

# Évolution des techniques de séquençage

EL FAHIME Elmostafa<sup>1</sup> and Ennaji Mly Mustapha<sup>2</sup>

1\* Unités d'Appui Technique à la Recherche Scientifique UATRS, Plateforme Biologie moléculaire et Génomique Fonctionnelle, CNRST, RABAT  
elfahime@cnrst.ma

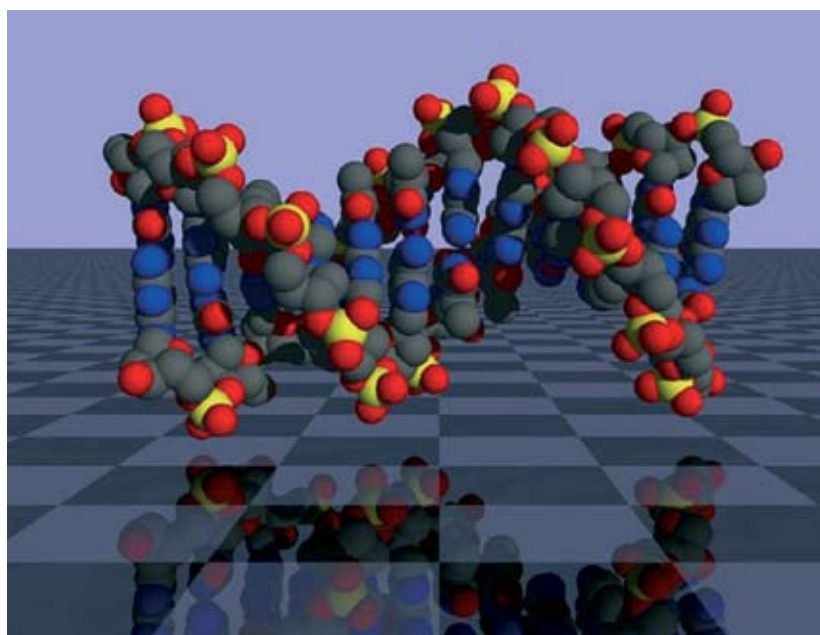
2\* Laboratoire de Virologie, Hygiène et Microbiologie, FST Mohammadia, Université Hassan II - Mohammadia.

**Résumé:** La biologie analytique a connu depuis quelques années une grande révolution en conséquence des progrès technologiques de la biologie moléculaire appliquée au séquençage des génomes. En effet, connaître l'enchaînement complet des bases nucléotidiques qui constituent un génome, c'est connaître toute l'information nécessaire à la vie (du moins en théorie).

Ce n'est que récemment, avec la mise en place des Programmes Génome, que de nombreux génomes, dont celui de l'être humain, sont aujourd'hui séquencés, et que d'autres génomes sont en voie de l'être dans des délais de plus en plus raccourcis. Ces réalisations spectaculaires, sont rendues possible grâce aux développements extraordinaires des techniques de séquençage que nous essayons de passer en revue dans cet article. Nous rappellerons dans un premier temps le principe de base et l'évolution des techniques traditionnelles (Sanger, Maxam et pyroséquençage). Nous discuterons les avantages et les inconvénients de chaque approche avant d'exposer la nouvelle génération de séquenceurs automatisés.

## **Historique**

Le séquençage de l'ADN a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert, (Maxam and Gilbert 1977) aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) en Grande-Bretagne. Ces deux méthodes sont fondées sur des principes diamétralement opposés : l'approche de Sanger est une méthode par **synthèse enzymatique** sélective, tandis que celle de Maxam et Gilbert est une méthode par **dégradation chimique** sélective. Pour cette





découverte, Gilbert et Sanger ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 1980 (Kolata 1980). Par ailleurs, la première méthode non Sanger ayant fait ses preuves dans le domaine de séquençage a été introduite en 1988 (Ronaghi, Uhlen et al. 1998, Hyman et al. 1988), il s'agit de pyroséquençage, une technique principalement basée sur l'addition d'un seul nucléotide qui est révélé en temps réel par détection de la luminescence.

Le début du 21<sup>ème</sup> siècle est marqué par l'avènement de la nouvelle génération de techniques de séquençage, il s'agit en fait de méthodologies nouvelles ou adaptées de séquençage, découlant des avancées technologiques issues de l'évolution des connaissances en physique, informatique, chimie, nanotechnologie et en biotechnologie. Ces innovations technologiques visent à réduire le coût et le temps nécessaire pour le séquençage génome complet, en se basant sur la miniaturisation et le groupage parallèle des réactions dans des volumes très restreint. Deux exemples concernant des technologies novatrices ayant fait leurs preuves dans le séquençage à haut débit de génome complet, à savoir la technologie 454 et la technologie Solexa, seront décrites également.

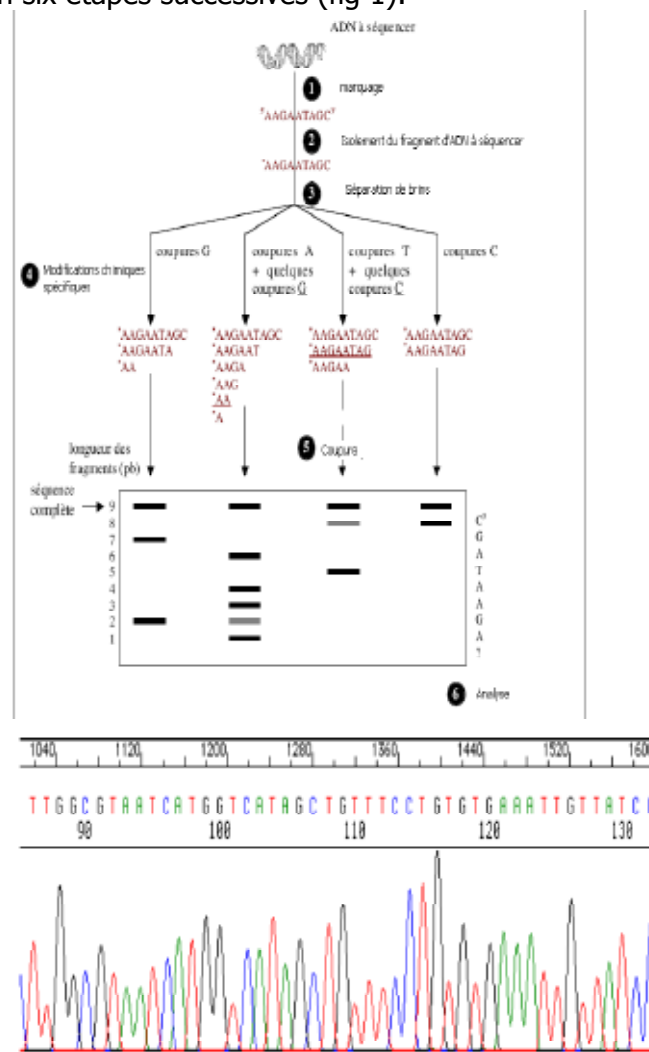
### Principe de la Méthode de Maxam & Gilbert (1977)

Cette méthode utilise des échantillons d'ADN double brin et ne nécessite donc pas le clonage de l'ADN dans un vecteur pour produire de l'ADN simple brin comme c'est le cas pour la méthode de Sanger. Cette méthode est basée sur une dégradation chimique de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases A, T, G et C, pour réaliser des coupures sélectives. Les réactifs sont résumés dans le tableau 1. En reconstituant l'ordre des coupures, on peut remonter à la séquence des nucléotides de l'ADN correspondant.

Tableau 1 : Principaux Agents chimiques utilisés pour la méthode de séquençage de Maxam et Gilbert

Bases	Altération des bases	Suppression des bases	Coupure du brin
G	diméthylsulfate	piperidine	piperidine
A+G	acide	acide	piperidine
C+T	hydrazine	piperidine	piperidine
C	hydrazine + alkali	piperidine	piperidine
A>C	alkali	piperidine	piperidine

On peut décomposer ce séquençage chimique en six étapes successives (fig 1):



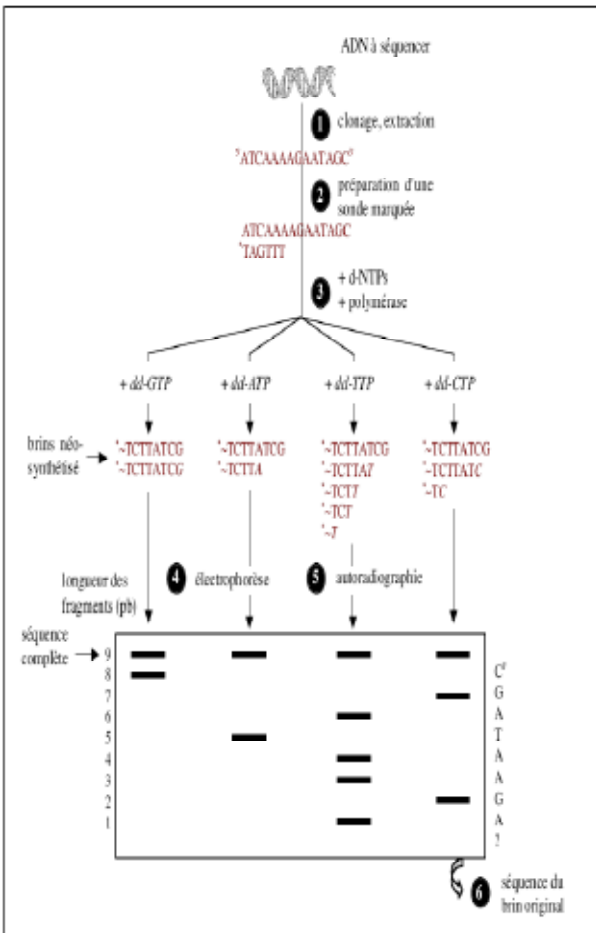
1. Marquage: Les extrémités des deux brins d'ADN à séquencer sont marquées par un traceur radioactif (<sup>32</sup>P). Cette réaction se fait en général au moyen d'ATP radioactif et de polynucléotide kinase.
2. Isolement du fragment d'ADN à séquencer. Celui-ci est séparé au moyen d'une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Le fragment d'ADN est découpé du gel et récupéré par diffusion.
3. Séparation de brins: Les deux brins de chaque fragment d'ADN sont séparés par dénaturation thermique, puis purifiés par une nouvelle électrophorèse.
4. Modifications chimiques spécifiques: Les ADN simple-brin sont soumis à des réactions chimiques spécifiques des différents types de base. Walter Gilbert a mis au point plusieurs types de réactions spécifiques, effectuées en parallèle sur une fraction de chaque brin d'ADN marqué. Par exemple une pour les G (alkylation

par le diméthyle sulfate), une pour G et les A (dépuration), une pour les C et une pour les T (hydrolyse alcaline). Ces différentes réactions sont effectuées dans des conditions très ménagées, de sorte qu'en moyenne chaque molécule d'ADN ne porte que zéro ou une modification.

5. Coupure. Après ces réactions, l'ADN est clivé au niveau de la modification par réaction avec une base, la pipéridine.
6. Analyse. Pour chaque fragment, les produits des différentes réactions sont séparés par électrophorèse et analysés pour reconstituer la séquence de l'ADN. Cette analyse est analogue à celle que l'on effectue pour la méthode de Sanger.

La méthode de Maxam et Gilbert nécessite des réactifs chimiques toxiques et reste limitée quant à la taille des fragments d'ADN qu'elle permet d'analyser (<250 nucléotides). Moins facile à robotiser, son usage est devenu aujourd'hui confidentiel.

**Principe de la Methode de Sanger et Nicklen 1977**



Cette méthode est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire (arrêt d'élongation). L'ADN à séquencer est cloné et de nombreuses molécules d'ADN simple brin sont produites. Une courte amorce d'oligonucléotides (généralement synthétisée chimiquement et éventuellement marquée) est ajoutée à l'ADN. Le point de fixation de l'amorce sert de point de départ pour la synthèse du brin complémentaire. La polymérase est alors ajoutée avec :

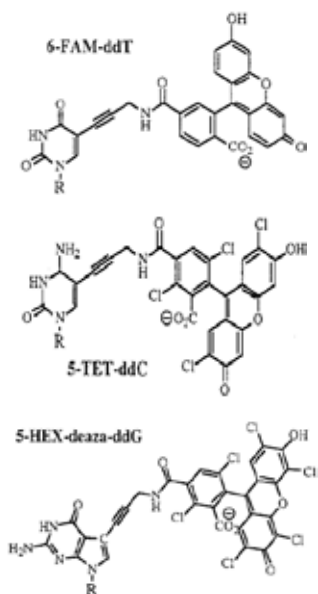
- les 4 nucléotides normaux : d-ATP, d-CTP, d-GTP et d-TTP (au moins un d'entre eux est marqué au phosphore 32, au soufre 35 ou au Phosphore 33) ;

- une faible concentration de 4 nucléotides analogues dans des incubations séparées. Les analogues sont des didésoxynucléotides (ddNTP) qui sont identiques aux nucléotides normaux sauf que les groupes hydroxyles (OH) des riboses sont remplacés par des hydrogènes (H). La polymérase ne peut pas distinguer ce substrat des nucléotides normaux.

La synthèse du brin d'ADN complémentaire est initiée au niveau de l'amorce. L'intégration d'un didésoxynucléotide dans le brin synthétisé entraîne l'arrêt de l'élongation en raison de l'absence du groupement OH, nécessaire à l'extension. Les 4 incubations contiennent donc un mélange de molécules partiellement synthétisées d'ADN double brin marqué. La longueur des fragments d'ADN varie en fonction du point d'intégration du didésoxynucléotide. Comme cette intégration est aléatoire, l'ensemble des molécules dans un mélange représente l'ensemble des positions pour une base particulière. Les 4 mélanges sont analysés simultanément sur un gel d'électrophorèse. Celui-ci contient un composé qui entraîne la dénaturation de l'ADN double brin et le processus est mené sous un voltage fort pour éviter la réassociation des brins. Comme pour la méthode précédente, les bandes sont révélées par autoradiographie et la séquence est lue directement sur le gel (figure 2).

Une adaptation de cette technique consiste à marquer les didésoxynucléotides plutôt que les amorces, ce qui permet de n'utiliser qu'un seul mélange au lieu des quatre nécessaires dans le cas d'un marquage des amorces. Chaque didésoxyribonucléotide est marqué par un

fluorophore spécifique. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "BigDye Terminators" ou "Dye-labeled terminator". Dans ce cas on parle d'un séquençage par arrêt de synthèse à l'aide d'un terminateur marqué «dye terminator sequencing» proposé par Smith et al., (Smith, Sanders et al. 1986). C'est la technique actuellement utilisée dans certains séquenceurs automatisés.



Ci-dessous, un exemple de structures de ddNTP fluorescents :

### **Automatisation de la technique de Sanger**

Au cours des 25 dernières années, la méthode de Sanger a été largement développée grâce à plusieurs avancées technologiques importantes :

- La mise au point de vecteurs de séquençage adaptés, comme le phage M13 développé par Joachim Messing au début des années 1980 (Messing 1983).
- 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. Ce progrès a permis de sortir le séquençage des pièces confinées, réservées à l'usage des radioisotopes.
- L'adaptation de la technique PCR pour le séquençage.
- L'utilisation de séquenceurs automatisés de gènes

- L'utilisation de l'électrophorèse capillaire pour la séparation et l'analyse

A côté des séquenceurs en gel plat, les séquenceurs capillaires ont apporté une plus grande automatisation dans les laboratoires de plus en plus demandeurs en séquençage de routine. La technique de Sanger est celle qui est mise en œuvre dans les premiers séquenceurs automatisés (Le premier séquenceur automatisé a été mis au point en 1987, par la compagnie applied Biosystem ABI). En général l'automatisation requiert l'emploi :

- d'un système d'électrophorèse piloté par ordinateur,
- des marqueurs fluorescents de différentes couleurs qui sont révélés après excitation par un 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 3).
- d'un robot passeur d'échantillon permettant d'enchaîner les échantillons les uns à la suite des autres (notamment passage de plaques de réaction à 96 puits (12x8)).

### **Les séquenceurs capillaires**

Un séquenceur de gène à capillaire utilise des tubes capillaires de verre ayant quelques microns de diamètre, sur plusieurs dizaines de centimètres de longueur (30 à 50 cm en général), pour réaliser la séparation des brins d'ADN durant l'électrophorèse. Avec généralement un nombre de capillaires multiples de 2 (2, 4, 8, 16...). On multiplie ainsi le nombre de migrations simultanées, ce qui permet de passer un plus grand nombre d'échantillons dans le même laps de temps. Les instruments à capillaire les plus modernes de séquençage automatique de l'ADN sont capables de lire jusqu'à 384 échantillons d'un coup (1 run) et réaliser jusqu'à 24 runs en une journée. Ces instruments ne réalisent que la séparation des brins et la lecture des pics ; les réactions de séquençage, la purification et la suspension dans un tampon approprié doivent être réalisées séparément, de façon manuelle ou à l'aide d'un robot pipeter.

Les séquenceurs automatisés présentent de nombreux avantages : l'automatisation et l'utilisation d'une chromatographie au lieu d'une électrophorèse permet un gain de temps appréciable. Le coût de revient est bien moindre





(une fois amorti l'investissement dû à l'achat de la machine). De plus, alors qu'on ne peut guère espérer lire plus de 300 nucléotides de manière correcte lors d'un séquençage «à la main», les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité, jusqu'à 1000 à 1100 pb pour les appareils les plus performants. La seule limitation à l'utilisation de séquenceurs automatiques reste leur coût élevé d'achat et de maintenance, ce qui impose, concrètement, la mise en place de services communs de séquençage dans les centres de recherches.

**Le pyrosequençage: Methode non sanger de séquençage**

Le pyrosequençage est de loin la technique non\_Sanger qui a connu le plus de succès. Cette technique de séquençage d'ADN introduite depuis 1988, par Hyman et al., (Hyman 1988), et amélioré par un groupe suédois (Ronaghi, Karamohamed et al. 1996; Ronaghi, Pettersson et al. 1998; Ronaghi, Uhlen et al. 1998) par introduction de la PCR. Il s'agit d'un séquençage par synthèse (sequencing by synthesis, SBS) et qui se caractérise par la révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase (real time sequencing) qui ajoute un seul nucléotide non fluorescent à la fois.

**Principe du pyrosequençage**

Le pyroséquençage se déroule en 5 étapes illustrées dans la figure 4:

Etape 1: Consiste à préparer le mélange réactionnel, avec les enzymes clefs et les différents substrats

Etape 2: Ici, les nucléotides ne sont pas ajoutés tous ensemble comme dans une réaction de séquençage normale mais l'un après l'autre. Si le Nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (d'élongation) et libère un Pyrophosphate.

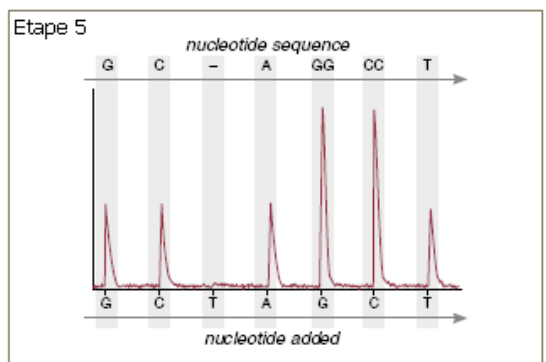
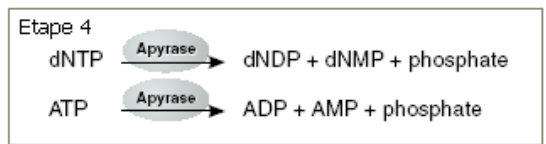
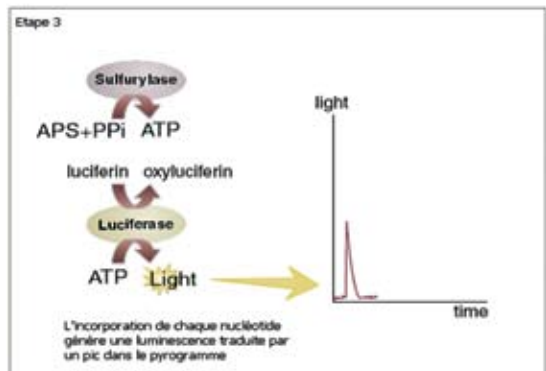
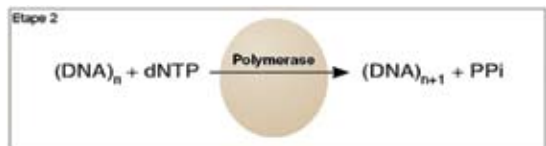
Etape 3: L'ATP sulfurylase vient alors transformer ce Pyrophosphate (PPi) en ATP qui est alors utilisé, couplé à une Luciférine, par une Luciférase. On a alors production d'Oxyluciférine et d'un signal Lumineux

Etape 4: L'Apyrase dégrade les nucléotides en surplus.

Etape 5: Le signal lumineux est capté par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) puis reproduit sous forme d'un pic sur le Pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité

du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence à partir de la taille des pics obtenus. Par ailleurs, en cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet d'avoir une quantification de la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides. Les différentes applications du pyroséquençage ont été résumé par (Ronaghi 2001) et par (Langae and Ronaghi 2005).

Etape 1  
Une amorce de séquençage est hybridé à la matrice d'ADN simple brin obtenu par PCR en présence des enzymes suivantes ( ADN polymérase, ATP sulfurylase, luciférase et Apyrase) des substrats, Adénosine 5' phosphosulfate (APS) et luciférine





## Figure 4 : Principales étapes du déroulement de pyroséquençage

### Avantages et limitations de la technique de pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique qui permet d'effectuer un séquençage rapide et à moindre coût qu'un séquençage par la méthode de Sanger. En effet, cette technique ne nécessite pas de clonage (donc gain de temps et d'argent), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage.

Cependant, malgré sa conception élégante, le pyroséquençage présente par ailleurs des limitations dont la principale est liée à son utilisation pour le séquençage des génomes complets, puisque la longueur de la séquence lue ne dépasse pas les 100 pb.

Avec une telle capacité de lecture le pyroséquençage trouve par ailleurs des applications potentielles dans l'identification d'étiquettes des séquences (sequence tag) comme dans le cas de l'analyse en série de l'expression des gènes (serial analysis of gene expression: SAGE, (Velculescu, Zhang et al. 1995)), pour le miniséquençage de SNP connu, et pour la cartographie relative des génomes par rapport à une séquence de référence.

Différentes approches ont par ailleurs été proposées pour augmenter la longueur de la séquence lue, notamment l'utilisation de protéine qui se lie à l'ADN simple brin (Ronaghi 2000), l'utilisation de la forme isomérique Sp du dATP (dATP<sup>o</sup>S) (Gharizadeh, Nordstrom et al. 2002), et le remplacement de l'apyrase par une étape de lavage (réduisant ainsi le système à 3 enzymes au lieu de 4) (Mashayekhi and Ronaghi 2007).

### Nouvelles technologies de Séquençages à haut débit

Au cours des dernières années, plus d'une dizaine d'entreprises et d'institutions académiques sont inscrites dans la course dont un bon nombre en Californie (comme Applied biosystems Group, l'Université de Stanford, Affymetrix, Microchip Biotechnologies, Perlegen Sciences, Solexa, 454 life science et Pacific Biosciences) pour le développement de nouvelles technologies de séquençage de génome complet qui intègre haute débit et rapidité avec un coût moindre.

Nous décrivons ici deux technologies

élégantes qui sont actuellement disponibles sur le marché, et qui sont représentatives de la nouvelle génération des séquenceurs à haut débit: la technologie 454 et la technologie CRT Solexa/illumina.

### La Technologie 454

La compagnie 454 Life Science, basée à Branford (Connecticut) aux États Unis, spécialisée dans la fabrication de séquenceur de gènes à haut débit (C'est cette société qui s'est lancée dans le projet de séquençage du génome de l'homme de Néandertal, en collaboration avec le Max Planck institut, et c'est elle qui a annoncé récemment le séquençage du génome du prix Nobel, Jim Watson) a développé une technologie de séquençage innovante (four five four: pour facile functional findings) (Margulies, Egholm et al. 2005) caractérisée par la mise en oeuvre de la nanotechnologie pour le séquençage. Cette technique permet de traiter avec un seul instrument le GS20, plus de 20 millions de bases nucléotidiques par cycle de quatre heures, ce qui correspond à plus de 100 fois la capacité des instruments reposant sur les techniques actuelles à l'échelle macroscopique. En effet, cette technique ne nécessite pas de clonage (donc gain de temps et d'argent), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage. Une seule machine (GS20) génère en fait, avec plus de 99% d'exactitude, autant de données que 100 séquenceurs capillaires à haut débit.

### Principe de la technologie 454

La technologie de 454 Life Sciences conçue par J. Rothberg (Margulies, Egholm et al. 2005) est fondée sur l'intégration de plusieurs techniques : le pyroséquençage, les technologies des plaques en fibre optique picotitré [PicoTiterplate (PTP)] qui contient 1.6 millions de puits. (un picolitre est un billionième de litre), la PCR en émulsion (emPCR) dans des microréacteurs (gouttelettes d'une émulsion) (300 000 réactions PCR en parallèle), ainsi que des technologies informatiques de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images. Les différentes étapes du processus ainsi que leur durée sont répertoriées sur la figure 5.

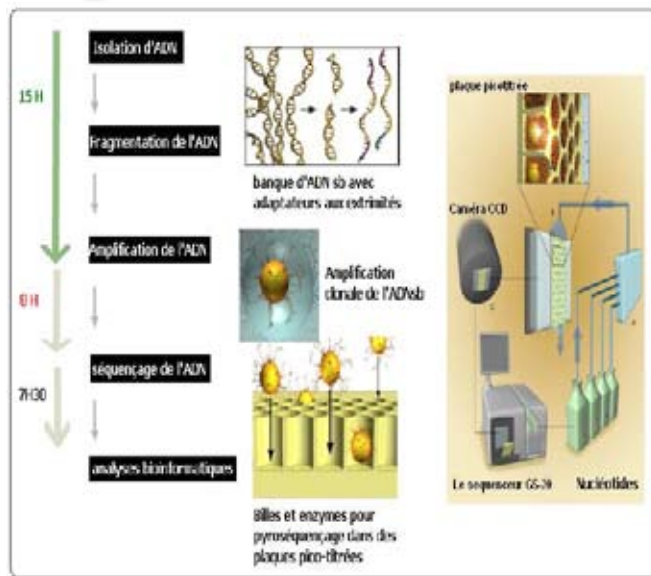


Figure 5 : Résumé des principales étapes de séquençage par la technologie 454.

### Etape 1 : Préparation d'une banque ADN simple brin (ADN sb) avec deux adaptateurs.

L'ADN génomique est fragmenté par nébulisation, deux adaptateurs (A et B) sont fixés par ligation aux deux extrémités. Un adaptateur est lié à la biotine pour permettre la purification des molécules d'ADN porteuses des adaptateurs A et B.

### Etape 2 : Amplification clonale des molécules d'ADN simple brin.

Des microbilles avec en surface des amorces complémentaires à un des adaptateurs permettent de fixer une molécule d'ADNsb à la fois. Les microbilles porteuses des brins d'ADNsb sont mises en émulsion en présence des réactifs pour PCR. Chaque goutte (microréacteurs) englobe une microbille et donc une molécule d'ADN, ce qui permet une amplification clonale de chaque fragments.

### Etape 3 : Séquençage dans des plaques pico-filtrées.

Après amplification les microgouttelettes (microréacteurs) sont dissociées, et les microbilles porteuses de l'ADN simple brin largement amplifié sont pipetées dans une plaque en fibre optique contenant 1,4 millions de puits. Les puits possèdent un diamètre qui assure le dépôt d'une microbille par puits. Avec ce système, 400 000 réactions de séquençage peuvent se faire en parallèle. Le séquençage se fait selon le principe de pyroséquençage décrit ci haut. Une caméra CCD permet de capturer les images après addition de chaque nucléotide.

### Etape 4 : Analyse des images et détermination de la séquence d'ADN.

Connaissant l'ordre dans lequel les 4 nucléotides sont ajoutés automatiquement, l'analyse des différentes

images capturées permet la déduction de la séquence des différents morceaux d'ADN (illustré par pyrogramme). Des logiciels bioinformatiques sont ensuite utilisés pour reconstituer la séquence initiale grâce aux groupages des contigs.

## La technologie CRT Solexa/illumina

La société Solexa, récemment achetée par la firme Illumina (San Diego, USA), a développé une technologie de séquençage sur puce, fondée sur l'intégration de plusieurs techniques : les biopuces à ADN, la nanotechnologie, une variante de la technique de Sanger appelé CRT (cyclic reversible termination), ainsi que des technologies informatiques de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images. Les coûts de séquençage sont réduits de façon drastique en supprimant l'étape lente d'amplification de l'ADN, en travaillant dans un volume de réaction très réduit et avec une préparation minimale de l'échantillon et en éliminant l'étape d'électrophorèse.

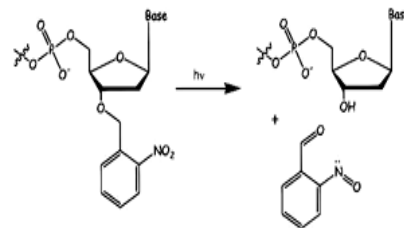


Figure 6 : Illustration de la déprotection d'un nucléotide protégé en 3'-O par le groupement 2-nitrophényl après illumination au UV >30 nm

Le principe de séquençage est basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents (CRT : cyclic reversible termination) et par lecture optique de la fluorescence. Comme pour la technique de Sanger il s'agit d'une terminaison de synthèse basée sur l'utilisation d'un terminateur réversible contenant un groupement de protection attaché au nucléotide qui termine la synthèse d'ADN. L'élimination du groupement de protection par photoclivage utilisant la lumière ultraviolette (> 300nm) (figure 6) permet la restauration du groupement fonctionnel du nucléotide incorporé, ce qui permet à l'ADN polymérase d'incorporer le prochain nucléotide et ainsi de suite. Il s'agit également, d'un séquençage en temps réel, basé sur la détection de la fluorescence mais en présence des 4 nucléotides marqués (ce qui constitue un avantage par rapport à la technologie 454) et



sans recours à l'électrophorèse (ce qui constitue un grand avantage par rapport au séquenceur à capillaire). Chaque cycle comprends donc 3 étapes: (i) Incorporation, (ii) Détection et (iii) Déprotection. Ce cycle rappelle en quelque sorte les étapes de la synthèse chimique des oligonucléotides.

Un exemple d'un terminateur réversible qui est le nucléotide protégé en 3'-O est illustré sur la figure 6. Bien que la protection des groupes peut être aussi bien attachée sur d'autres emplacements sur le nucléotide (Li, Bai et al. 2003).

La très haute densité de la puce (plus de 100 millions de molécules par centimètres carrés) permet de séquencer environ 100.000 paires de bases par seconde. Des molécules de 25 paires de bases sont séquencées puis alignées, grâce à un logiciel, et comparé à une séquence de référence pour reconstituer la séquence.

L'Analyseur Génétique 1G, commercialisé par Illumina est utilisé pour les grands projets de reséquençages, étant donné qu'il a la possibilité de générer de grandes quantités de données encore plus vite et plus économiquement, grâce à la miniaturisation et le groupage des réactions. Ceci est intéressant surtout pour le reséquençages de gène candidat, donc aussi pour le séquençage ultra profond pour la reconnaissance de très rares SNP et Mutations.

Les différentes étapes de processus de séquençage sont répertoriées sur la figure 7.

**Etape 1:** Préparation de la banque d'ADN génomique.

L'ADN génomique est fragmenté par nébulisation; les extrémités sont réparées et des adaptateurs sont fixés sur chaque extrémité par ligation.

**Etapes 2 -6 :** L'ADN est coulé dans des cellules spécialement conçues pour assurer la fixation de chaque molécule d'ADN obtenu après amplification en phase solide de la première molécule d'ADN fixé grâce aux adaptateurs. La formation des ponts d'amplifications permet d'avoir une haute densité de brins d'ADN ce qui facilite et augmente le débit de séquençage.

**Etapes 7-11 :** Le Séquençage des fragments amplifiés se fait par synthèse utilisant l'approche (CRT : cyclic reversible termination) décrite ci-dessus. La technologie est basée sur la lecture de courts fragments d'environ 25 à 30 pb.

**Etape 12 :** Analyse des données à l'aide d'un logiciel approprié.

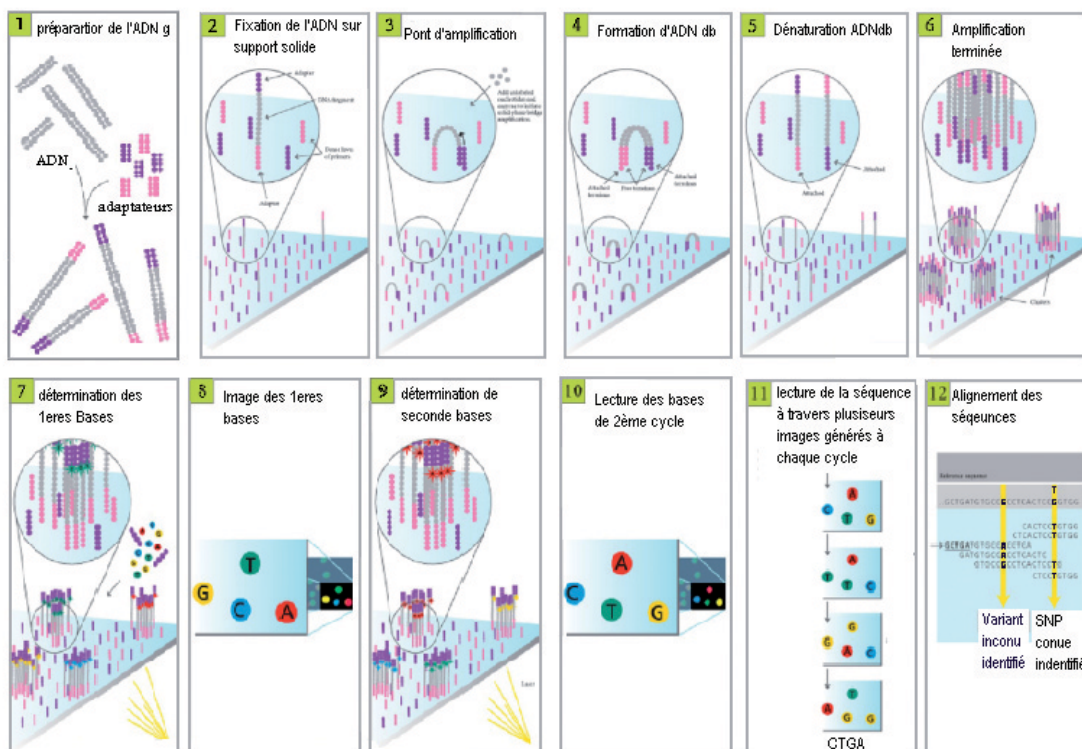


figure 7: Système Illumina: Illustration des différentes étapes d'amplification d'ADN sur support solides (puces) et de principe de séquençage basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents.





## Les techniques de séquençage de demain:

A la lecture des résumés des projets relatifs à la mise au point des nouvelles technologies de séquençage subventionnés par la prestigieuse Institut américaine de recherche sur le génome humaine (NHGRI), (voir <http://www.genome.gov/12513162>), les techniques de séquençage de demain seront probablement :

- le pyroséquençage
- le passage des fragments d'ADN au travers de nanopores constitués de protéines (hémolysine) incluses dans une bicouche lipidique
- le séquençage par hybridation (technique déjà utilisée pour le RE-séquençage)
- la spectrométrie de masse appliquée aux fragments d'ADN
- la visualisation directe de molécule d'ADN par microscopie de force atomique

## Conclusion

La constitution d'un inventaire exhaustif des instructions, ou gènes, contenues dans un génome est la principale raison des programmes de séquençage. La connaissance des gènes est en effet une étape indispensable à la compréhension des phénomènes biologiques au niveau moléculaire et cellulaire. Dans les années à venir, les applications seront de plus en plus nombreuses dans les domaines de la médecine et des industries

pharmaceutiques, biotechnologiques, agro-alimentaires, ainsi que dans d'autres domaines en prises directes avec les processus biologiques (agriculture, environnement). Pour toutes ces applications, la séquence est le point de départ. Si le premier séquençage a coûté environ 500 millions de dollars, actuellement les coûts de séquençage d'un génome se situe entre 300 milles et 500 mille \$, et l'ultime objectif attendus derrière les récentes innovations et développements technologiques est de faire tomber le coût de séquençage d'un génome complet vers les 1000\$ environ (Service 2006). Il s'agit en faite de rendre accessible à tout, le séquençage de son propre génome, une sorte de démocratisation de séquençage et par conséquence de ses retombés socioéconomiques. Ces méthodologies nouvelles apparaissent, découlant des avancées tech nologiques issues de l'évolution des connaissances en physique, informatique, chimique et en nanobiotechnologie qui visent d'une part la miniaturisation et donc la réduction des volumes réactionnelles, et le groupe de réactions.

### RÉFÉRENCES

Gharizadeh, B., T. Nordstrom, et al. (2002). «Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O <sup>2</sup> -(1-thiotriphosphate) 5P-isomer» <i>Anal. Biochem.</i> <b>301</b> (1): 82-90.	Hyman, E. D. (1998). "A new method of sequencing DNA." <i>Anal. Biochem.</i> <b>174</b> (2): 423-36.	Kolata, G. B. (1980). "The 1980 Nobel Prize in Chemistry." <i>Science</i> <b>210</b> (4472): 887-9.	Langae, T. and M. Ronaghi (2005). "Genetic variation analyses by Pyrosequencing." <i>Mutat. Res</i> <b>573</b> (1-2): 96-102.	Li, Z., X. Bai, et al. (2003). «A photodegradable fluorescent nucleotide for DNA sequencing and analysis.» <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> <b>100</b> (2): 414-9.	Margulies, M., M. Egholm, et al. (2005). «Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.» <i>Nature</i> <b>437</b> (7057): 376-80.	Mashayekhi, F. and M. Ronaghi (2007). "Analysis of read length limiting factors in Pyrosequencing chemistry." <i>Anal. Biochem.</i> <b>363</b> (2): 275-87.	Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977). "A new method for sequencing DNA." <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> <b>74</b> (2): 560-4.	Messing, J. (1983). "New M13 vectors for cloning." <i>Methods Enzymol.</i> <b>101</b> : 20-78.	Ronaghi, M. (2000). "Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein." <i>Anal. Biochem.</i> <b>286</b> (2): 282-8.	Ronaghi, M. (2001). "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing." <i>Genome Res</i> <b>11</b> (1): 3-11.	Ronaghi, M., S. Karamohamed, et al. (1998). "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." <i>Anal. Biochem.</i> <b>242</b> (1): 84-9.	Ronaghi, M., B. Pettersson, et al. (1998). "PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing." <i>Biotechniques</i> <b>25</b> (5): 876-8, 880-2, 884.	Ronaghi, M., M. Uhlen, et al. (1998). "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." <i>Science</i> <b>281</b> (5375): 363, 365.	Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> <b>74</b> (12): 5463-7.	Service, R. F. (2006). "Gene sequencing. The race for the \$1000 genome." <i>Science</i> <b>311</b> (5767): 1544-6.	Smith, L. M., J. Z. Sanders, et al. (1986). "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis." <i>Nature</i> <b>321</b> (6071): 674-9.	Velculescu, V. E., L. Zhang, et al. (1995). «Serial analysis of gene expression.» <i>Science</i> <b>270</b> (5235): 484-7.
---	--	---	---	--	---	---	---	--	--	--	--	--	---	---	---	--	--

**ScInS**  
Scientific Instrument Service

- PH, mV, ionométrie et conductimétrie
- Titrage, Karl Fisher
- Analyse de traces
- Voltamétrie et impédance (EIS)

