

# **Biologie Moléculaire et Génie Génétique**

## **Chapitre VI : LE SEQUENÇAGE**

**Dr. SELKA SARRA**

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté SNV-STU

Département de Biologie

Email: [s.selka.sek@gmail.com](mailto:s.selka.sek@gmail.com)

# Chapitre VI : LE SEQUENÇAGE



## I. Principe

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la **succession linéaire** des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci.

Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les études génétiques, l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologiques.

Deux méthodes ont été développées pour déterminer la séquence en nucléotides des molécules d'ADN :

- **Méthode MAXAM et GILBERT** : **dégradation chimique.**
- **Méthode de SANGER** : **terminaison de chaînes par un didésoxyribonucléoside triphosphate (ddNTP).**

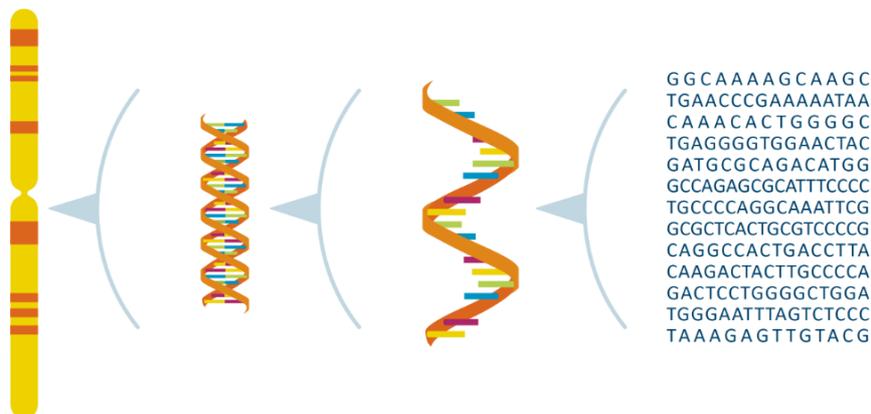


Fig.1 Le principe du séquençage de l'ADN

## II. Technique chimique de Maxam et de Gilbert

La méthode chimique de Maxam et de Gilbert est moins utilisée actuellement que la méthode enzymatique de Sanger. Le séquençage de Maxam-Gilbert repose sur la modification chimique de l'ADN suivie du clivage spécifique à certaines bases, permettant ainsi de déterminer l'ordre des bases (A, T, C, G) dans une séquence.

Après clivage par ces réactifs, les fragments produits sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide, l'examen de l'autoradiographie correspondante permet de connaître la séquence du brin analysé.

### 1. Étapes principales

- **Marquage de l'ADN :** Un fragment d'ADN double brin est marqué radioactivement à une extrémité (généralement avec du 3P ou 3H) pour permettre sa détection après électrophorèse.
- **Dénaturation :** Le brin marqué est séparé de son complément pour travailler uniquement sur un brin simple.
- **Traitement chimique spécifique :** L'ADN est exposé à différents agents chimiques qui réagissent spécifiquement avec certaines bases :
  - **Diméthylsulfate (DMS) :** Modifie les guanines (G).
  - **Acide formique :** Modifie les purines (A et G).
  - **Hydrazine :** Modifie les pyrimidines (C et T).
  - **Hydrazine avec NaCl :** Modifie les cytosines (C) uniquement.
- **Clivage chimique :** Après modification chimique, une enzyme (comme la pipéridine) clive l'ADN au niveau des bases modifiées, générant des fragments d'ADN de tailles spécifiques.
- **Électrophorèse sur gel :** Les fragments générés sont séparés par taille sur un gel d'acrylamide. Le gel est analysé par autoradiographie, révélant des bandes correspondant à chaque base.
- **Lecture de la séquence :** La position des bandes sur le gel est interprétée pour reconstituer la séquence d'ADN.

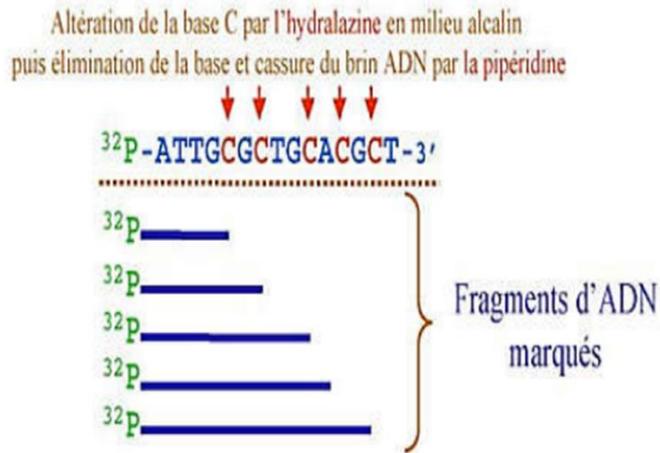


Fig.2 Le principe du séquençage de Maxam et de Gilbert

### III- Méthode de Sanger :

C'est actuellement la technique enzymatique la plus utilisée pour effectuer le séquençage de l'ADN.

#### 1. Principe

Synthèse d'un brin radioactif et complémentaire au brin dont on veut déterminer la séquence.

#### 2. Originalité

- Utilisation de **ddNTP** (possède un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3').

L'Évolution de la Technique de Sanger est affectée par Deux changements :

- **Didésoxynucléotides marqués avec des fluorophores**
- **Automatisation**

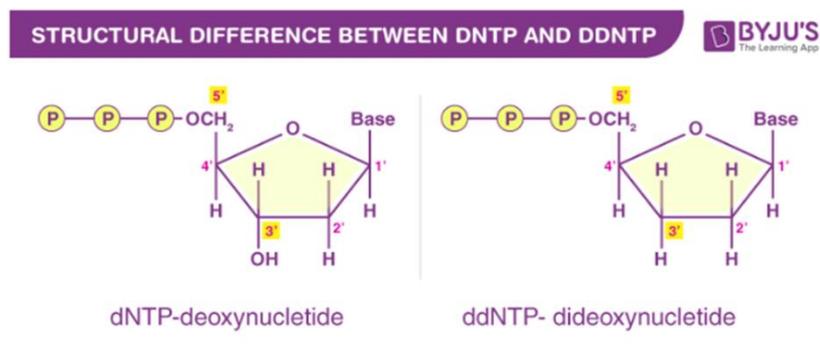


Fig.3 Schéma de la structure du dNTP et ddNTP

### 3. Les étapes

- PCR (amplification) pour obtenir des copies de l'ADN à séquencer.
- Incorporation des ddNTPs dans des fragments d'ADN.
- Les fragments produits sont séparés par électrophorèse capillaire.
- Un détecteur lit les signaux fluorescents pour déterminer l'ordre des bases.

### 4. Séparation sur gel de polyacrylamide et autoradiographie

- Sur les 4 pistes d'un gel, le contenu de chacun des 4 tubes est déposé.
- Les fragments nucléiques sont séparés par électrophorèse selon leur longueur.
- Le gel de polyacrylamide a la capacité de **différencier les brins** qui ne se différencient que par un **seul nucléotide**.
- A la fin de l'électrophorèse : autoradiographie.

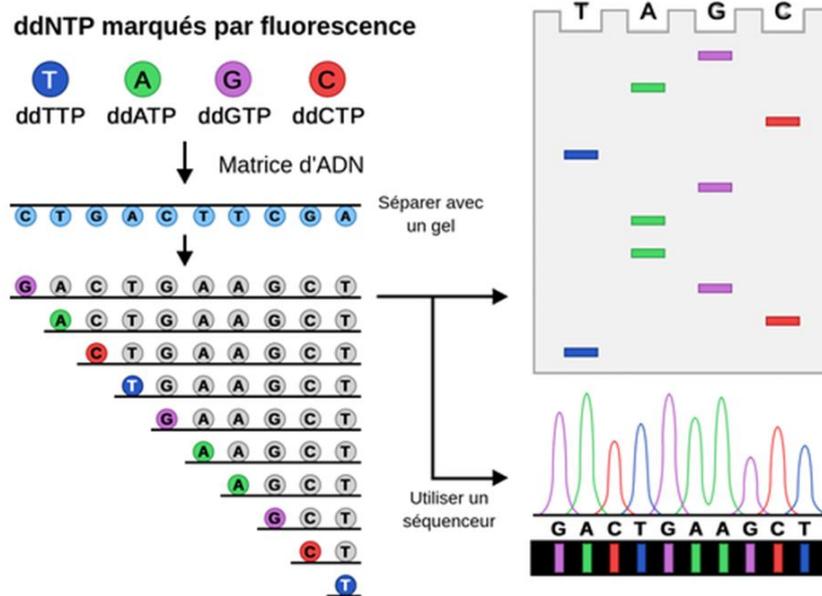
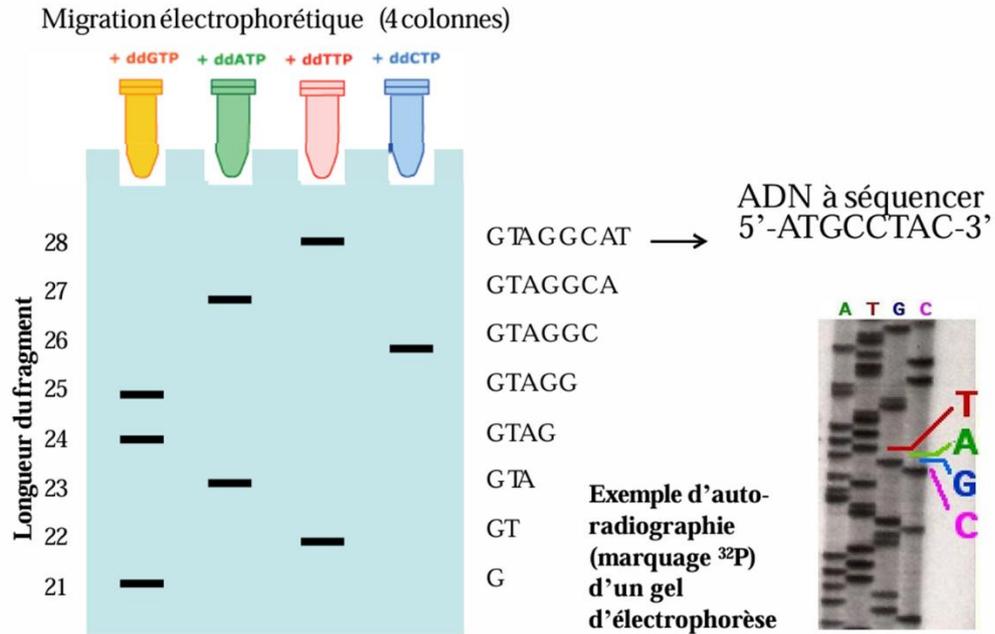


Fig.4 Schéma de la méthode de Sanger (terminaison de chaîne) pour le séquençage de l'ADN

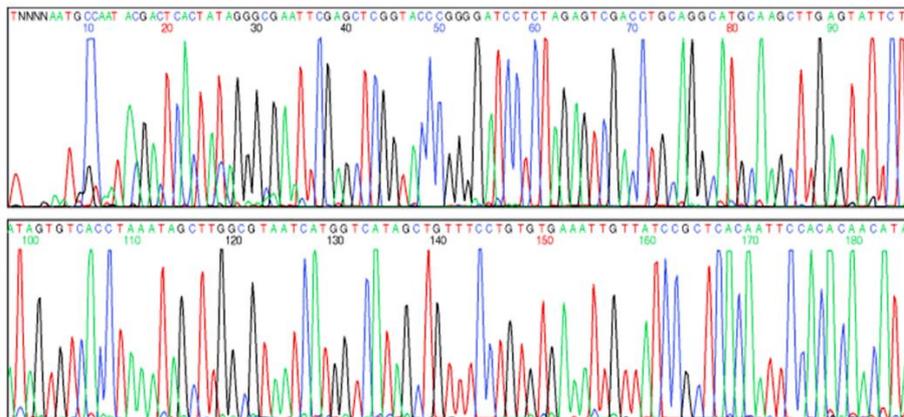
## Exemple :



## IV- Séquenceurs automatiques

- Capables de réaliser les réactions de séquence puis de les lire.
- 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.

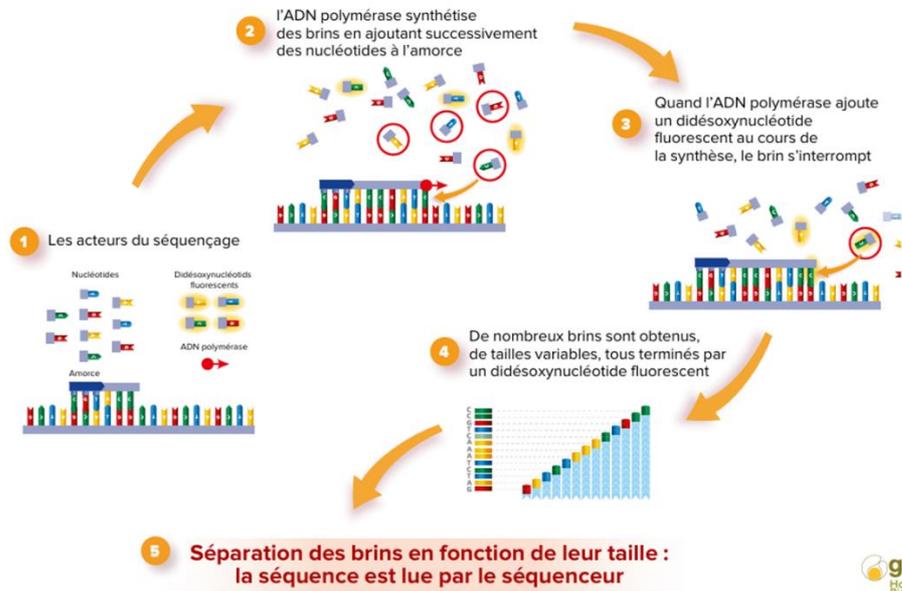
Exemple d'enregistrement obtenu à partir d'un séquenceur automatique



Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité jusqu'à 1000 pour les appareils les plus performants.

# Automatisation du séquençage

Par l'utilisation de la fluorescence

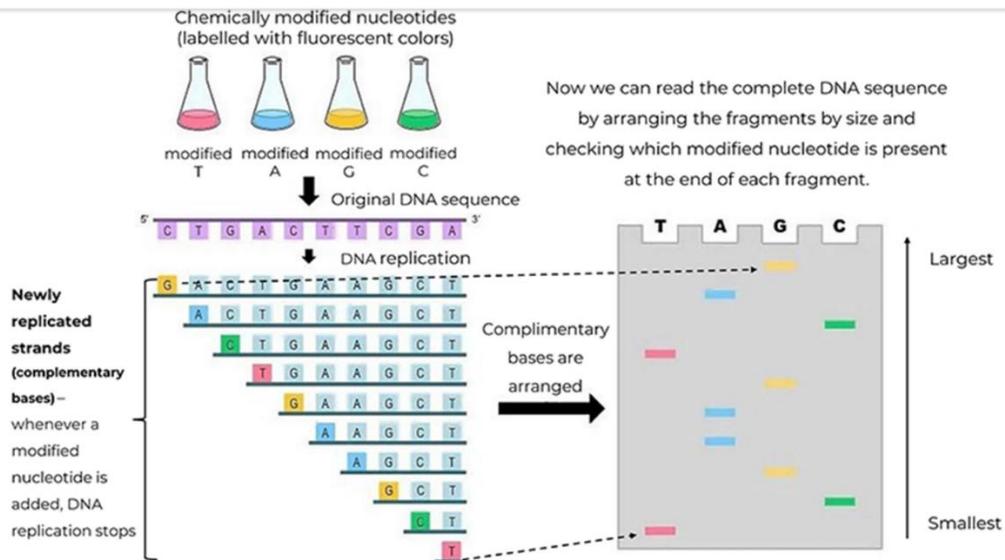


© gnis 2018

26



## Exemple :



## V- Séquençage de Nouvelle Génération (NGS)

Une technologie avancée de séquençage de l'ADN et de l'ARN qui permet de lire simultanément des **millions à des milliards de fragments d'acides nucléiques**. Contrairement au séquençage Sanger, le **NGS est à haut débit, rapide**, et peut traiter **des génomes entiers** ou des **transcriptomes** à un coût réduit.

### 1. Étapes

#### - Préparation de la bibliothèque :

L'ADN ou l'ARN est **fragmenté** mécaniquement ou chimiquement. Des **adaptateurs spécifiques** (séquences courtes d'ADN) sont **ajoutés aux extrémités des fragments**.

La bibliothèque est amplifiée par PCR pour obtenir une quantité suffisante.

#### - Séquençage :

Les fragments de la bibliothèque sont fixés sur une plateforme (par exemple, des puces ou des billes magnétiques).

Des enzymes et des nucléotides marqués sont utilisés pour lire les séquences.

Les plateformes Illumina, Ion Torrent, ou PacBio, utilisent différentes méthodes de détection (fluorescence, pH, etc.).

#### - Analyse des données :

Les millions de petites séquences obtenues (**reads**) sont alignées sur une séquence de référence.

Des outils bio-informatiques permettent d'identifier des mutations, SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), insertions, délétions ou expressions géniques.

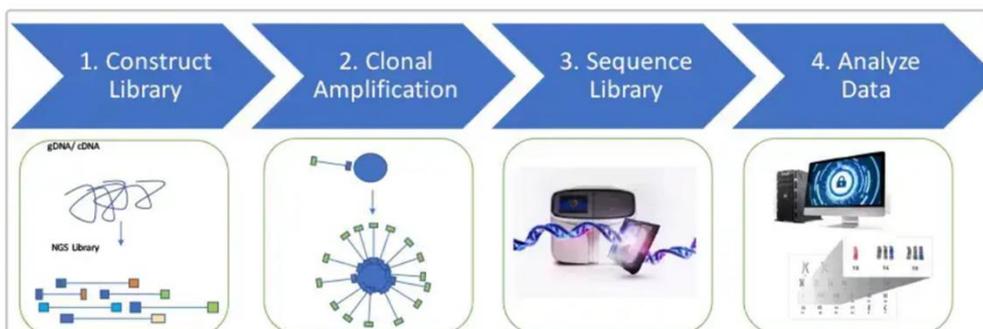


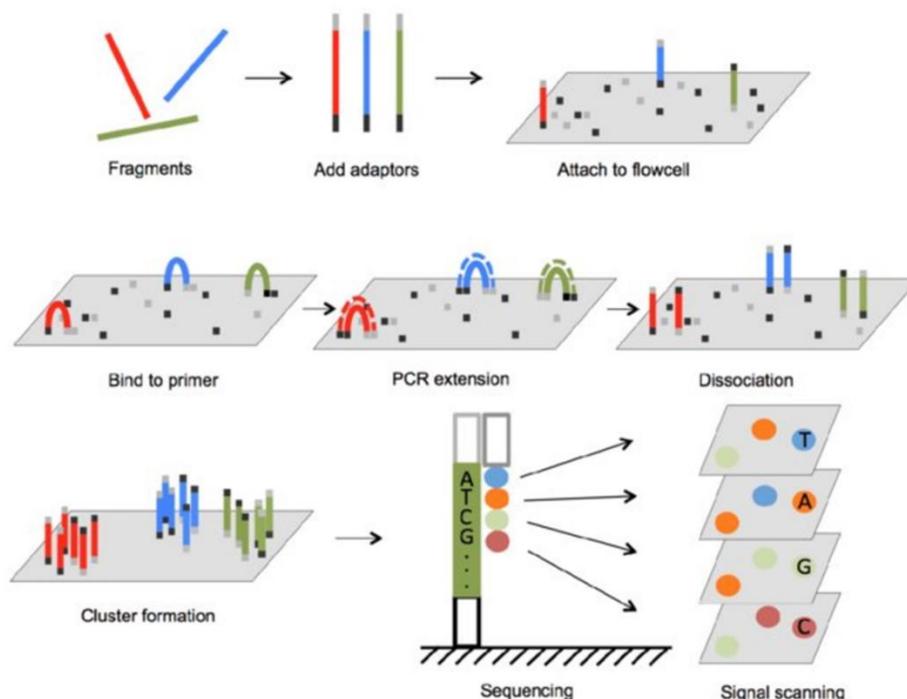
Fig: Next-Generation Sequencing workflow | Image Source: <https://www.thermofisher.com/in/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/what-is-next-generation-sequencing.html>

## 2. Applications du NGS

- **Recherche fondamentale** : Analyse des génomes entiers (WGS) ou des transcriptomes (RNA-seq).
- **Médecine personnalisée** : Identification de mutations causant des maladies et adaptation des traitements.
- **Microbiologie** : Identification d'agents pathogènes ou étude du microbiote.
- **Écologie** : Étude de la biodiversité via des analyses métagénomiques.

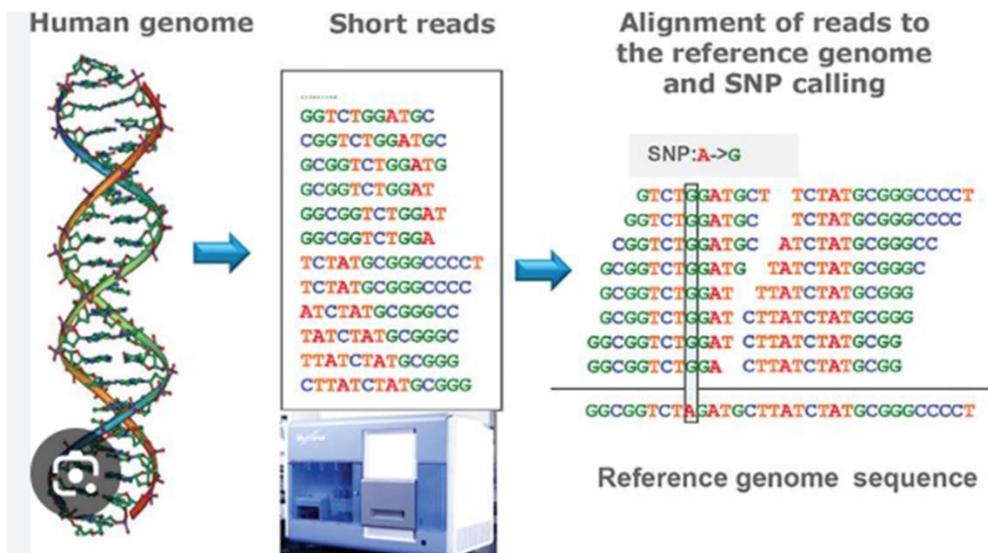
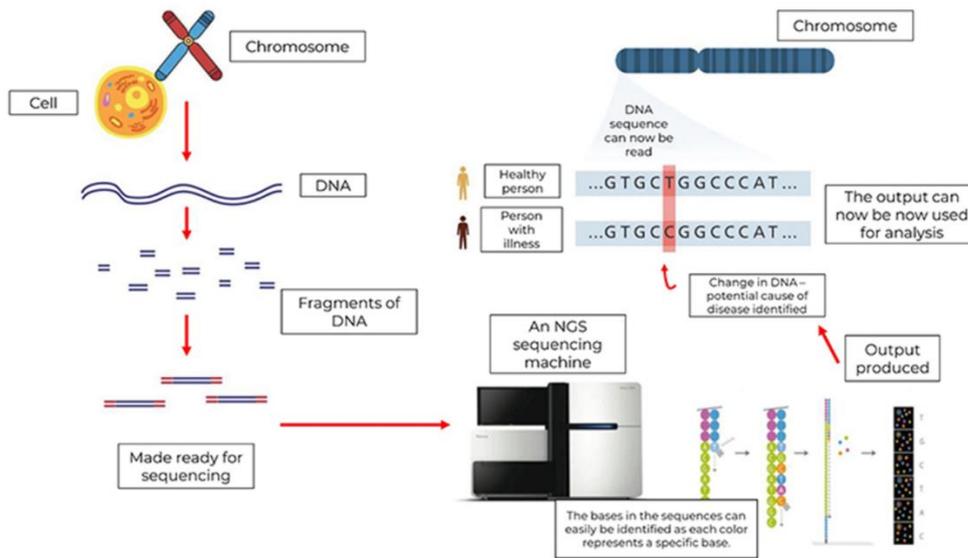
## 3. Technologies NGS populaires

- **Illumina (séquençage par synthèse)** : Dominant pour sa précision et son débit élevé.
- **Ion Torrent (détection des variations de pH)** : Plus rapide mais moins précis que l'Illumina.
- **PacBio (SMRT) et Oxford Nanopore** : Permettent des lectures longues, idéales pour les régions complexes comme les répétitions.



**Fig.5 Principle of the illumina sequencing by synthesis (SBS) technology  
(Lu *et al.*, 2016)**

## Exemple :



<https://info.abmgood.com/next-generation-sequencing-ngs-introduction>

## VI-Séquençage d'ARN (RNA-seq)

- Utilisé pour analyser l'expression des gènes en séquençant l'ARN transcrit.
- Permet de détecter les niveaux d'expression et les ARN spécifiques (ARNm, ARNt, ....etc.).
- Permet d'étudier de manière globale l'ensemble des transcrits d'une cellule ou d'un tissu à un moment donné, appelé le **transcriptome**.

### 1. Etapes

- Extraction d'ARN à partir d'un échantillon.
- Sélection des ARNm (via poly(A)) ou élimination des rRNA.
- Conversion en ADNc et préparation de la bibliothèque.
- Séquençage des fragments d'ADNc.
- Analyse bioinformatique (alignement, quantification, visualisation des résultats).

## VII-Séquençage à haut débit du génome entier

### (WGS : Whole-Genome Sequencing)

- Technique qui permet de lire **l'ensemble du matériel génétique** d'un organisme, incluant les **régions codantes** (exons) et **non codantes** (introns, régions intergéniques, etc.).
- Utile pour l'étude des mutations, la médecine personnalisée, et les recherches évolutives.

## **Références :**

- Cours de Génie génétique: Dr Ghembaza Boublenza. L, Université de Tlemcen, Faculté SNV , Algérie.
- TD Techniques de séparation et d'analyse des acides nucléiques: ADN, ARN & PLASMIDES : Dr Leila Medraoui, Université de Rabat, Faculté des Sciences, Maroc.
- SUPPORT DE COURS de GENIE GENETIQUE: Dr. KHOUAJA Fattouma, Université DE LA MANOUBA, INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE SIDI THABET (ISBST),Tunisie.
- Polycopié de la matière de génie génétique incluant Les cours, les travaux dirigés et les travaux pratiques: Dr Fathi Berrabah, Université de Djelfa, Faculté SNV, Algérie .
- [www.medatice-grenoble.fr](http://www.medatice-grenoble.fr) chapitre 8 méthodes d'études en biologie moléculaire.
- LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE: Pr Belarbi-Amar N, Université Oran1 Ahmed Benbella, Faculté de Médecine, Département de médecine, Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Cytologie et Génétique cliniques, Algérie .
- Biologie Moléculaire et Génie Génétique: Dr. Nehal Fatima, Université de Chlef, FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologies, Algérie.
- Shendure, J., Balasubramanian, S., et al. (2017). "DNA sequencing at 40: past, present, and future." *Nature*, 550(7676), 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>
- Mardis, E. R. (2008). "Next-generation DNA sequencing methods." *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>

- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). "The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA." *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Conesa, A., et al. (2016). "A survey of best practices for RNA-seq data analysis." *Genome Biology*, 17(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
- Stark, R., et al. (2019). "RNA sequencing: the teenage years." *Nature Reviews Genetics*, 20(11), 631–656. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>