

TD n 8 : Le séquençage de l'ADN

Le séquençage d'ADN est la détermination de la succession des nucléotides le composant. C'est devenu un outil essentiel en biologie moléculaire tant en médecine que dans de nombreuses autres disciplines des sciences de la vie.

1. Séquençage 1ère génération : méthode de Sanger

L'ADN à séquencer est appelé l'ADN matrice. Il doit être obtenu sous forme purifiée et être homogène ; c'est-à-dire qu'il ne doit contenir que des molécules d'ADN ayant la même séquence. On utilise couramment comme matrice de l'ADN cloné ou produit par PCR. L'ADN utilisé dans cette méthode doit être simple brin afin d'être copié par l'ADN polymérase. Il est produit par dénaturation de la matrice d'ADN double brin via un traitement thermique ou alcalin. De nombreuses ADN polymérases sont utilisées pour la réaction de séquençage. Les principales sont le fragment de Klenow (une partie de l'ADN polymérase I d'E.coli), une ADN polymérase modifiée tirée du phage T appelée la Séquenase et la Taq ADN polymérase, qui est aussi utilisée en PCR.

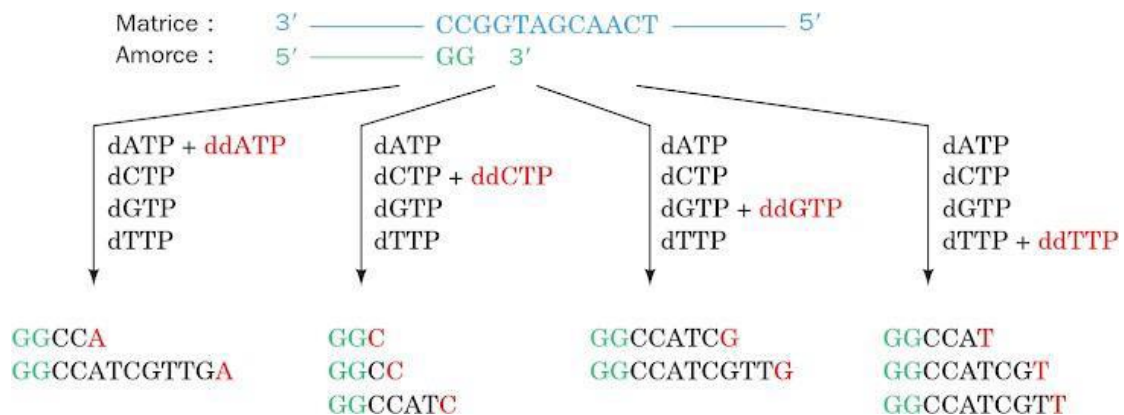
Toutes ces ADN polymérase ont besoin d'une région d'ADN double brin pour pouvoir initier la synthèse d'ADN à partir d'une matrice simple brin. Celle-ci est fournie par addition, dans le milieu réactionnel d'amorces qui s'apparient à l'ADN matrice et déterminent ainsi le point où commencera le séquençage.

On prépare quatre milieux réactionnels différents, tous contiennent :

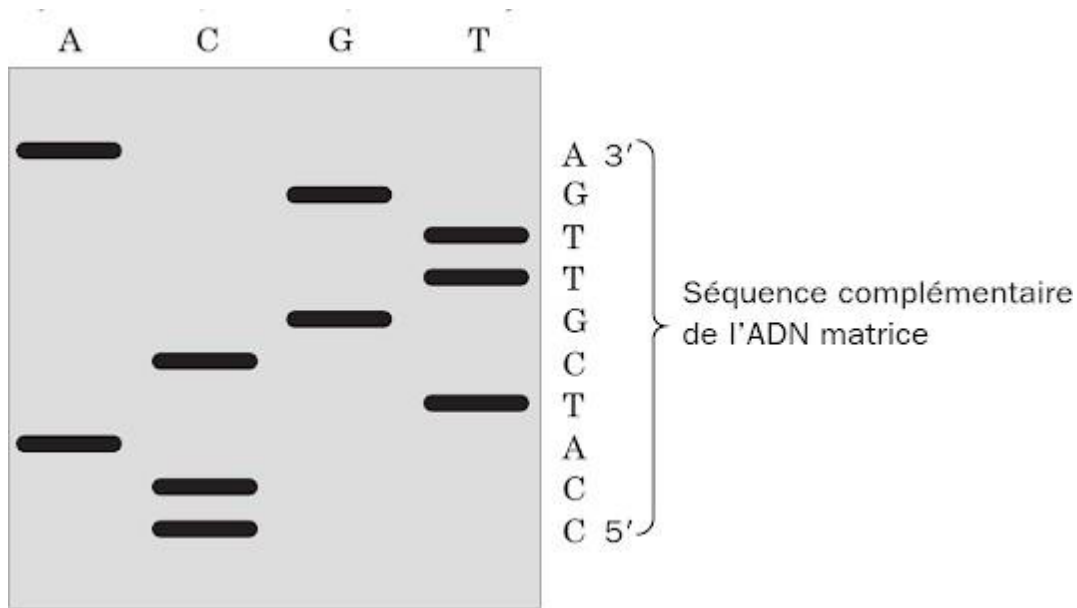
L'ADN matrice sous forme simple brin, de l'ADN polymérase, des amorces, les quatre désoxynucléotide triphosphate (dNTP) nécessaires à la construction du nouvel ADN. Chacun contient un nucléotide modifié différent, appelé un didésoxynucléotide (ddNTP). Il y a quatre ddNTP qui correspondent aux quatre bases de l'ADN. Ils diffèrent des dNTP par l'absence de groupe hydroxyle sur le carbone 3' du sucre. Ils sont incorporés à l'ADN en croissance par la polymérase, mais cette absence de l'hydroxyle en 3' empêche de former un lien phosphodiester avec le nucléotide qui devrait être ajouté ensuite. Ceci interdit de poursuivre l'élongation du polynucléotide d'ADN en cours de synthèse. Les ddNTP jouent ainsi le rôle d'inhibiteurs de la synthèse de l'ADN.

Chacun des quatre milieux réactionnels préparés pour le séquençage contient un ddNTP différent. Suivant le ddNTP qui est présent, la synthèse se termine à l'endroit où ce

nucléotide modifié est incorporé. A tout moment, durant la synthèse d'ADN, la polymérase peut incorporer à la chaîne en élongation soit un dNTP soit un ddNTP. Dans le premier cas, la synthèse continue tandis que dans le second, la synthèse s'achève en cette position. L'effet global est que dans chacune des quatre préparations, est produite une série de molécules d'ADN de différentes longueurs qui se terminent en une position où dans la matrice est présente la base complémentaire de celle dont la forme de didésoxynucléotide est présente dans le milieu réactionnel considéré



A l'issue de la réaction de séquençage, les molécules d'ADN synthétisées sont séparées suivant leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec les quatre préparations versées sur quatre lignes parallèles du gel. Si on ajoute des dNTP contenant du phosphore ou du soufre radioactif dans les préparations de séquençage, les ADN synthétisés deviennent radioactifs ce qui permet de les détecter par autoradiographie. Lorsque le film est développé, une série de bande est observée dans chacune des lignes du gel. La séquence de l'ADN matrice peut être déterminée en identifiant les plus petites bandes et les bandes de plus en plus grosses et associant la ligne dans le gel à la base terminale



Les didésoxynucléotides peuvent être marqués plutôt que les amorces, ce qui permet d'utiliser un seul mélange au lieu de quatre. Chaque didésoxyribonucléotide est marqué par un fluorophore spécifique. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. Ils sont nommés des terminateurs d'élongation ou Big Dye terminators ou Dye-labeled terminator. Cette adaptation a été proposée par Smith et al. nommer séquençage par arrêt de synthèse à l'aide d'un terminateur marqué (dye terminator sequencing)

II. Séquençage automatisé de l'ADN :

La méthode de Sanger a été développée durant ces 25 dernières années, et cela revient à plusieurs avancées technologiques importantes :

- La mise au point de vecteurs de séquençage, comme le phage M13 développé par Joachim Messing au début des années 1980.
- Le développement de la synthèse chimique automatisée des oligonucléotides qui sont utilisés comme amorces dans la synthèse.
- L'introduction de traceurs fluorescents à la place des marqueurs radioactifs utilisés initialement.
- L'adaptation de la technique PCR pour le séquençage.
- L'utilisation de séquenceurs automatiques de gènes
- L'utilisation de l'électrophorèse capillaire pour séparation et l'analyse

Les séquenceurs en gel plat et les séquenceurs capillaires ont permis une automatisation de la technique dans les laboratoires utilisant couramment le séquençage. La technique de Sanger est celle qui est mise en œuvre dans les premiers séquenceurs automatiques (Le premier séquenceur automatisé a été mis au point en 1987, par la compagnie Applied Biosystem ABI).

L'automatisation du séquençage consiste l'emploi de :

- Système d'électrophorèse piloté par ordinateur,
- Marqueurs fluorescents de différentes couleurs qui sont révélés après excitation par laser à l'aide d'une caméra CCD
- Des logiciels permettant l'analyse des signaux sortant de l'appareil et leur mise en forme sous forme de résultats (électrophorégramme et séquence) (Figure 25)
- Un robot passeur d'échantillon permettant d'enchaîner les échantillons les uns à la suite des autres (passage de plaques de réaction à 96 puits).

