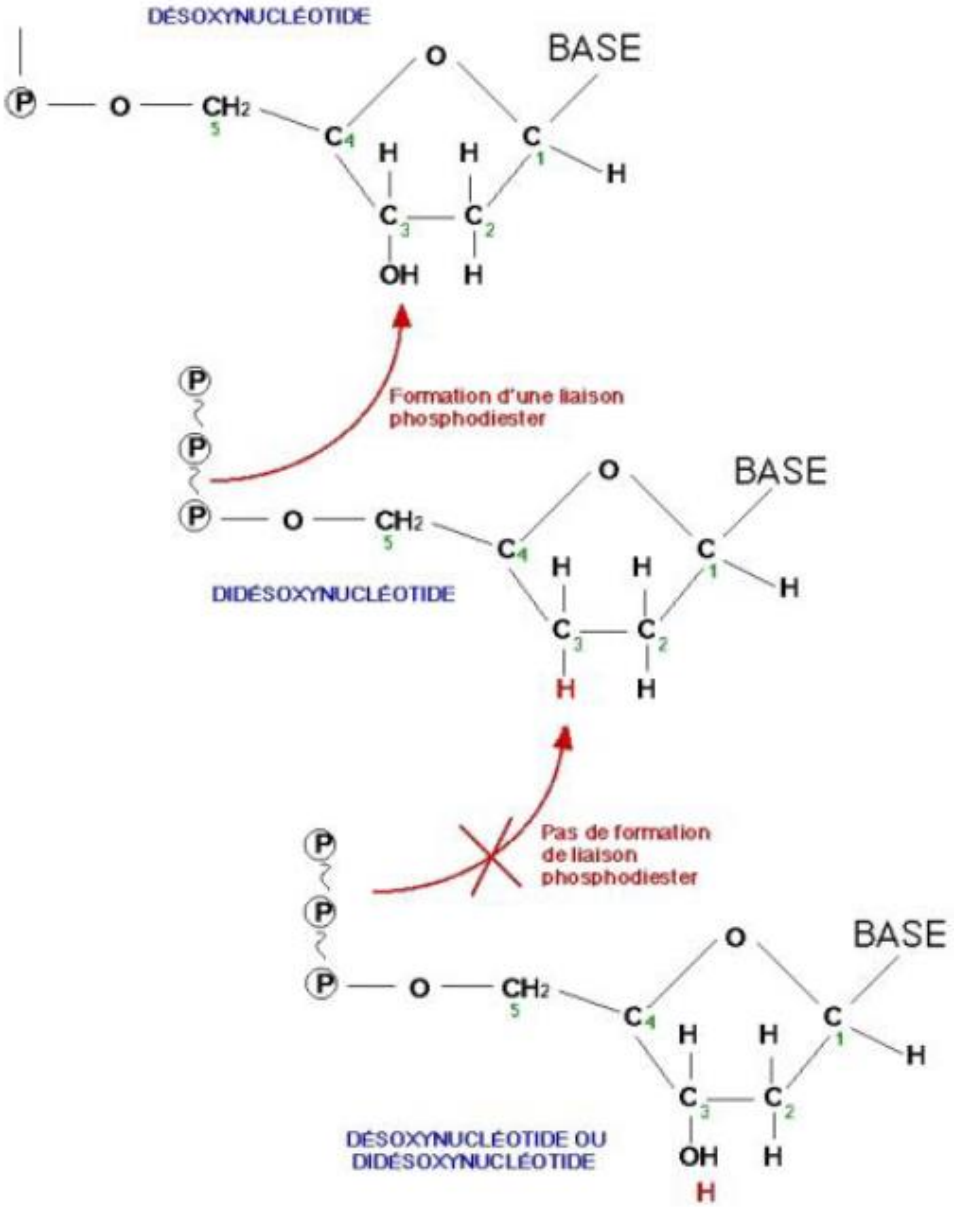






Séquençage de l'ADN

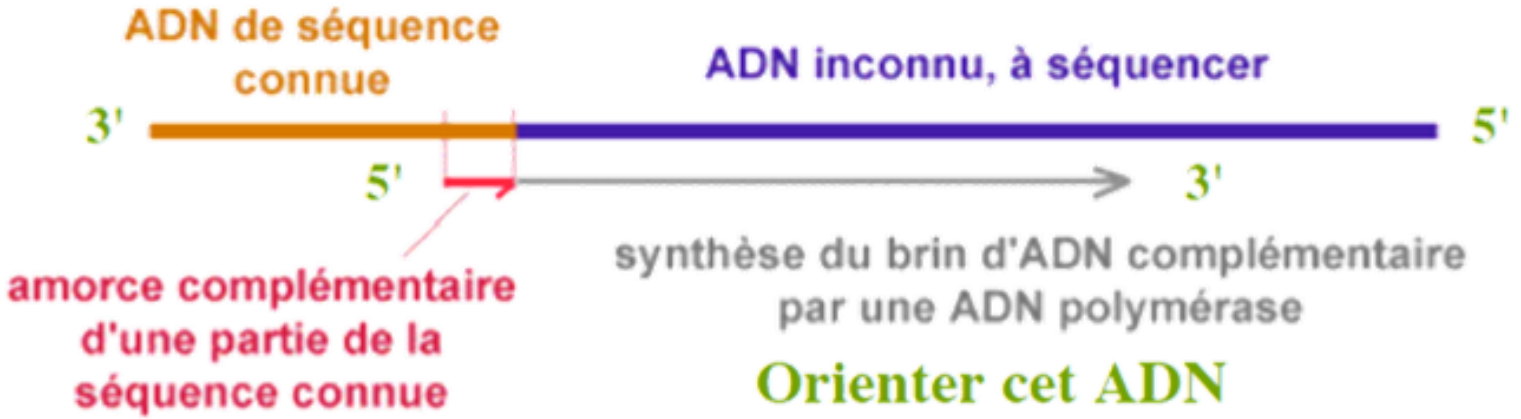
Technique de Sanger



Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

- **le fragment qui doit être séquencé**
- un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer = **amorce**
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase



Le protocole

Il faut préparer 4 mélanges:

- le fragment qui doit être séquencé
- un petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à séquencer
- les 4 dNTP's (dCTP, dATP, dGTP, dTTP)
- l'ADN polymérase

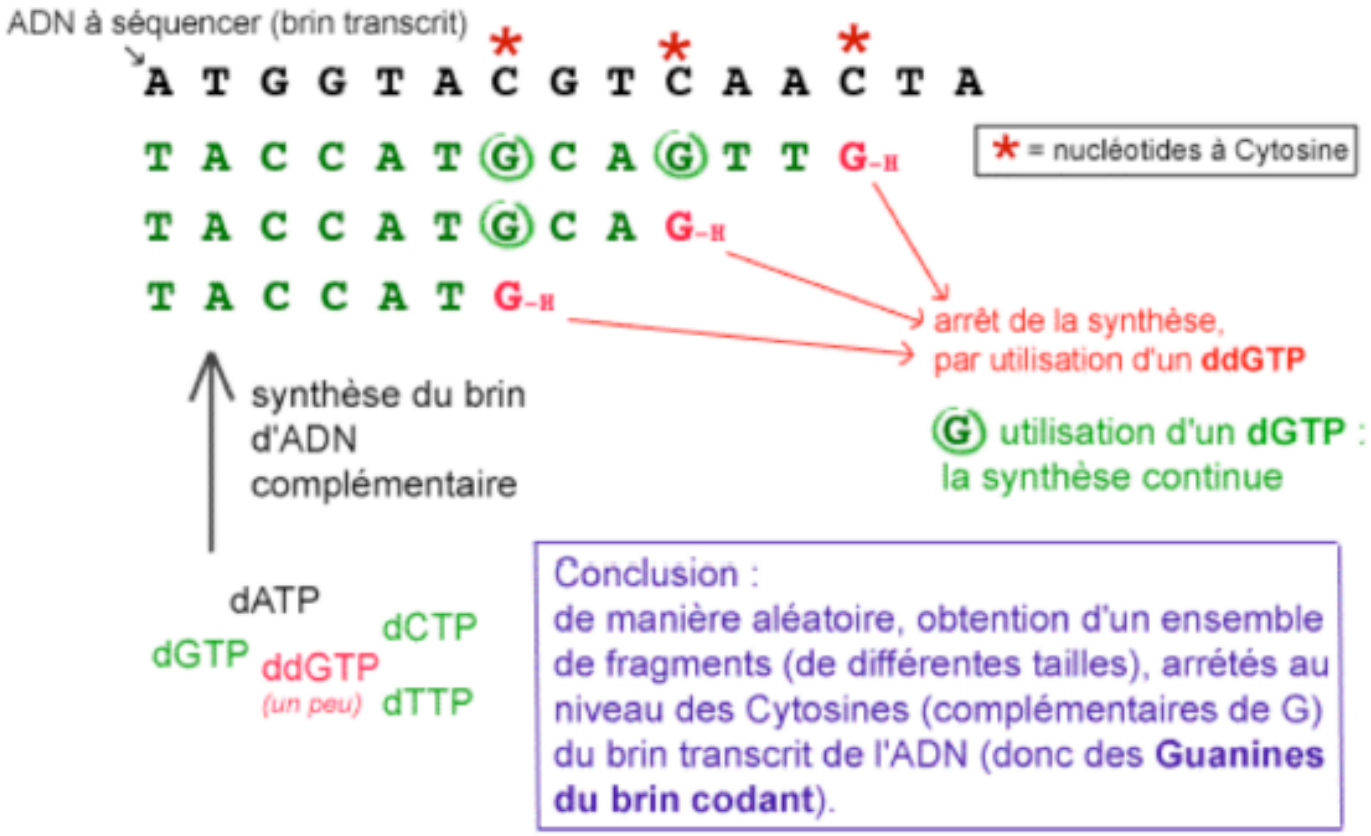
- dans chaque tube, de petites quantités d'un ddNTP fluorescent ou radioactif

--> son incorporation aléatoire stoppant la synthèse

On obtient à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée

L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacement d'un nucléotide donné

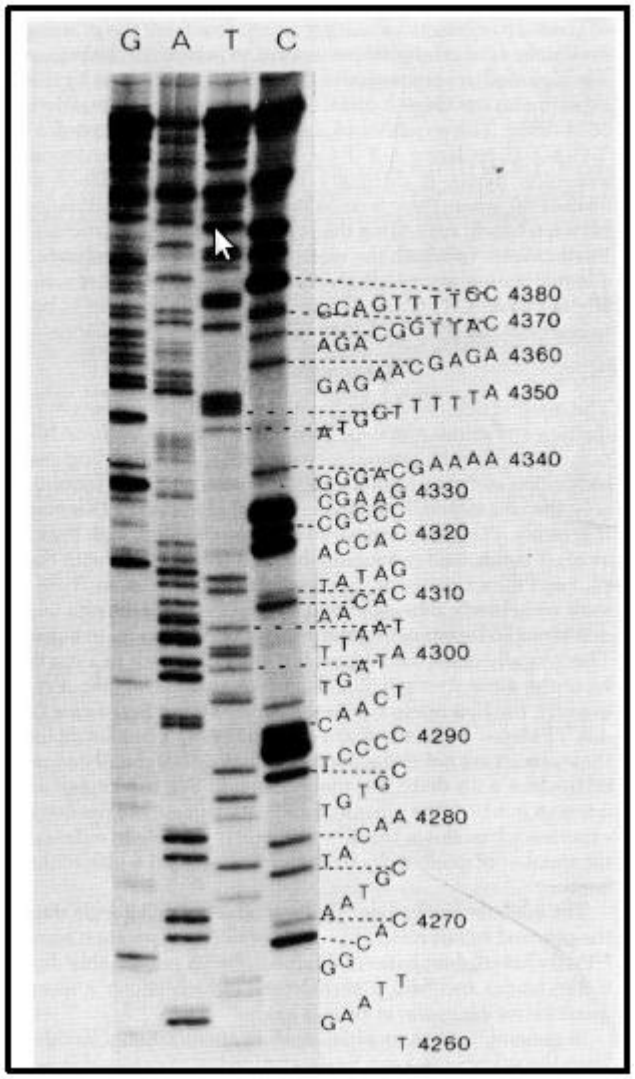
NB synthèse du brin complémentaire, donc si arrêt par un ddGTP, c'est qu'il y a une Cytosine sur la séquence



Lecture de la séquence

-séquençage "à la main"-

- Électrophorèse sur gel d'acrylamide.
- Détection des fragments d'ADN, soit en regardant la fluorescence, soit en exposant un film photographique au gel selon le marquage du ddNTP
- Suivant la taille des gels la séquence lue est limitée de 200 à 750 nucléotides environ



L'automatisation du séquençage

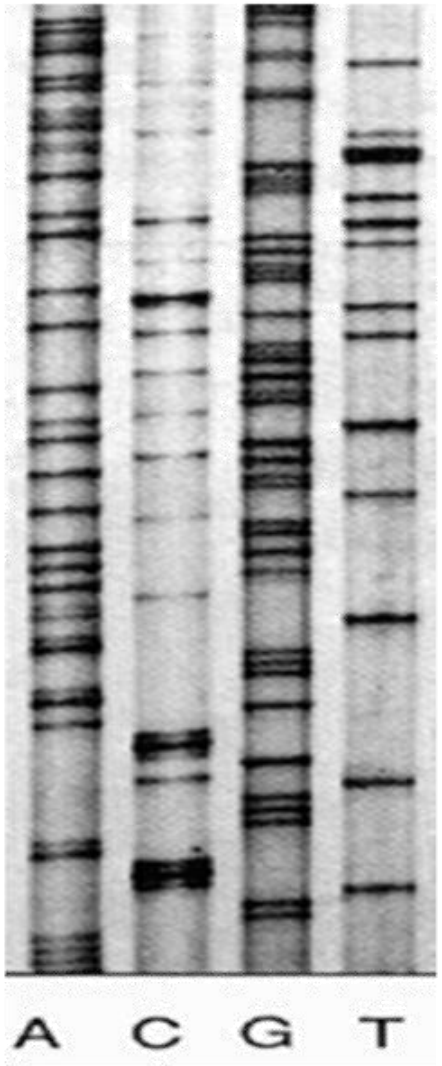
Ajout des 4 ddNTP marqués par un fluorophore différent à la même réaction

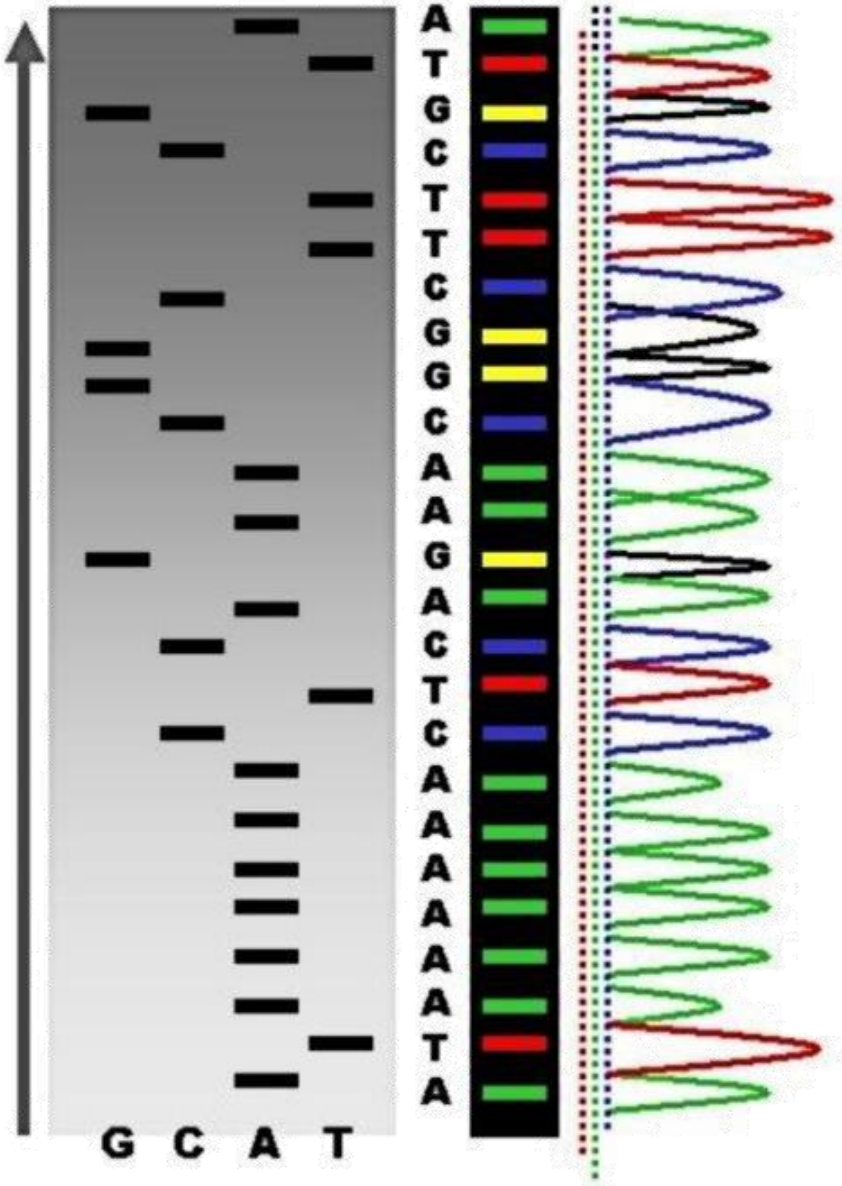
Séquenceurs automatiques capables de réaliser les réactions de séquence, puis de les lire.

Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise.

Séquençage de l'ADN

Technique de Sanger

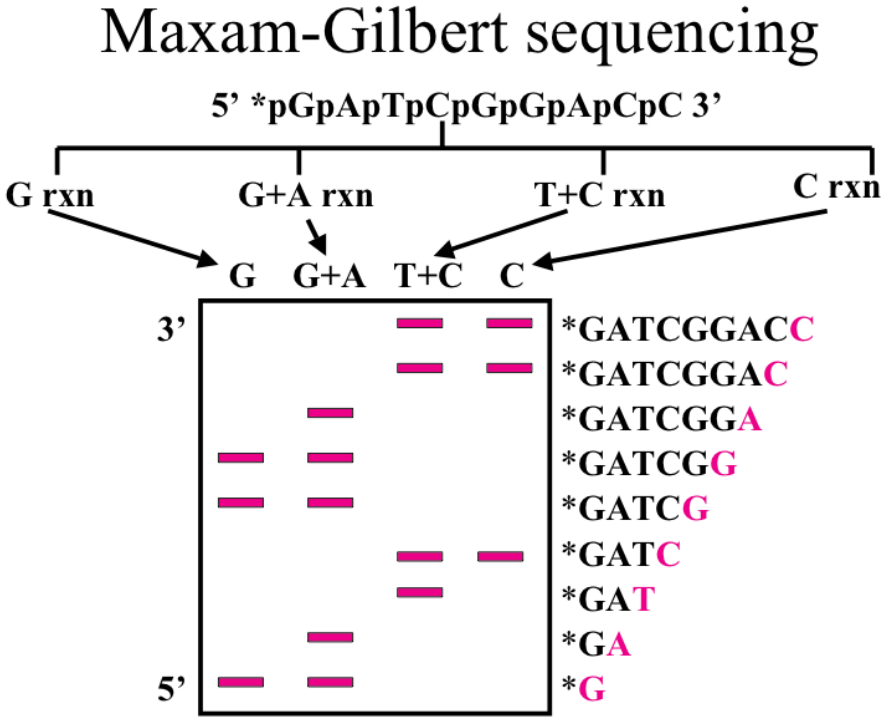




Méthode de Maxam et Gilbert (Prix Nobel de Chimie 1980)

❖ Contrairement à la méthode de Sanger, celle-ci n'utilise quant à elle aucune base modifiée mais une réaction chimique permettant de couper le brin suite à un type de base.

❖Moins facile à robotiser que la méthode de Sanger, utilise des produits chimiques toxiques ➔ cette technique est aujourd'hui très peu utilisée dans les milieux industriels.



Vers la nouvelle génération de Séquençage à haut-débit

1977 Sanger sequencing method by F. Sanger
(PNAS ,1977, 74: 560-564)

1983 PCR by K. Mullis
(Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73)

1953 Discovery of DNA structure
(Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1953;18:123-31)

Human Genome Project
(Nature , 2001, 409: 860–92; Science, 2001, 291: 1304–1351)

1993 Development of pyrosequencing
(Anal. Biochem., 1993, 208: 171-175; Science ,1998, 281: 363-365)

Single molecule emulsion PCR 1998

Founded Solexa 1998

Founded 454 Life Science 2000

454 GS20 sequencer 2005
(First NGS sequencer)

Solexa Genome Analyzer 2006
(First short-read NGS sequencer)

Illumina acquires Solexa 2006
(Illumina enters the NGS business)

ABI SOLiD 2007
(Short-read sequencer based upon ligation)

Roche acquires 454 Life Sciences 2007
(Roche enters the NGS business)

GS FLX sequencer 2008
(NGS with 400-500 bp read lenght)

NGS Human Genome sequencing 2008
(First Human Genome sequencing based upon NGS technology)

Hi-Seq2000 2010
(200Gbp per Flow Cell)

Extrait de la présentation du Dr. Cosentino Cristian, PhD
Genomics and Bioinformatics unit Filarete Foundation–Milan (IT)