

# Séquençage



## Coût\*

\* aucune donnée disponible quant au coût

## Délai

Quelques jours

## Fiabilité

5\*

\*établie selon une échelle relative en fonction des autres techniques

## AVANTAGES

- Diagnostic de micro-organismes inconnus ou de souches virales divergentes

## INCONVÉNIENTS

- Encore peu couramment utilisé

## PRINCIPE

Le séquençage de l'ADN est le processus consistant à déterminer l'ordre précis des nucléotides\* dans une molécule d'ADN. Il comprend tout procédé ou technologie utilisés pour déterminer l'ordre des quatre bases adénine, guanine, cytosine, thymine le long de la molécule d'ADN.

Le séquençage ouvre une nouvelle ère du diagnostic végétal. Il est en effet possible de réaliser un diagnostic en séquençant l'ADN. Le travail est réalisé à partir d'ADN purifié. Cette technologie est d'autant plus intéressante pour des virus inconnus ou encore des souches virales divergentes.

Il existe différentes techniques de séquençage : le séquençage enzymatique : Méthode de Sanger, méthode chimique de Maxam et Gilbert, séquençage haut débit.

CHAMPIGNONS

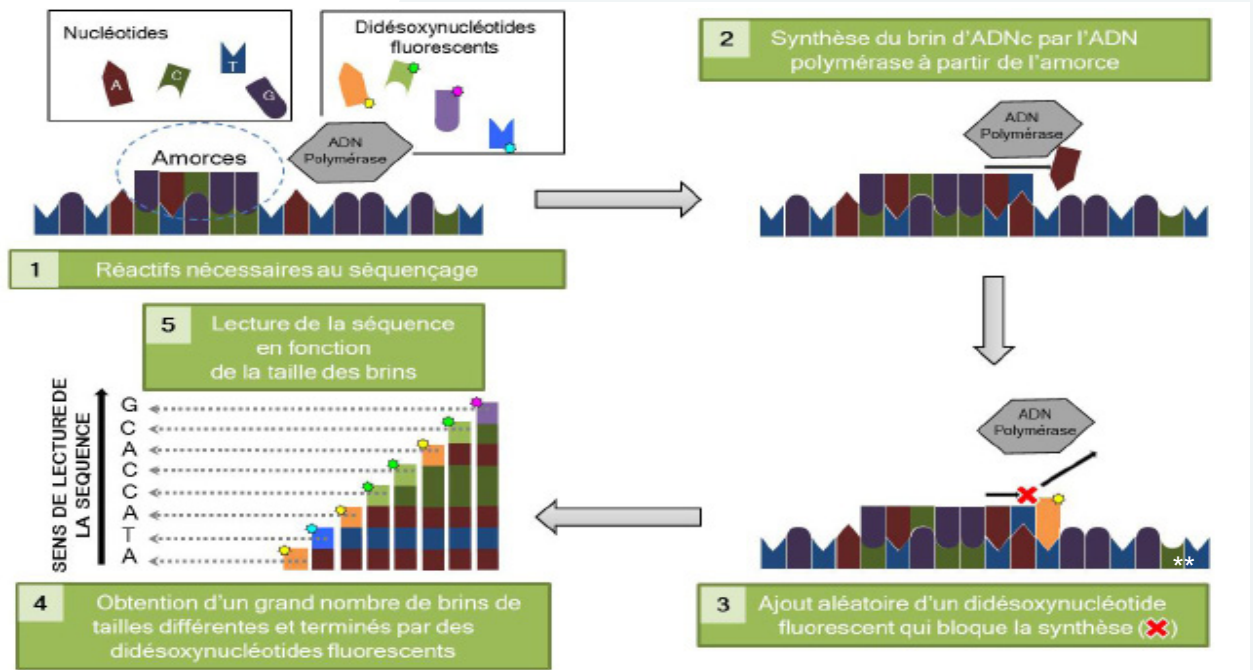
BACTÉRIES

NEMATODES

ARTHROPODES

VIRUS

## Séquençage historique de Sanger



\* Nucléotides : les quatre bases nucléiques composant la molécule d'ADN sont l'adénine, la guanine, la thymine et la cytosine

\*\* Didésoxynucléotides : bases nucléiques fluorescentes

# Séquençage

## Différentes technologies de séquençage haut débit

Ces technologies sont assez proches et reposent sur plusieurs étapes communes.

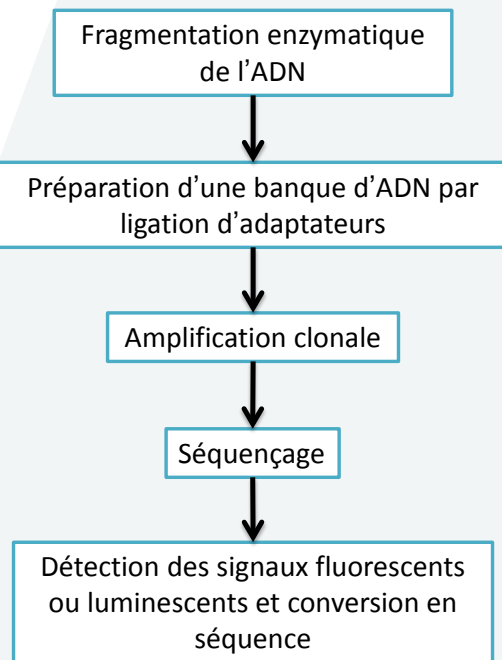
Préparation des banques :

Il s'agit d'une ligation d'adaptateurs spécifiques à chaque technologie pour permettre une amplification par PCR.

Amplification clonale :

Elle peut être réalisée soit par une émulsion huile/eau suivie de la création de microréacteurs et d'une ePCR (émulsion PCR) ou par une amplification sur phase solide suivie d'une bridge PCR.

Chaque technologie possède sa propre méthode de séquençage.



## Pyroséquençage

Après fragmentation, l'ADN subit une amplification par ePCR (PCR en émulsion). Cette technique permet de réaliser dans un seul tube plusieurs millions de réactions indépendantes. Le mélange est ensuite déposé sur une plaque. Chaque emplacement contient une seule molécule d'ADN amplifiée. Le séquençage est initié base par base. Il y a ensuite révélation à l'aide d'une réaction chemoluminescente.

## Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles

La réaction de séquençage a lieu sur un support solide. Un mélange contenant toutes les bases associées chacune à un fluorophore différent est incorporé. L'extrémité des bases est protégée pour bloquer la PCR de manière réversible. Après identification de la première base, il y a clivage des fluorophores et les étapes d'incorporation, de détection et d'identification sont répétées.

## Séquençage par ligation

La première étape d'amplification de cette méthode est identique à celle du pyroséquençage mais la stratégie de séquençage est très différente.

La réaction de séquençage repose sur un système complexe de cycles de ligation séquentielle d'oligonucléotides et de clivage. Après détermination d'une paire de bases, identifiable par un fluorophore, l'oligonucléotide ligué est enlevé et ce processus est répété plusieurs fois.

	Sanger	Pyroséquençage	Terminateurs réversibles	Ligation
Longueur des lectures (pb)	700 - 800	400	2x150	2x75
Nombre de lectures	96	1 million	3 milliards	3 milliards
Total par tour (« run »)	0,07 Gb	0,7 Gb	120 à 600 Gb	150 Gb
Durée du séquençage	-	23 heures	11 jours	8 jours
Coût	Haut	Faible	Faible	Haut

Caractéristiques des différentes méthodes de séquençage accessible en routine en France.