

## Séquençage de l'ADN : les dernières (r)évolutions ! [partie 1/2]

Publié le vendredi 2 mars 2012

Voir en ligne : <https://www.france-science.org/Sequencage-de-l-ADN-les-dernieres.html>

Si la notion d'ADN a fait son apparition vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, il aura fallu attendre l'année 1953 pour que sa structure en double hélice soit découverte et 2001 pour qu'une première version (incomplète) du génome humain soit publiée. Depuis, les méthodes de séquençage ne cessent d'évoluer et les dernières techniques mises au point constituent un réel bouleversement ; certains parlent même de révolution. Dans cette première partie nous revenons sur les différents dispositifs disponibles aujourd'hui pour séquencer l'ADN et sur les technologies de demain. Bientôt le génome humain pourrait être séquencé en quelques heures et plus incroyable encore à l'aide d'un dispositif de la taille d'une clé USB !

### L'ADN et sa séquence

L'acide désoxyribonucléique ou ADN est une molécule, présente dans toutes les cellules vivantes, qui contient l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. Il est le support de l'information génétique et de l'hérédité car il est transmis lors de la reproduction. La molécule d'ADN est composée d'éléments de bases appelés nucléotides. Il existe quatre types différents de nucléotides : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). Cette molécule est constituée de deux brins complémentaires, un A se trouvant toujours face à un T et un G face à un C. La réplication de l'ADN, notamment lorsqu'une cellule se divise, implique un brin d'ADN à copier et une protéine spécifique appelée ADN polymérase. Cette protéine 'lit' le brin modèle et met un A en face d'un T, etc. Le séquençage de l'ADN, consiste à déterminer l'ordre de la succession linéaire des bases A, C, G et T d'un fragment d'ADN donné.

### La méthode Sanger

Frederick Sanger, deux fois lauréat du prix Nobel de chimie (1958 et 1980), a mis au point la première méthode de séquençage de l'ADN : la méthode Sanger. Malgré les évolutions actuelles des techniques de séquençage, que nous développerons dans la suite de cet article, la méthode de Sanger reste la méthode la plus employée dans le monde.

Cette méthode est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire. Son principe est le suivant. Une molécule d'ADN, extraite d'un échantillon est clonée et de nombreuses molécules d'ADN simple brin sont produites. Un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer est ajouté et sert de point de départ à la synthèse du brin d'ADN complémentaire. A partir de là, l'ajout d'ADN polymérase et des nucléotides A, T, G et C (les dNTP) permet de générer le brin complémentaire. Cependant la méthode de Sanger comprend également à ce stade l'ajout en faible concentration de quatre nucléotides analogues appelés didésoxynucléotides (les ddNTP) qui ressemblent aux nucléotides normaux mais leur incorporation a pour conséquence l'arrêt de la polymérisation. Il en résulte la formation de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés par électrophorèse [1].

Cette méthode très utilisée comporte cependant plusieurs limites. La première et la plus importante est le faible rendement. Les étapes de préparation de l'échantillon d'ADN, de fractionnement en morceaux de taille lisible, et d'amplification sont lentes et coûteuses. Il faut ajouter à cela la limite de taille des séquences lisibles (inférieure à 1000 nucléotides), le traitement informatique des données et les vérifications nécessaires [2].

Quelque temps après la publication du premier génome humain, de nouvelles machines de séquençage ont fait leur apparition, marquant la première révolution du domaine. L'ensemble de ces technologies ou plateformes de séquençage est regroupé sous le terme "nouvelle génération de séquençage à haut-débit" (en anglais "next generation sequencing"). Nous dissocierez ici les séquenceurs de deuxième génération de ceux dits de troisième génération qui permettent le décryptage direct d'une seule molécule d'ADN.

### Plateformes de deuxième génération, toujours plus rapides

Deux sociétés, Solexa (depuis rachetée par Illumina) et 454 Life Science (Roche), ont proposé les premières plateformes utilisant un séquençage massif parallèle et permettant ainsi de réduire les coûts et d'augmenter la rapidité des analyses. Si elles nécessitent toutes les deux une molécule d'ADN simple brin préalablement préparée (ce qui demande toujours du temps), elles s'appuient par la suite sur des approches différentes [3].

La compagnie 454 Life Science, basée à Branford (Connecticut), a mis au point la plateforme 454, qui s'appuie sur la technique de pyroséquençage. Le pyroséquençage est une technique de séquençage par synthèse qui repose sur la détection de la libération de pyrophosphate lors de l'incorporation de nucléotides. Un seul type de nucléotides (A, T, G ou C) est incorporé dans le milieu à la fois. S'il s'agit du nucléotide attendu pour continuer la synthèse du brin complémentaire, il est incorporé et par une réaction enzymatique émet un signal lumineux interprété par le séquenceur.

### **Pyroséquençage explications**

Crédits : isradelacon

La société Solexa (San Diego, California), a développé une plateforme qui opte pour une stratégie plus proche de la méthode de Sanger. La molécule d'ADN à séquencer est mise en présence des quatre types de nucléotides, chacun associés à un fluorophore différent. Le nucléotide nécessaire à l'élongation du brin complémentaire est alors inséré mais une modification de sa structure empêche l'élongation de se poursuivre. Un signal lumineux spécifique du nucléotide présent est alors émis.

### **Illumina sequencing explications**

Crédits : Phlya1

### **Une clé USB pour lire l'ADN !**

Parmi les dernières innovations, Ion Torrent propose une plateforme (le PGM) qui s'appuie sur les variations de pH que provoque la libération d'un proton lors de l'incorporation d'un nucléotide au moment de la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire. En effet le pH d'une solution varie selon sa concentration en protons, l'ajout d'un nucléotide a donc pour effet de modifier le pH de la solution. Lorsqu'un nucléotide précis se trouve dans le milieu de réaction, le séquenceur peut ainsi détecter si un ou plusieurs protons ont été libéré et déterminer la séquence de l'ADN.

Si cette nouvelle technologie, encore perfectible, est intéressante, elle est menacée par une révolution bien plus impressionnante. En effet, la société Oxford Nanopore Technology (ONT) a présenté à la conférence "Advances in Genome Biology and Technology", qui a eu lieu du 15 au 18 février 2012 à Marco Island (Floride), deux nouveaux dispositifs de séquençage : le Minlon et le Gridlon [4].

Ces deux dispositifs, qui devraient arriver sur le marché d'ici la fin de cette année, sont les premiers séquenceurs dont la technologie s'appuie sur des nanopores (un pore d'un diamètre compris entre 1 et 100 nm). Lorsqu'un nanopore, imbriqué dans une membrane hybride polymères-lipides, est en contact avec une molécule d'ADN, il émet un signal électrique spécifique selon le type de nucléotides qui le traverse, permettant ainsi une lecture de l'ADN. Le Dr. Mardis de l'Université de Washington a confirmé que cette technique comporte deux avantages : la préparation des échantillons est très simple et rapide et il sera possible de lire des dizaines de milliers de bases en une seule fois. L'un des inconvénients majeurs est le taux d'erreur (4%) qui reste pour l'instant trop élevé pour la plupart des applications envisagées dont le diagnostic médical.

Le Minlon, grosse clé USB jetable capable de lire directement l'ADN (jusqu'à 1Gb de données) à partir d'un échantillon de sang, a été testé sur des génomes simples (virus, bactéries) et a démontré son efficacité en décodant leur ADN en quelques secondes. Il devrait bientôt être vendu à un prix de 680 euros environ (900

dollars US). Cependant aucun scientifique extérieur à la société n'a encore pu tester ces technologies et dans ce domaine, on peut s'attendre à une grande différence entre les promesses révolutionnaires de ce dispositif et la réalité de son utilisation [5] [6] [7].

## Conclusion

Comme le démontre cet article, les techniques de séquençage évoluent rapidement ces dernières années et permettront sans doute bientôt de faire séquencer son ADN complet en moins d'une heure chez le médecin. Au-delà des problèmes techniques non résolus du stockage et de la gestion de ces quantités gigantesques, des questions éthiques se posent. En effet ces avancées ouvrent la porte à la médecine spécialisée et au diagnostic très précoce de certaines maladies ; cependant les traitements eux ne progressent pas à la même vitesse. Est-il nécessaire de prévenir une personne qu'elle est susceptible de contracter une maladie grave contre laquelle on ne peut rien faire ? Nous nous intéresserons à ces questions dans notre prochain article.

Code ADIT : 69283

---

## A voir également :

- Manon Lecomte - 09/03/2012 - Séquençage de l'ADN : vers une médecine personnalisée [partie 2/2] - <http://www.france-science.org/Sequençage-de-l-ADN-vers-une.html>
- Nature. Erika Check Hayden. Nanopore genome sequencer makes its debut [En ligne]. Disponible sur : <http://www.nature.com/news/nanopore-genome-sequencer-makes-its-debut-1.10051>
- J. Lamoril et al. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2008) 23, 260-279 - <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923253208001518>
- EL FAHIME Elmostafa et Ennaji Mly Mustapha. Evolution des techniques de séquençage. *Les Technologies de laboratoire* - N°5 Juillet-Août 2007 - [http://revues.imist.ma/?journal=technolab&page=article&op=view&path\[\]=334](http://revues.imist.ma/?journal=technolab&page=article&op=view&path[]=334)
- Pyroséquençage explications : <http://www.youtube.com/watch?v=kYAGFrbGI6E>
- Illumina sequencing explications : <http://www.youtube.com/watch?v=I99aKKHcxC4>

## Rédactrice :

- Manon Lecomte, [deputy-sdv.la@ambascience-usa.org](mailto:deputy-sdv.la@ambascience-usa.org)

Retrouvez toutes les activités du Service Science et Technologie / Los Angeles sur le site du Consulat général de France à Los Angeles : <http://www.consulfrance-losangeles.org/spip.php?rubrique241>.

---

## Notes

[1] Philippe Julien. Séquençage de l'ADN : la révolution est (de nouveau) en marche [En ligne]. Disponible sur : <http://www.biopsci.com/2012/02/22/sequencage-de-ladn-la-revolution-est-de-nouveau-en-marche/>

[2] Philippe Julien. Séquençage de l'ADN : la révolution est (de nouveau) en marche [En ligne]. Disponible sur : <http://www.biopsci.com/2012/02/22/sequencage-de-ladn-la-revolution-est-de-nouveau-en-marche/>

[3] Philippe Julien. Séquençage de l'ADN : la révolution est (de nouveau) en marche [En ligne]. Disponible sur : <http://www.biopsci.com/2012/02/22/sequencage-de-ladn-la-revolution-est-de-nouveau-en-marche/>

[4] Site officiel de la société Oxford Nanopore Technology : <http://www.nanoporetech.com/>

[5] The New-York Times. Andrew Pollack. Company Unveils DNA Sequencing Device Meant to Be Portable, Disposable and Cheap [En ligne]. Disponible sur : <http://www.nytimes.com/2012/02/18/health/oxford-nanopore-unveils-tiny-dna-sequencing-device.html>

[6] C. Audebert. MinION & GridION : Oxford Nanopore en dit plus à l'AGBT [En ligne]. Disponible sur : <http://www.biorigami.com/?p=2134>

[7] Renaud Blervaque. Séquençage haut-débit nouvelle génération : Principes et caractéristiques [En ligne]. Disponible sur : <http://www.biorigami.com/?p=1133>