

Séquençage du Génome

La connaissance de la séquence nucléotidique d'un gène fournit des informations importantes sur sa structure, sa fonction et sa relation évolutive avec d'autres gènes similaires dans le même organisme ou dans des organismes différents. Ainsi, le développement dans les années 1970 de méthodes relativement simples de séquençage de l'ADN a eu un grand impact sur la génétique. Deux méthodes de base pour le séquençage de l'ADN ont été développées: une méthode de clivage chimique (A. M. Maxam et W. Gilbert, 1977) et une méthode enzymatique (F. Sanger, 1981). Un bref aperçu des principes sous-jacents suit.

Séquençage par dégradation chimique

Cette méthode utilise le clivage de l'ADN spécifique de la base par certains produits chimiques. Quatre produits chimiques différents sont utilisés dans quatre réactions, une pour chaque base. Chaque réaction produit un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles. Les tailles des fragments dans un mélange réactionnel sont déterminées par des positions dans l'ADN du nucléotide qui a été clivé. Un fragment d'ADN à séquencer à double brin ou à simple brin est traité pour obtenir un seul brin marqué avec un isotope radioactif à l'extrémité 5' <fn>Brown, T.A. Genomes. Bios Scientific Publ., Oxford, 1999. </fn>. Ce brin d'ADN est traité avec l'un des quatre produits chimiques pour l'une des quatre réactions. Ici, la réaction sur les sites de guanine (G) par du diméthylsulfate (DMS) est montrée. Le sulfate de diméthyle attache un groupe méthyle au cycle purine des nucléotides G. La quantité de DMS utilisée est limitée de sorte qu'en moyenne, un seul nucléotide G par brin soit méthylé, pas les autres (représentés ici dans quatre positions différentes de G). Lorsqu'un second produit chimique, la pipéridine, est ajouté, le cycle purine nucléotidique est éliminé et la molécule d'ADN est clivée au niveau de la

liaison phosphodiester juste en amont du site sans la base. La procédure globale résulte en un ensemble de fragments marqués de tailles définies en fonction des positions de G dans l'échantillon d'ADN en cours de séquençage. Des réactions similaires sont effectuées pour les trois autres bases (A, T et C non représentées). Les quatre mélanges réactionnels, un pour chacune des bases, sont placés dans des voies séparées d'une électrophorèse sur gel de Polyacrylamide. Chacune des quatre voies représente l'une des quatre bases G, A, T ou C. Le plus petit fragment migre le plus vers le bas, le suivant un peu moins loin, etc. On peut alors lire la séquence dans le sens opposé à la migration pour obtenir la séquence dans la direction 5' vers 3' (ici TAGTCGCAGTACCGTA).

Séquençage par terminaison de chaîne (séquençage Sanger)

Cette méthode, maintenant beaucoup plus utilisée que la méthode de clivage chimique, repose sur le principe que la synthèse de l'ADN est terminée quand au lieu d'un désoxynucléotide normal (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), un didésoxynucléotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) est utilisé. Un didésoxynucléotide (ddNTP) est un analogue du dNTP normal. Il diffère par l'absence d'un groupe hydroxyle à la position 3' du carbone. Lorsqu'un didésoxynucléotide est incorporé pendant la synthèse de l'ADN, aucune liaison entre sa position 3' et le nucleotide suivant n'est possible parce que le ddNTP ne possède pas le groupe hydroxyle en 3'. Ainsi, la synthèse de la nouvelle chaîne est terminée sur ce site. Le fragment d'ADN à séquencer doit être simple brin <fn> Brown, T.A. Genomes. Bios Scientific Publ., Oxford, 1999. </fn>. La synthèse d'ADN est initiée en utilisant une amorce et l'un des quatre ddNTP marqués avec ^{32}P dans les groupes phosphate ou, pour un séquençage automatisé, avec un fluorophore (voir plaque suivante). Ici, un exemple de terminaison de chaîne utilisant ddATP est montré <fn> Strachan, T., Read, A.P. .:

Human Molecular Genetics. 2e éd. Bios Scientific Publishers, </fn>. Chaque fois qu'une adénine (A) apparaît dans la séquence, le didésoxyadénine triphosphate provoque la terminaison de la nouvelle chaîne d'ADN synthétisée. Ceci produira un ensemble de fragments d'ADN différents dont les tailles sont déterminées par les positions des résidus d'adénine apparaissant dans le fragment à séquencer. Des réactions similaires sont faites pour les trois autres nucléotides. Les quatre réactions parallèles donneront un ensemble de fragments avec des tailles définies en fonction des positions des nucléotides où la nouvelle synthèse d'ADN a été terminée. Les fragments sont séparés selon la taille par électrophorèse sur gel comme dans la méthode chimique. Le gel de séquence est lu dans la direction allant de petits fragments à de grands fragments pour dériver la séquence nucléotidique dans la direction 5 'vers 3'. Un exemple d'un gel de séquençage réel est montré entre les panneaux A et B.