



## L'oligonucléotide Sigma Life Science : de sa conception à sa synthèse

par Delphine AYACHE, spécialiste Design et Technique Sigma Life Science - **Email** : [delphine.ayache@sial.com](mailto:delphine.ayache@sial.com) ; **Web** : [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Chaque jour, le site de production SIGMA-ALDRICH d'Evry (91) synthétise des centaines d'oligonucléotides.

L'oligo, c'est le point de départ de la connaissance des gènes. Les chercheurs en génétique humaine, animale, végétale ou microbienne les utilisent régulièrement pour identifier des gènes connus, inconnus, en bon état ou mutés, lesquels sont, dans certains cas, à l'origine de maladies génétiques.

En tant que fabriquant d'oligonucléotides, SIGMA participe à l'élargissement de la connaissance du patrimoine héréditaire de tous les êtres vivants.

### Comment un oligonucléotide est-il conçu ? Pourquoi a-t-il été choisi, lui, parmi les centaines, voire les milliers de bases qui composent un gène ?

Il s'agit là d'une vraie sélection. Chez les êtres vivants, c'est la nature qui se charge de sélectionner le meilleur ; chez les oligonucléotides, c'est le travail du « designer » !

Chez Sigma Life Science, toute une équipe de « designers » spécialisés vous proposent leur service. En fonction de ce que vous, chercheurs, souhaitez étudier, de votre application, les « designers » SIGMA vont sélectionner la meilleure suite de bases représentant l'oligonucléotide nécessaire à la réalisation de cette étude. Cette sélection va se faire suivant plusieurs paramètres.

### → Premier paramètre : minimiser la formation de dimères d'amorces ou de structures secondaires.

L'une des principales fonctions de l'oligonucléotide est de permettre l'amplification du gène étudié. Celui-ci est

présent en nombre restreint dans la cellule ; il est donc nécessaire d'augmenter son nombre de copies.

La Taq DNA Polymérase va effectuer cette amplification, avec pour points d'amorçage deux oligonucléotides fixés aux deux extrémités de la séquence d'intérêt. L'appariement des nucléotides entre eux a certes l'avantage de permettre la fixation de l'oligo sur sa séquence cible, mais il présente également un inconvénient majeur : il peut entraîner la formation de structures secondaires à l'intérieur même du gène ou de l'oligonucléotide (structures en forme de boucles ou « épingles à cheveux »). Il s'agit là d'un paramètre essentiel du « designer » : choisir la suite de base qui formera le moins de structures secondaires possibles et située dans une région du gène la plus accessible.

Le « designer » va également s'assurer que les deux oligonucléotides choisis ne forment pas de « dimères », essentiellement à leur extrémité 3', afin de les garder disponibles pour la réaction d'amplification.

### → Deuxième paramètre : la température de fusion, ou Tm (melting temperature) de l'oligonucléotide.

Quelle que soit la formule utilisée pour calculer la Tm, celle-ci dépend toujours de la composition en bases de l'oligonucléotide. Le « designer » va s'assurer de choisir un oligo présentant une Tm suffisante pour permettre la fixation de ce dernier sur sa cible. Dans la plupart des applications, la température de fusion de l'oligo devra se situer entre 55 et 60°C.

### → Troisième et dernier paramètre, mais de loin le plus important : la spécificité de l'oligonucléotide.

Ce dernier ne doit fixer que le gène étudié. Pour éviter le risque d'amplifications aspécifiques, les « designers » utilisent des logiciels directement connectés aux banques de données NCBI (National Center for Biotechnology Information), permettant ainsi d'éviter les régions qui présentent des homologies croisées avec les autres séquences identifiées du génome de l'organisme étudié.

C'est ainsi que les « designers » SIGMA conçoivent l'oligo : une suite de nucléotides formant peu, voire pas de structures secondaires, capables de se fixer fortement et spécifiquement au gène étudié.

Certains designs sont plus complexes que d'autres à réaliser et peuvent nécessiter plusieurs heures de travail. C'est pourquoi, dans sa volonté de satisfaire au mieux ses clients et dans son esprit « partenaire de la recherche », SIGMA offre gratuitement ce service qui permet un gain de temps considérable à la recherche.

### Après la conception, suit la synthèse de l'oligonucléotide. Comment se déroule-t-elle sur le site SIGMA ALDRICH d'Evry ?

Le service client SIGMA-ALDRICH injecte dans le système de production toutes les informations nécessaires à cette synthèse, issues de la commande du client : nom de l'oligonucléotide, quantité et qualité requises, conditionnement (tube ou plaque) et forme (sèche ou liquide).

Une fois ces informations transmises au système de production, les appareils de synthèse se chargent de les transformer en produit réel : la séquence étant

ordonnée, le synthétiseur amorce la réaction chimique à partir de la première base en 3', puis additionne les bases, les unes après les autres, dans l'ordre de la séquence, de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Chaque base ajoutée est protégée par un groupement Dimethoxytrityl (DMT). Lorsque le cycle de synthèse est terminé, l'oligonucléotide est entièrement dessalé et déprotégé ; puis, en fonction de la demande, purifié sur gel de polyacrylamide ou sur cartouche RPC ou RP-HPLC.

L'équipe de production effectue ensuite un contrôle systématique de tous les oligonucléotides produits : une mesure de la quantité produite par dosage de la densité optique à 260 nm, puis un passage en spectrométrie de masse ou une électrophorèse PAGE permettent de vérifier la taille et la bonne composition de l'oligonucléotide.

Lorsque tous les contrôles sont conformes, l'oligonucléotide, habillé d'une étiquette portant son identité ainsi que toutes ses caractéristiques techniques, est transmis au service Expédition qui se charge du packaging et du transport vers son utilisateur. Dans quelques heures, le chercheur pourra en disposer...

Le service Design de SIGMA-ALDRICH a été mis en place depuis près de 10 ans ; il est allié au site de production d'oligonucléotides d'Evry, qui possède, lui, 20 ans d'expertise. Tous deux mettent ainsi à votre disposition des experts scientifiques qui vous permettent de gagner du temps et vous accompagnent dans vos recherches avec des produits de qualité certifiés ISO 9001.