



جامعة مولاي إسماعيل  
UNIVERSITÉ MOULAY ISMAÏL



كلية العلوم والتقنيات  
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES



# S6: biologie moléculaire

## Chapitre 10: Séquençages des acides nucléiques Module technique 4

# Sommaire



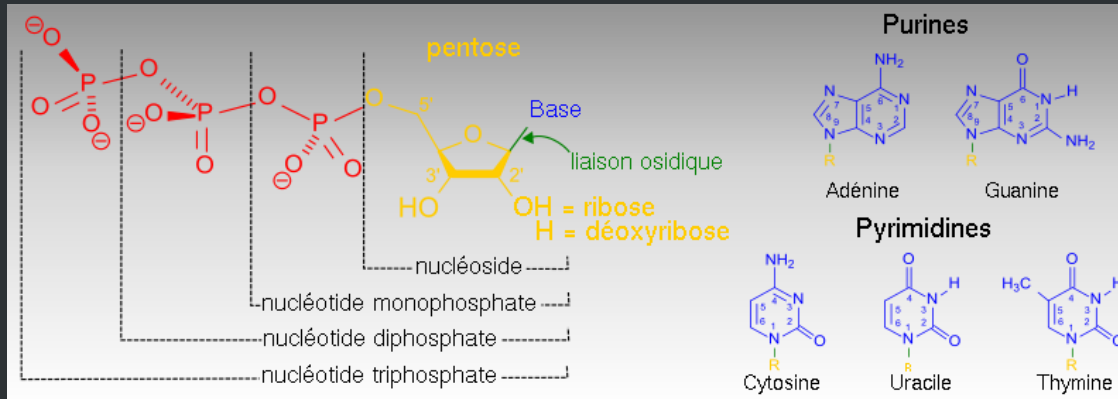
## □ Introduction

- Historique
- Méthode de Sanger
- Introduction au séquençage haut débit :  
Pyroséquençage et séquençage Ion  
Torrent...)

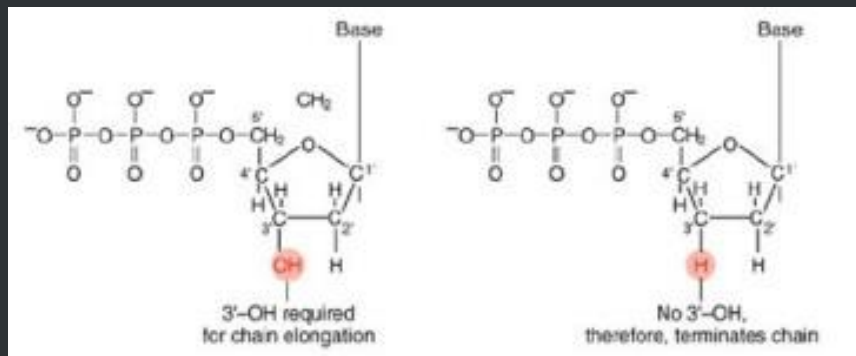
# Méthode de Sanger: base



## Structure nucléotide



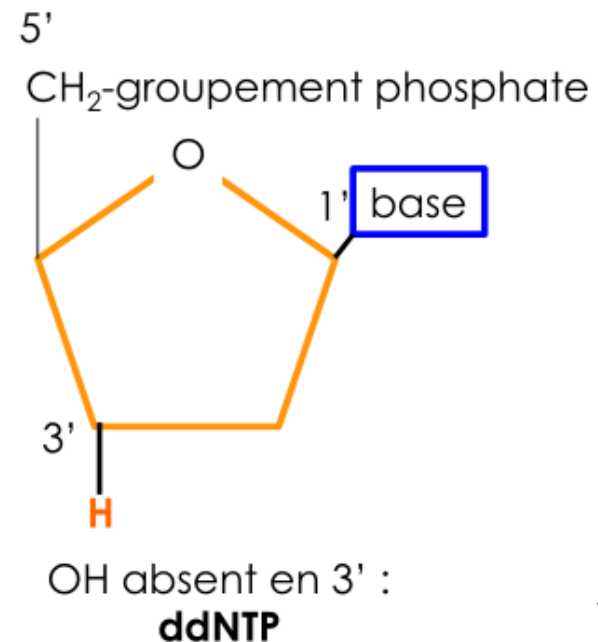
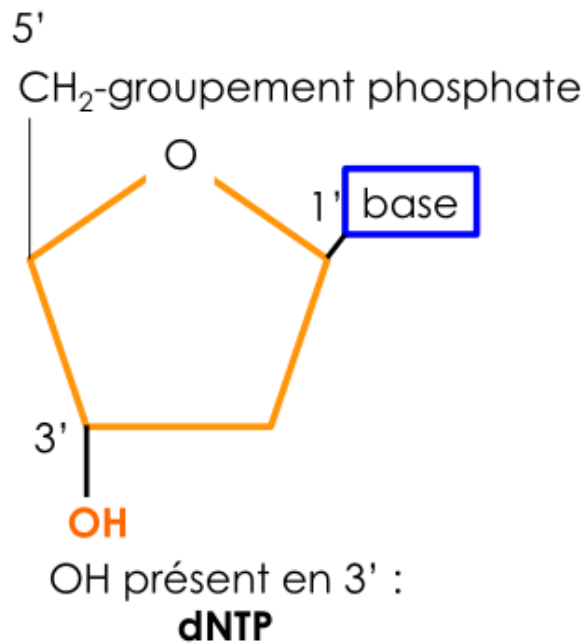
## Structure didéoxynucléotide



# Méthode de Sanger: base



- Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'.
- Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : **la synthèse du brin d'ADN s'arrête.**



# Méthode de Sanger I: chimie

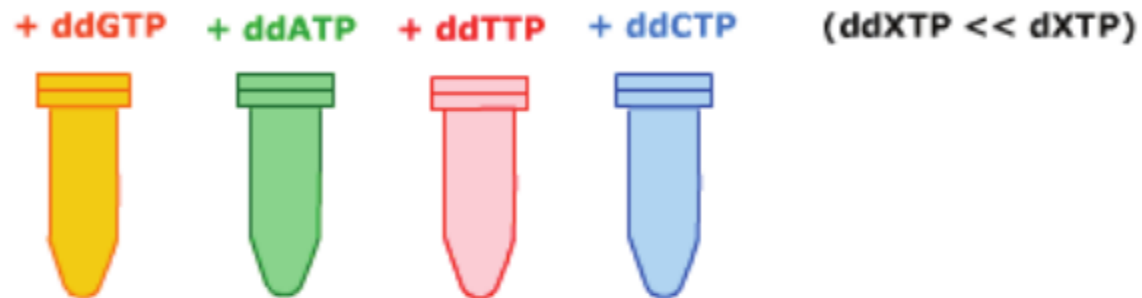
## □ 4 étapes:

1. Dénaturation
2. Hybridation des Primers et extension des bases
3. Terminaison
4. Gel electrophoresis

# Méthode de Sanger I: chimie



- Dans chaque tube, on met de petites quantités d'un ddNTP **fluorescent** ou **radioactif** ( $^{32}\text{P}$ )



[http://www.warpe.snv.jussieu.fr/cours/vt/images\\_10/sangerprinc.gif](http://www.warpe.snv.jussieu.fr/cours/vt/images_10/sangerprinc.gif)

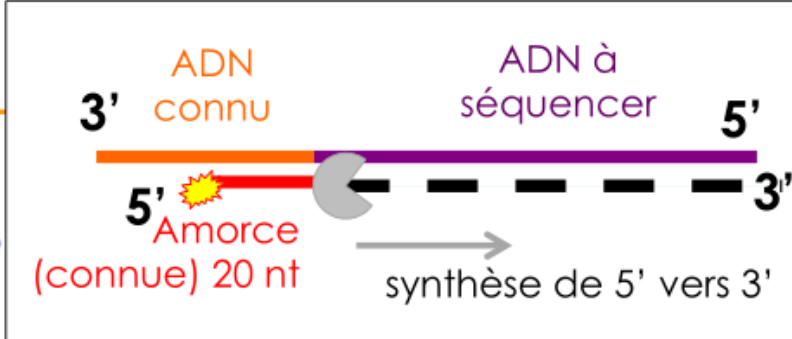
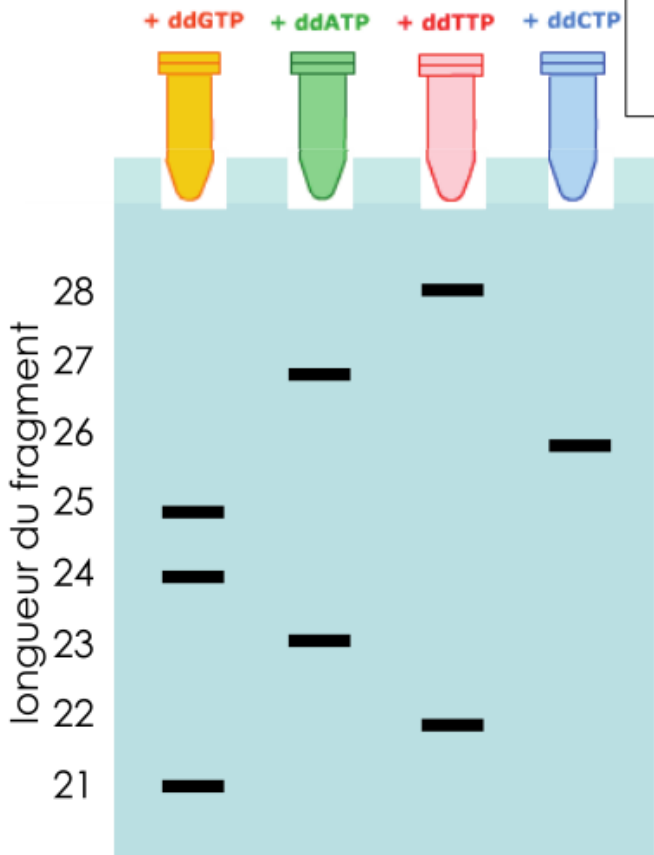
- **L'incorporation aléatoire d'un ddNTP** stoppe la synthèse
- On obtient donc à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de **tailles variées**, selon l'endroit où un ddNTP se sera inséré.

# Méthode de Sanger I: chimie



## Lecture des brins

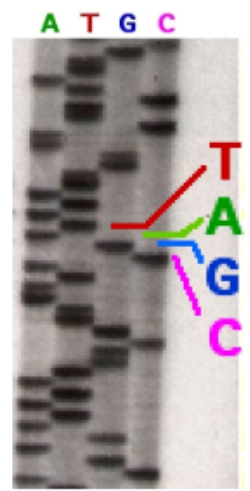
ParisTech  
Migration électrophorétique  
(4 colonnes)



GTAGGCAT → ADN à séquencer  
5'-ATGCCTAC-3'

GTAGGCA  
GTAGGC  
GTAGG  
GTAG  
GTA  
GT  
G

Exemple d'auto-radiographie  
(marquage <sup>32</sup>P)  
d'un gel  
d'électrophorèse



# Méthode de Sanger II: principe



## Principe de la méthode

dATP  
dGTP  
dCTP  
dTTP+ddTTP (1%)



Chaque cycle génère un fragment qui se termine par un T (dye terminator)



# Méthode de Sanger III: résultats



Séquence matrice

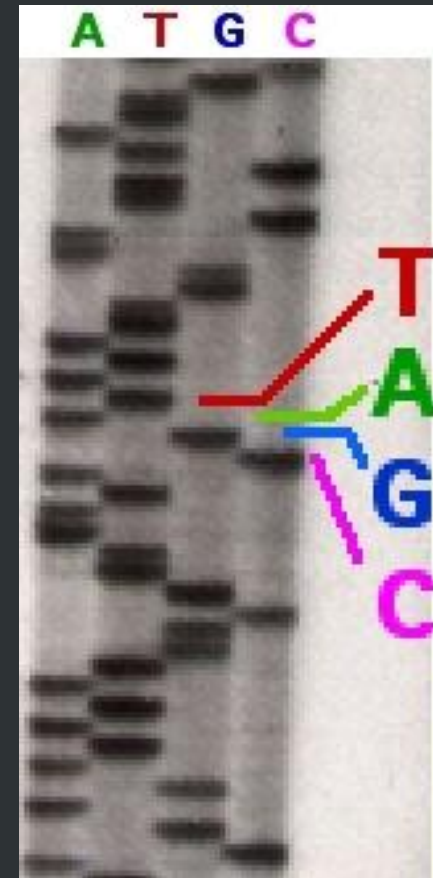


dATP  
dGTP  
dCTP  
dTTP  
**+ddTTP**

dATP  
**+ddATP**  
dGTP  
dCTP  
dTTP

dATP  
dGTP  
**+ddGTP**  
dCTP  
dTTP

dATP  
dGTP  
dCTP  
**+ddCTP**  
dTTP

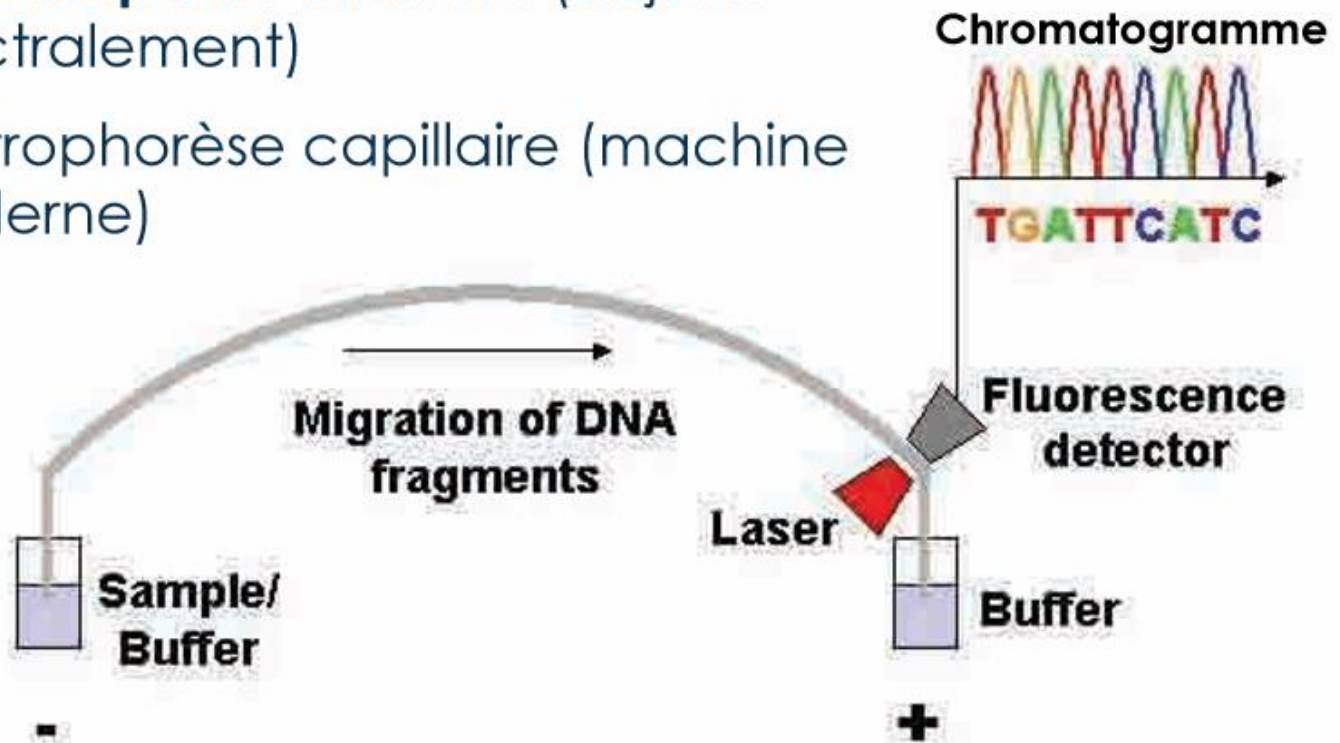


500-600 bases /jour

# Méthode de Sanger IV: principe



- Marquage de chaque ddNTP avec un **fluorophore** différent (disjoint spectralement)
- Electrophorèse capillaire (machine moderne)



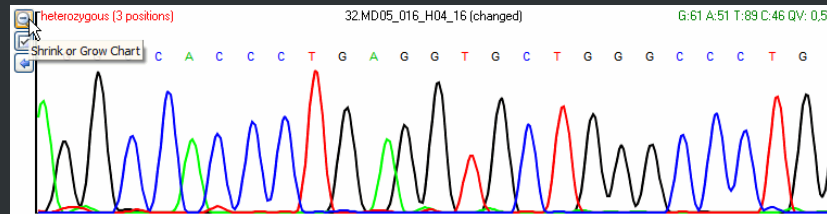
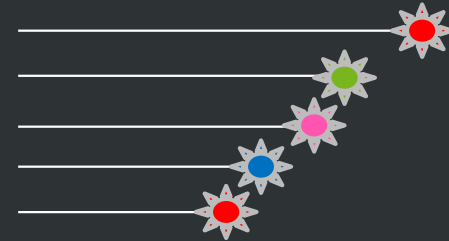
**Avantage:** séquençage en une seule réaction au lieu de 4.

# Méthode de Sanger IV: évolution



Evolution - amélioration

4 fluorochromes différents



capillaires (1-96)

700 bases x 96 / 2,5 heures

1 séquenceur = 700 Kbases/jour



# Sommaire

## □ Introduction

- Historique
- Méthode de Sanger
- Introduction au séquençage haut débit (FLX-Roche, GA-Illumina, PGM-Ion Torrent...)

# 2<sup>nd</sup> Generation: Pyrosequencing



- Sequencing by synthesis
- Advantages:
  - Easily automated
  - Eliminates the need for labeled primers and nucleotides
  - No need for gel electrophoresis

# 2<sup>nd</sup> Generation: Pyrosequencing

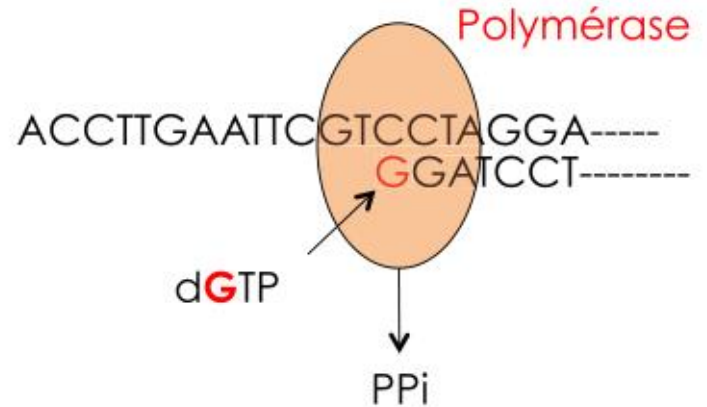
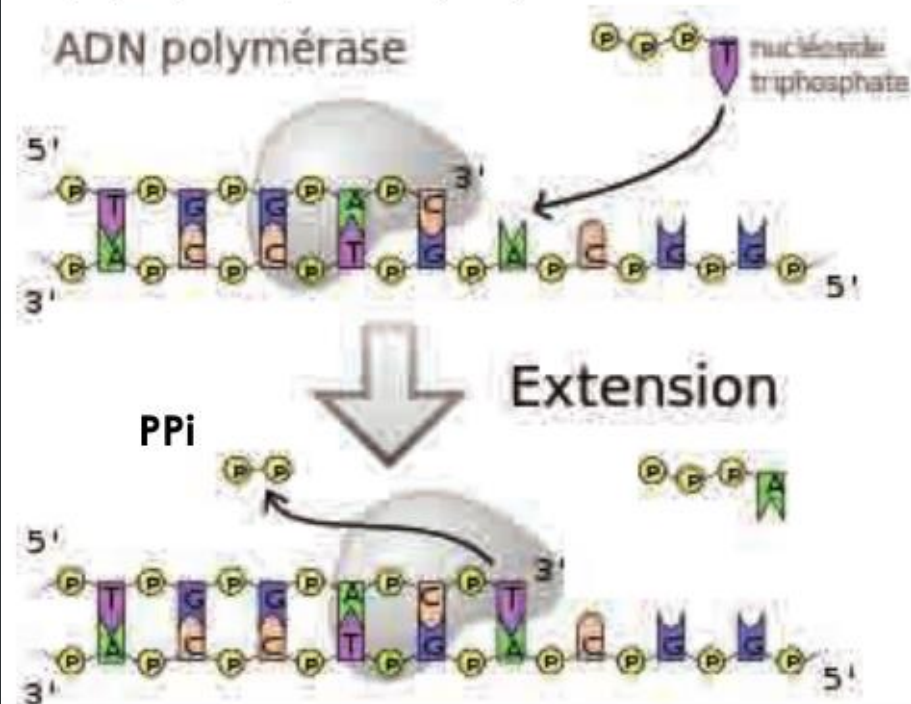


- Basé sur un principe de **séquençage par synthèse**, par opposition au séquençage par « terminaison » (méthode Sanger)
- Séquençage d'un **ADN monobrin** par synthèse du brin complémentaire, base par base, en détectant à chaque étape l'activité de la polymérase par une autre enzyme **chimiluminescente** : la **luciférase**.

# 2<sup>nd</sup> Generation: Pyrosequencing



- Nucléotides (dNTP) ajoutés les uns après les autres (≠ séquençage de Sanger)
- Si c'est le bon nucléotide : incorporation et libération d'un pyrophosphate (PPi)

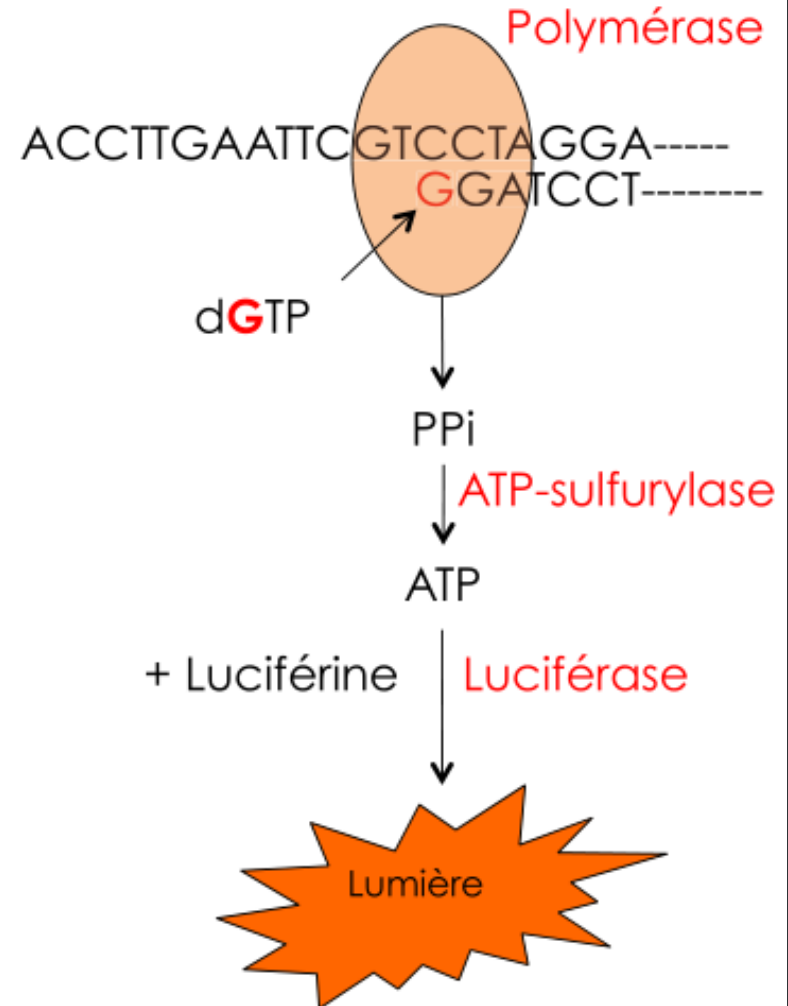




# 2<sup>nd</sup> Generation: Pyrosequencing



- Nucléotides (dNTP) ajoutés les uns après les autres (≠ séquençage de Sanger)
- Si c'est le bon nucléotide : incorporation et libération d'un pyrophosphate (PPi)
- PPi → ATP par action de l'ATP-sulfurylase
- L'ATP apporte l'énergie nécessaire à la réaction de conversion de la luciférine par la luciférase. Cette réaction génère de la lumière visible dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP.

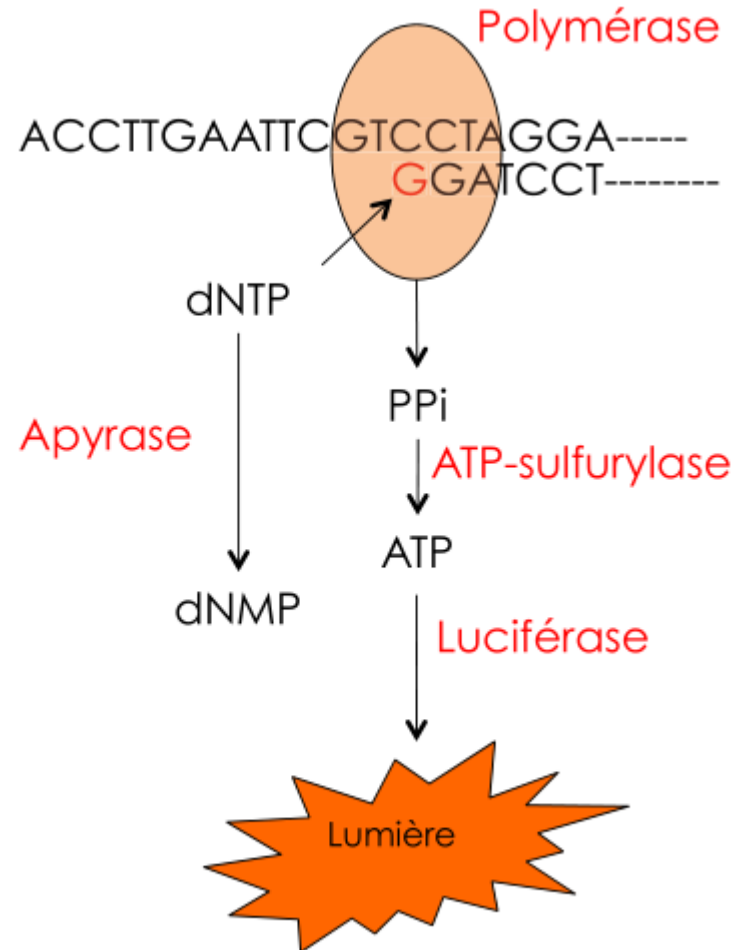




# 2<sup>nd</sup> Generation: Pyrosequencing



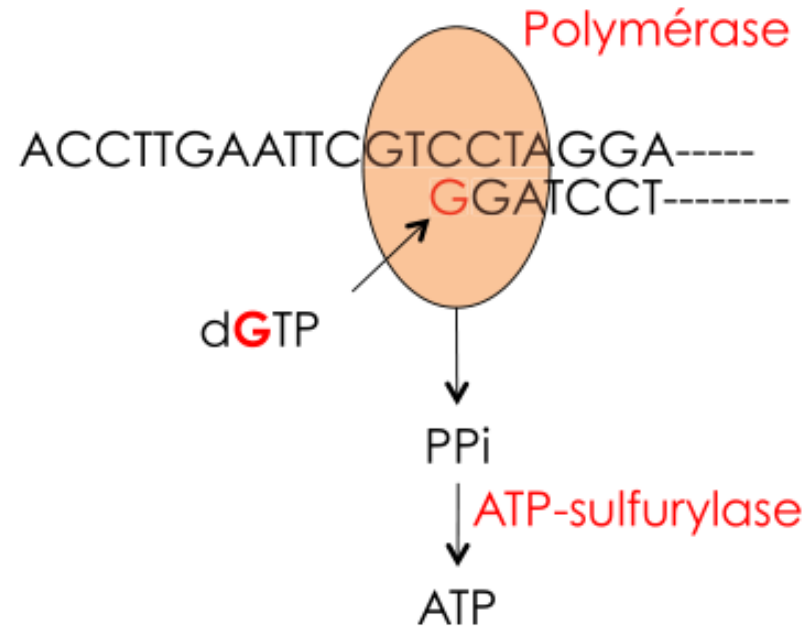
- Nucléotides (dNTP) ajoutés les uns après les autres (≠ séquençage de Sanger)
- Si c'est le bon nucléotide : incorporation et libération d'un pyrophosphate (PPi)
- PPi → ATP par action de l'ATP-sulfurylase
- L'ATP apporte l'énergie nécessaire à la réaction de conversion de la luciférine par la luciférase. Cette réaction génère de la lumière visible dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP.
- Une Apyrase dégrade les nucléotides en surplus



# 2<sup>nd</sup> Generation: Pyrosequencing



- Nucléotides (dNTP) ajoutés les uns après les autres (≠ séquençage de Sanger)
- Si c'est le bon nucléotide : incorporation et libération d'un pyrophosphate (PPi)
- PPi → ATP par action de l'ATP-sulfurylase

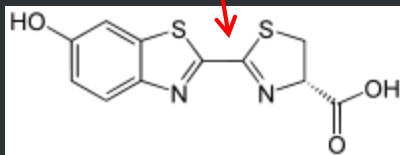
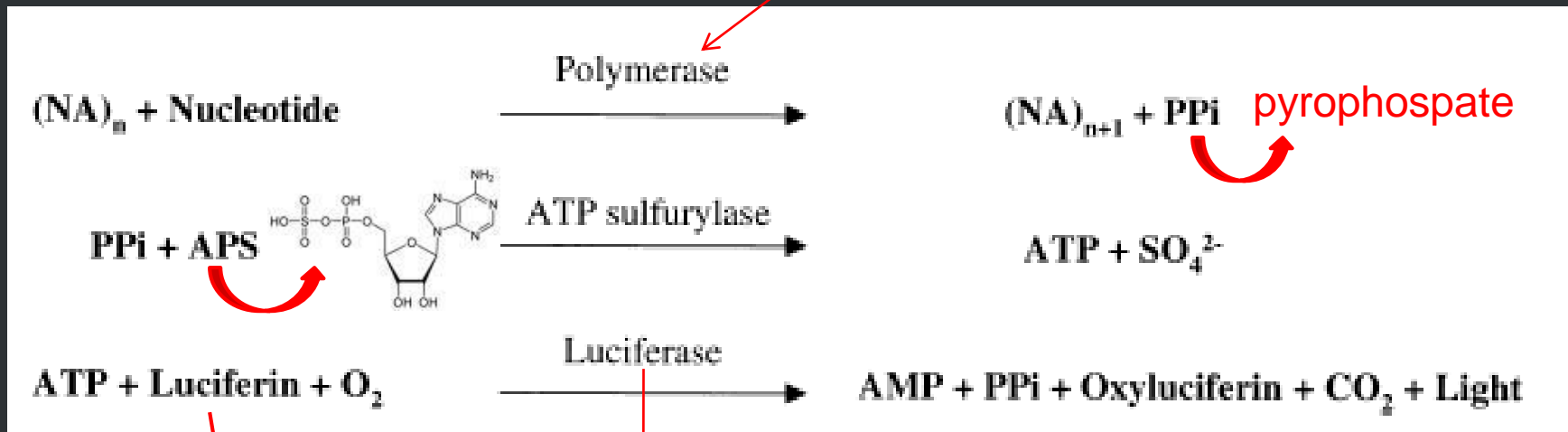


# Pyrosequencing: Résumé

Basic idea:

- Visible light is generated and is proportional to the number of incorporated nucleotides

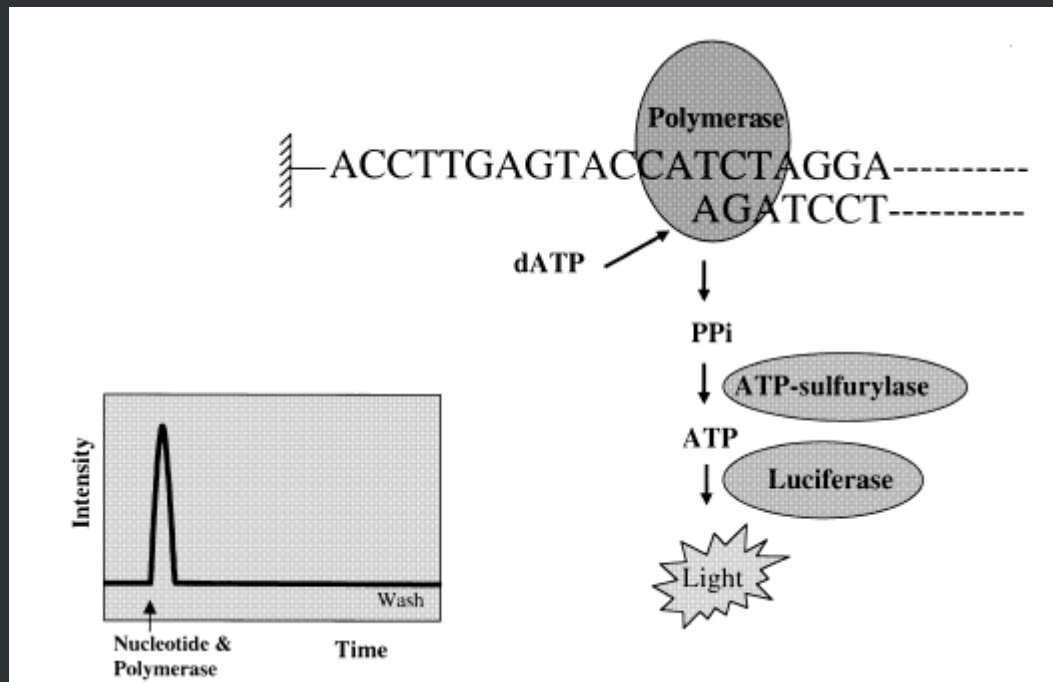
DNA Polymerase I from E.coli.



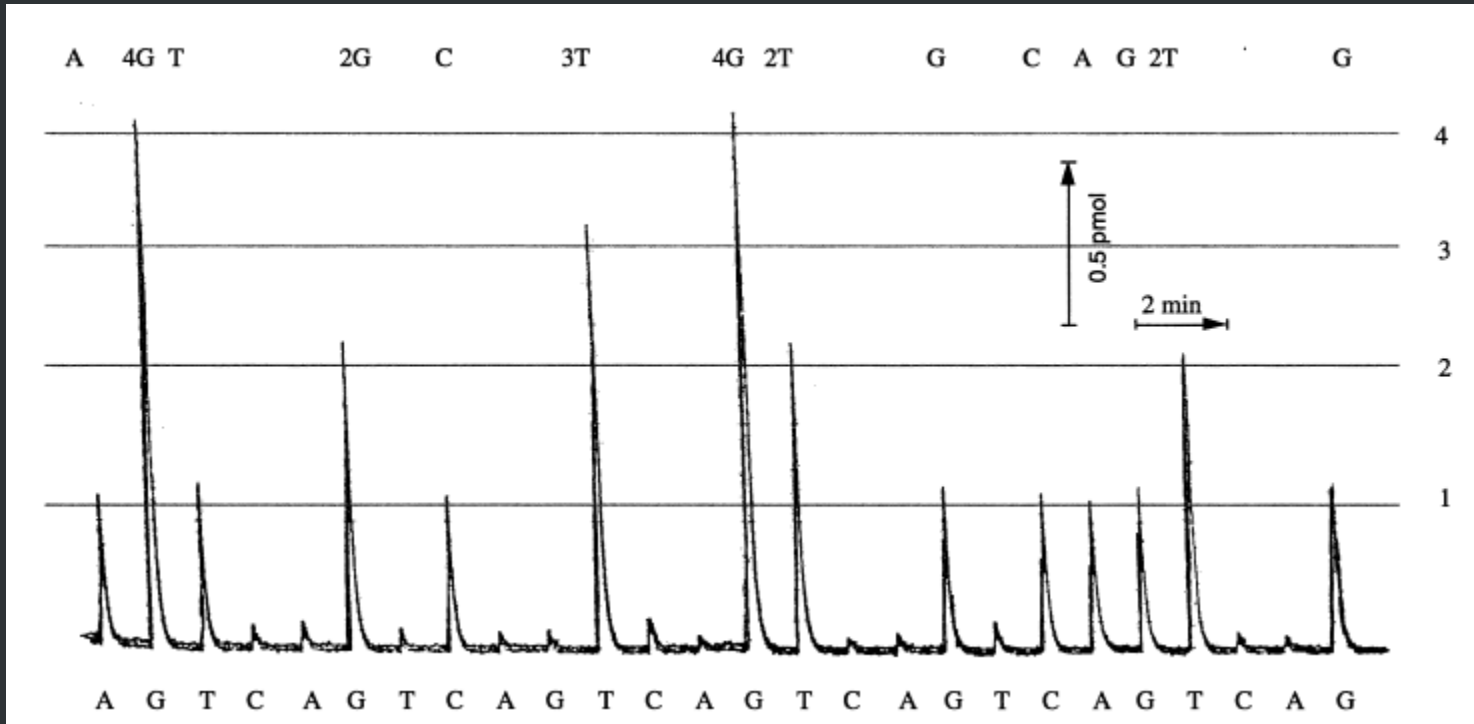
From fireflies, oxidizes luciferin and generates light

# Pyrosequencing: Résumé

- 1<sup>st</sup> Method
  - Solid Phase
    - Immobilized DNA
    - 3 enzymes
    - Wash step to remove nucleotides after each addition



# Pyrosequencing Results:



# Séquençage et analyse



Chaque plateforme possède sa propre méthode de séquençage :

- Pyroséquençage – Roche 454
- Séquençage par mesure ionique – Ion Torrent (Life Tech)
- Récemment, RNAseq: séquençage de l'ARN