



Terminale Santé 2025-2026 Génétique

AVANT PROPOS :

Coucouuuu, avant de commencer, je suis Roxane alias Roxygène, tutrice de Génétique au Tutorat Niçois. Ici, c'est une première approche des cours de Génétique que vous aurez en première année de Santé.

La Pr. Bannwarth est allée assez loin dans la description des grands concepts en Génétique, donc ce cours vous donne une très bonne avance sur l'année prochaine ;)

Toutes mes remarques/ajouts seront dans cette couleur et cette police, j'espère sincèrement que le cours vous plaira et vous donnera envie d'en découvrir plus !

Sur ce, je vous laisse et je vous souhaite une excellente lecture <3

SOMMAIRE

I - Introduction à la Génétique Médicale

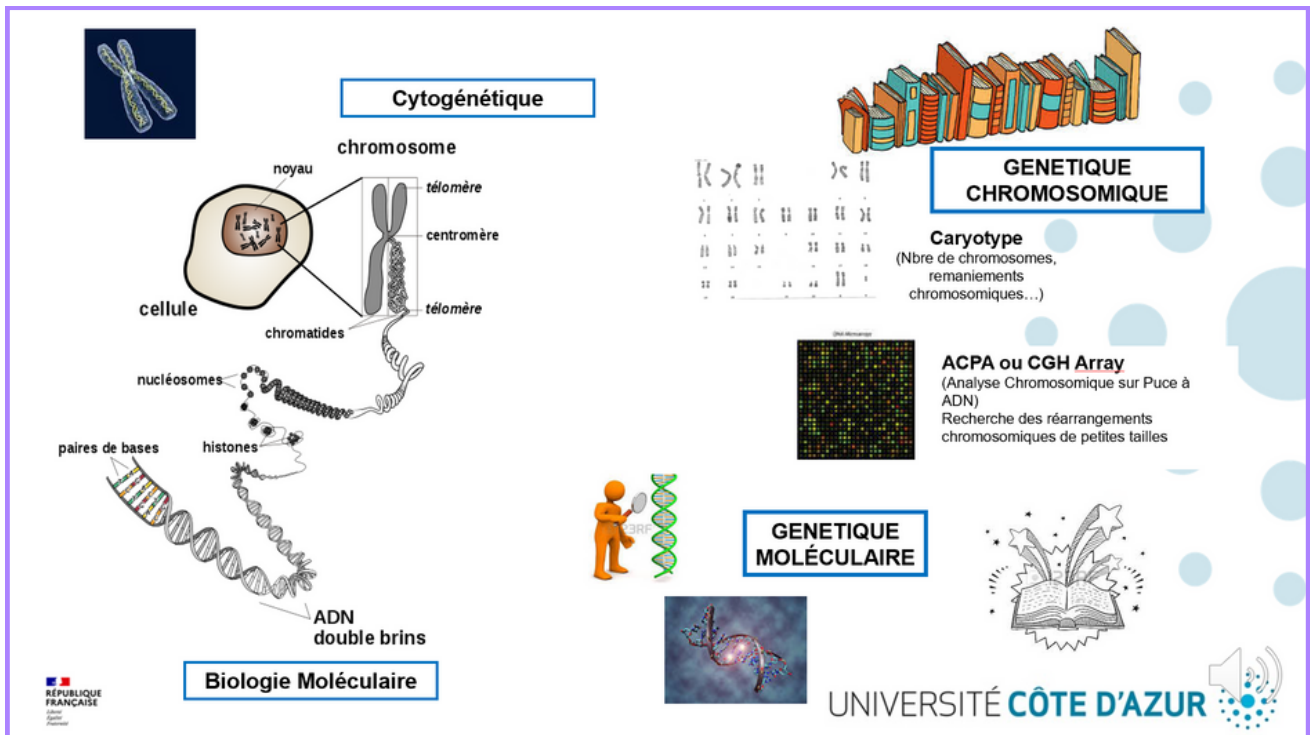
1. Place de la Génétique Médicale en 2025
2. Quelques définitions
3. Mode de transmission des caractères héréditaires
4. Dominance et récessivité des allèles

II - Techniques et approches diagnostiques des maladies génétiques

1. Les différents outils en biologie moléculaire
2. L'amplification en chaîne par la polymérase (Polymerase Chain Reaction ou PCR)
3. Le séquençage de l'ADN
4. Le séquençage Haut Débits de l'ADN (Next Generation Sequencing ou NGS)

I - Introduction à la génétique médicale

1 - Place de la génétique médicale en 2025



On va distinguer 2 disciplines différentes en génétique médicale:

- La **cytogénétique** ou génétique chromosomique
- La **biologie moléculaire** ou génétique moléculaire

On distingue ces 2 domaines selon une question d'échelle.

Il faut imaginer le caryotype comme une **bibliothèque** dont chaque livre est représenté par un chromosome.

- Dans la **cytogénétique** (elle parle également de génétique chromosomique), on s'intéressera plutôt aux **chromosomes**, à des gros fragments d'ADN avec des gros remaniements génétiques (recherche de trisomie 21 par exemple).
 - Ici, on s'intéressera à **regarder si on a un livre en plus ou en moins dans la bibliothèque (en réalisant des caryotypes)**.
 - On peut également s'intéresser à rechercher **des fautes au niveau des paragraphes de nos livres** (il y en a t il un en plus ou en moins ?), c'est-à-dire **rechercher des réarrangements chromosomiques de petite taille** (avec les techniques d'ACPA ou de CGH Array).
- Dans la **biologie moléculaire**, on s'intéressera plus à des **modifications de la séquence d'ADN** en elle-même.
 - On va chercher dans tous nos livres la moindre **faute d'orthographe (nucléotides)**.

La génétique médicale est impliquée principalement dans 3 grands chapitres :

1 L'**identification des mécanismes physiopathologiques** de maladies rares et fréquentes → car la biologie moléculaire permet de comprendre pourquoi telle ou telle maladie se développe (au niveau du mécanisme moléculaire responsable du dysfonctionnement de l'organe)

Le **diagnostic** :

- 2**
- Le **diagnostic POSITIF** : c'est une manière de confirmer de manière certaine une maladie génétique, comme la mucoviscidose par exemple (maladie génétique rare).
 - Le **diagnostic PRE-NATAL** : on peut, grâce à des techniques de cytogénétique ou de génétique moléculaire, faire un prélèvement très précocement au cours de la grossesse pour savoir si l'enfant à naître sera atteint ou non d'une maladie génétique.
 - Le diagnostic **PRE-SYMPATOMATIQUE** : c'est faire le diagnostic d'une maladie à venir chez un individu qui va parfaitement bien (avant que les symptômes ne se déclarent).

3 Le **traitement des maladies rares ou fréquentes** → aujourd'hui, on a de véritables essais de thérapies géniques qui fonctionnent dans le cadre de maladie extrêmement graves

2 - Quelques définitions

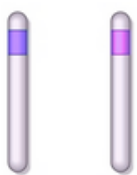
Autosomes : les 22 paires de chromosomes identiques dans les 2 sexes.

Locus : emplacement d'un gène sur un chromosome.

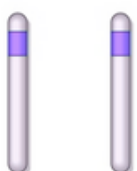
Allèles : versions alternatives d'un même gène.

Chez l'homme il y a 46 chromosomes = 22 paires d'autosomes (chromosomes non sexuels, du chromosome 1 au chromosome 22 par paire) et 1 paire de gonosomes (Chromosomes sexuels) : XX chez la femme ou XY chez l'homme.

👉 Les gènes se transmettent des parents à leur descendance. Ainsi, pour une paire de chromosomes homologues, il y a un chromosome hérité du père et l'autre de la mère. Donc si on prend un gène à un locus spécifique du chromosome 1, on a 2 allèles de ce gène (un allèle du père et un allèle de la mère).



Hétérozygote : individu portant 2 versions (allèles) différentes d'un même gène.
Par exemple on peut avoir un allèle muté délétère sur le chromosome 1 et l'autre allèle sur l'autre chromosome est non muté = sauvage.



Homozygote : individu portant 2 allèles identiques d'un même gène.
S'il porte les deux versions mutées d'un gène il sera homozygote malade (en cas de mutation délétère). Au contraire, s'il porte les deux versions sauvages (donc saines du gène), on parlera d'homozygote normal.

Hémizygote : individu portant un seul allèle = concerne uniquement les gonosomes X ou Y

Hétérozygote composite : individu portant 2 allèles mutés différents pour un même gène.

→ Par exemple, le père peut présenter une mutation de ce gène sur les premiers exons (régions codantes) du gène tandis que la mère peut présenter une mutation de ce même gène sur les derniers exons. Ainsi, il y aura 2 mutations qui touchent 2 zones différentes du gène.

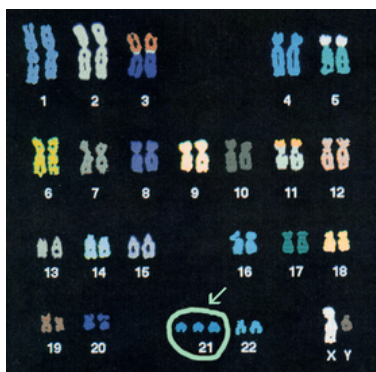
Il est important de faire la différence entre les 2 grands types de maladies génétiques :

Les **maladies génétiques somatiques**, ce sont des pathologies qui sont liés à l'accumulation de cellules somatiques → formation de tumeurs → pas de conséquences sur la descendance de l'individu car ces mutations génétiques ne touchent pas à la lignée germinale.

Ces mutations n'ont pas d'effet sur les enfants de la personne concernée, car elles ne touchent pas les cellules reproductrices (c'est-à-dire les cellules de la lignée germinale, comme les spermatozoïdes ou les ovules). Elles apparaissent seulement dans les cellules du corps (comme la peau, les poumons, etc.).

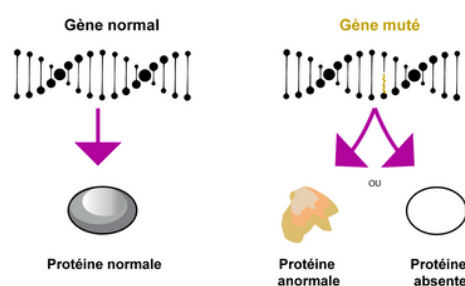
Les **maladies génétiques constitutionnelles**, elles sont dues à mutations génétiques qui peuvent se transmettre, il y a un risque pour la descendance.

Ici les mutations TOUCHENT justement les cellules reproductrices !

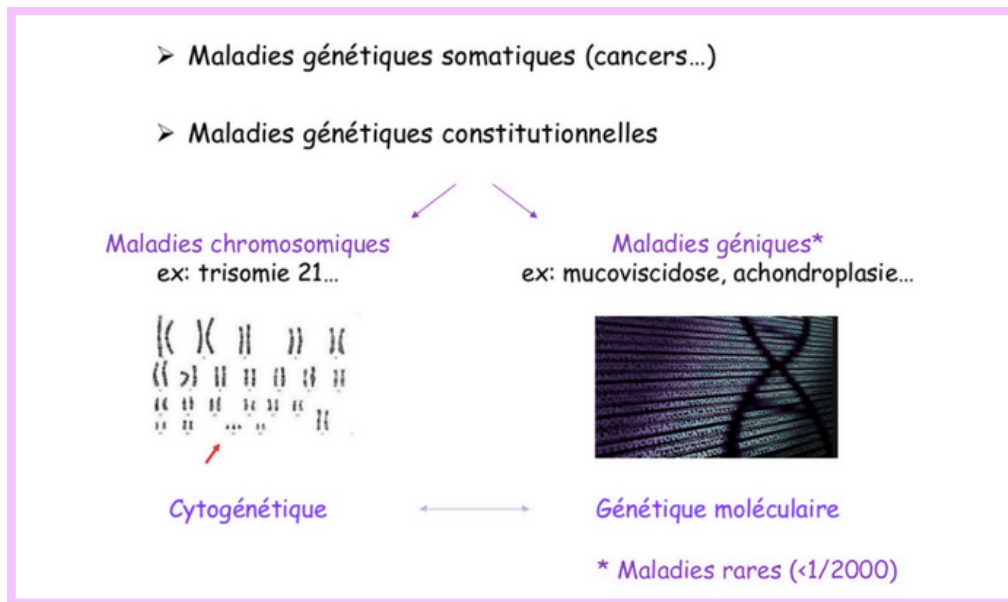


Parmi elles, on distingue :

- **Maladie chromosomique**, comme la trisomie 21 caractérisée par la présence d'un chromosome surnuméraire pour la 21^e paire.
 - La technique qui permet de déceler l'erreur dans le nombre de tomes (= de chromosomes), c'est la **cytogénétique**.
- **Maladie génique** : liée à la **modification de la séquence de l'ADN**. Les maladies géniques sont très nombreuses (plusieurs milliers) et très différentes (d'où la difficulté de les étudier) mais rare.
 - La technique qui permet de déceler la faute d'orthographe (= recherche de la modification de séquence), c'est la **génétique moléculaire**.
 - On peut citer parmi ces maladies géniques l'achondroplasie ou la mucoviscidose.



On définit une maladie rare comme une maladie qui touche moins d'une personne sur 2000.



Petit schéma récap pour votre plus grand bonheur <3

3 - Mode de transmission des caractères héréditaires

En génétique constitutionnelle, il est très important le mode de transmission des caractères héréditaires.

Un caractère héréditaire peut être **physiologique** (couleur des cheveux, des yeux, de la peau) ou **pathologique** (quand la mutation de la séquence d'ADN implique un dysfonctionnement au niveau des cellules ou des organes).

La transmission d'un caractère peut dépendre de :

D'un couple de gènes : caractère **monofactoriel** dont la transmission suit les lois de l'hérédité monogénique (les lois de Mendel).

Exemple : maladies géniques rares gouvernées par deux allèles d'un même gène (si important qu'il suffit qu'il soit muté pour déclencher la maladie)

De plusieurs gènes (majorité des cas) : caractère multifactoriel dont la transmission suit les lois de l'hérédité polygénique et dépend fortement de facteurs environnementaux.

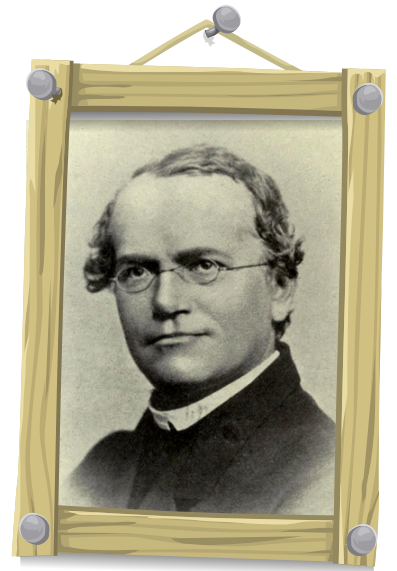
Exemple : maladies très fréquentes comme le diabète, hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde... qui dépendent de combinaisons génétiques mais aussi de facteurs environnementaux.

+++ Les **lois de Mendel** gouvernent la transmission de ces **caractères monogéniques héréditaires** +++

Ces lois s'appliquent exclusivement au **génome nucléaire** puisque le petit génome de la mitochondrie est spécifique et entraîne des pathologies très spécifiques et particulières.*

Elles stipulent que les gènes provenant des deux parents contribuent pour part égale à la descendance, ce qui suppose qu'ils sont toujours exprimés de façon équivalente

Exemple : dans un couple de gène, l'allèle paternelle est l'allèle maternelle vont être exprimé de façon équivalente.



Voici Gregor Mendel, un charmant monsieur n'est-ce pas ?

4 - Dominance et récessivité des allèles

Dans ces lois de Mendel, on retrouve un système biallélique avec :

- a, allèle muté responsable du caractère étudié
- A, allèle non muté (sauvage)

Un caractère **dominant** s'exprime chez les **hétérozygotes** (Aa).

→ Les hétérozygotes sont des individus avec un allèle muté et un allèle sauvage.

→ Donc si a est dominant sur A, il suffit d'avoir l'allèle a muté pour être malade, par conséquent les hétérozygotes seront malades.

Tandis qu'un caractère **récessif** s'exprime chez les **homozygotes** (aa).

→ Les homozygotes sont des individus avec 2 allèles mutés.

→ Ici, si a est récessif, il faut avoir cet allèle muté a en 2 exemplaires pour être malade, par conséquent seuls les homozygotes seront malades.

Ce système va nous permettre d'étudier 2 modes de transmission :

- Le mode de transmission autosomique dominant.
- Le mode de transmission autosomique récessif.

Tout d'abord, le mode de **transmission autosomique dominant** :

- Une personne atteinte a au moins un parent atteint
- Les 2 sexes sont atteints (*d'où le terme autosomique → ne concerne que les autosomes pas les chromosomes sexuelles X et Y*)
- La transmission se fait par les 2 sexes
- Un enfant issu du croisement d'un sujet atteint et d'un sujet non atteint a 1 risque sur 2 d'être atteint

	A	A
a	aA	aA
A	AA	AA

Première ligne : Papa ayant deux allèles sains AA

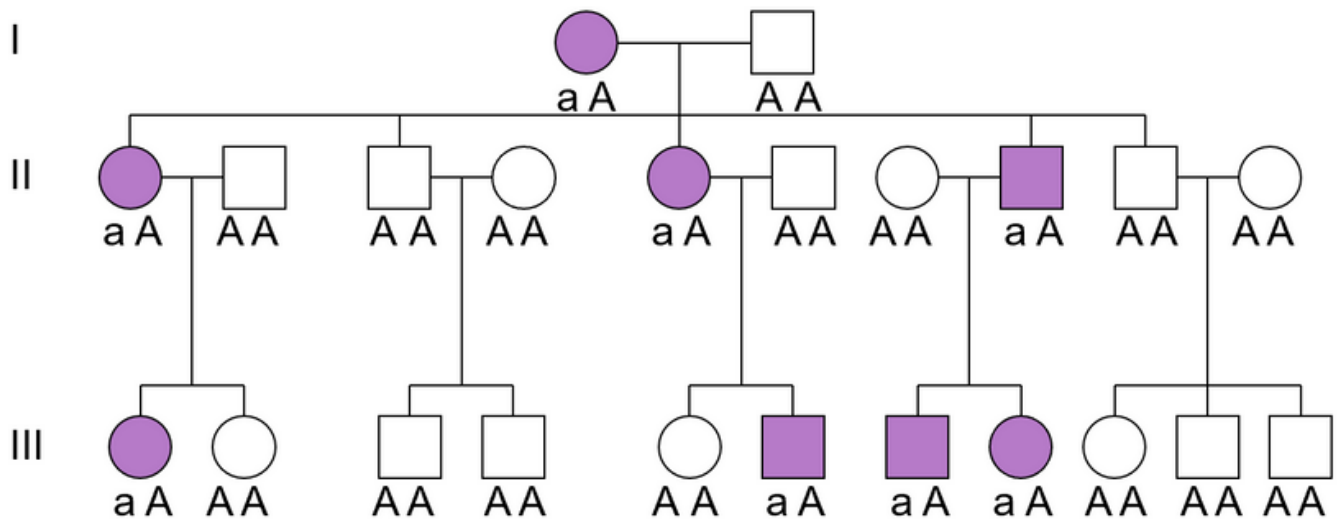
Son génotype est (AA) et son phénotype est non atteint

Première colonne à gauche : Maman ayant un allèle sain A et un allèle muté a

Son génotype est (aA) et son phénotype est atteint car a (allèle muté) domine.

Résultats : On voit bien que la présence d'un seul gène malade dominant donne

1 chance sur 2 pour l'enfant issu de cette union d'être malade (porteur de l'allèle muté).



Les **ronds** sont des **femmes**, les **carrés** sont des **hommes**

Les **noirs** sont **atteints**, les **blancs** sont **non atteints** et les petits points représentent une mutation.

On reconnaît ici une **transmission verticale ++**.

A chaque génération, on voit qu'il y a au moins 1 sujet atteint.

Si jamais au niveau d'une génération aucun enfant n'est atteint, alors les générations d'après ne seront pas atteintes ! (Sauf exception vu plus loin : pénétrance incomplète).

Cet **arbre fait penser à une maladie autosomique dominante** car :

- Arbre **VERTICAL** : individus atteints sur des générations successives -> DOMINANT
- **Garçons ET filles** atteints et transmetteurs -> AUTOSOMIQUE
- Individu atteint a toujours un parent atteint -> DOMINANT

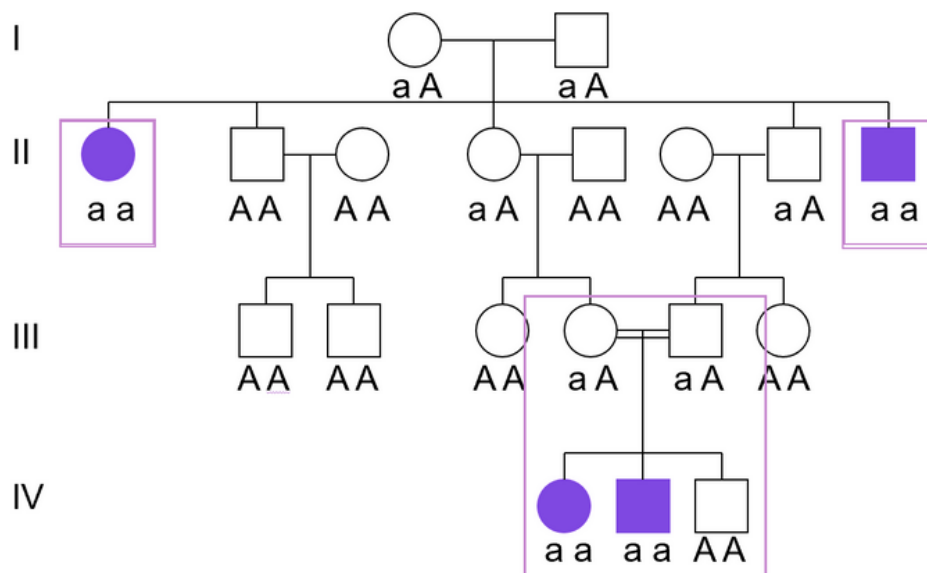
Ensuite, on peut retrouver la **transmission autosomique récessive** :

- On est toujours dans une transmission **autosomique** = se transmet de la même manière par le père ou la mère car ne concerne pas les K sexuels (X ou Y)
- Récéssivité donc le malade a les deux allèles mutés = homozygote
- Une personne atteinte **a habituellement des parents normaux (non malades)** MAIS porteurs de l'allèle muté ! Les parents du sujet atteint sont **porteurs sains** (=hétérozygotes = 1 allèle muté / 1 allèle sain.) Ils ne portent qu'une copie de l'allèle muté (état hétérozygote) ce qui est insuffisant pour provoquer la maladie mais suffisant pour la transmettre.
- Les **deux sexes sont atteints** et transmettent car autosomique.
- La **consanguinité des parents accroît l'incidence++**. En effet, la consanguinité accroît la probabilité que chacun des 2 parents soient porteurs d'un même allèle muté transmis dans la famille. Elle est donc fortement déconseillée.

	a	A
a	aa	aA
A	Aa	AA

On remarque qu'un enfant sur quatre aura un génotype (aa), et que trois sur quatre auront un phénotype sain (2 enfants porteurs sains avec la même configuration génétique que leurs parents + un enfant sain AA non porteur).

Résultats : 1/4 de risque d'avoir un enfant atteint au cours d'une seconde grossesse.



Cet arbre fait penser à une **maladie autosomique récessive** car :

- Arbre **HORIZONTAL** : parents non atteints mais porteurs → enfants atteints dans la même génération, transmission **horizontale**
- Garçons et filles atteints → **AUTOSOMIQUE**
- Pas d'atteinte dans les générations précédentes → **RÉCESSIF**
- Consanguinité (représentée par double trait sur un arbre généalogique) : augmente le risque car les parents ont hérité de la même mutation

II - Techniques et approches diagnostiques des maladies génétiques

Alors, comment est-on capable, au niveau de la biologie moléculaire et des techniques de diagnostic, d'aller rechercher ces "fautes d'orthographe" et d'analyser notre information génétique ?

L'analyse et les tests diagnostics se font **essentiellement sur l'ADN**. On peut également s'intéresser à l'ARN, mais notre cours portera surtout sur l'ADN qui est le plus utilisé en diagnostic.

On a un **très grand nombre de techniques**, mais finalement très **peu d'automates**.

Cependant, ce qui caractérise la génétique moléculaire c'est qu'on retrouve une **évolution technologique extrêmement rapide**. +++

→ Nous sommes très dépendants de cette évolution technologique.

Il y a également un **très grand risque de contamination des échantillons** les uns avec les autres, comme on le verra avec la PCR.

→ Les techniques de génétique sont donc **soumises à des agréments**, autant les locaux (risques de contamination importants) que les biologistes et généticiens exerçant cette activité.

→ **Def**: Un agrément est une permission, approbation émanant d'une autorité.

→ On a donc tout un aspect organisationnel très spécifique pour réaliser ce type de diagnostic.

1 - Les outils en biologie moléculaire

Les enzymes

Couper = nucléase (enzyme de restriction)	Copier = polymérase	Coller = ligase
• Endonucléase : coupe l'ADN au milieu ou à l'intérieur • Exonucléase : coupe l'ADN au niveau des extrémités	• ADN Polymérase : fait une copie d'un des brins d'ADN • Reverse transcriptase : fait une copie d'ADN à partir d'un brin d'ARN	• ADN ligase : coller 2 fragments d'ADN ensemble (ligase = liquer = coller 2 fragments)

C'est une **combinaison** de toutes ces enzymes que l'on va utiliser pour réaliser nos différents tests diagnostiques et aller rechercher les anomalies présentes au niveau de l'ADN.

2

Propriétés de l'ADN

En plus de ces enzymes, on va combiner des propriétés spécifiques de l'ADN : (maintenant qu'on connaît les propriétés de l'ADN on peut s'en servir)

- Variations de température : on va utiliser la faculté de l'ADN à devenir simple brin quand on fait varier la température
- Complémentarité des bases (cf cours de biomol avec la complémentarité des nucléotides)
- Migration dans un champ électrique : un fragment d'ADN, dans un champ électrique, est capable de migrer.

Ici c'est très théorique mais dans la suite du cours vous verrez comment ces propriétés sont utiles, on va revoir tout ça.

3

Analyses bio-informatiques

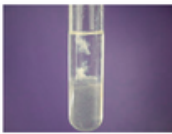
Elles se **développent de plus en plus**, elles sont essentielles et on verra à la fin du cours le NGS (dernière technologie) qui utilise énormément les aspects de bio-informatiques.

Prélèvement sanguin ou tissulaire



ADN Génomique
(ARN)

Extraction



PCR - Séquençage

Séquençage
Haut débit
(NGS)

Pour faire le diagnostic de maladie génétique, on va partir de prélèvement sanguin ou de tissu à partir desquels on va extraire notre ADN, on peut donc parler d'ADN génomique.

On va voir comment on peut :

- soit **rechercher des mutations ciblées** grâce des techniques particulières en utilisant notre “boîte à outils” (les fameuses enzymes)
- soit **analyser un très grand nombre de gènes** via la techniques de séquençage Haut Débit (NGS)

2 - L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Après avoir extrait notre ADN, on va amplifier un fragment, une région de cet ADN grâce à la technique de la PCR.

Cette technique de PCR a été mise en place en 1985 par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993), c'est sa première publication.

C'est une technique **fondamentale** qui est utilisée par la plupart des méthodes de biologie moléculaire.

Cette technique permet **d'obtenir une grande quantité d'une région d'ADN** grâce à l'amplification spécifique de la région d'ADN que l'on veut étudier.

Cette polymérase a été rendue possible grâce à la découverte et l'isolement/la purification d'une ADN polymérase particulière (soit capable de copier l'ADN) car **thermostable** → la **Taq (Thermophilus Aquaticus) DNA polymérase** ou **Taq Polymérase** +++

Cette polymérase a été identifiée dans la bactérie *Thermophilus Aquaticus*, c'est une bactérie (⚠ bactérie et pas virus ⚠), vivant dans les sources d'eau chaude.

Contrairement à la majorité des protéines, cette enzyme est capable de travailler à 95°C sans être dégradée ou dénaturée.

→ Elle est donc thermostable : elle continue de fonctionner même à de très hautes températures.

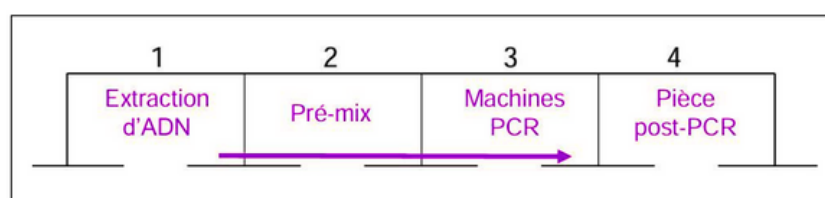
Le problème lié à la PCR est la génération de petits fragments d'ADN **extrêmement contaminants et volatils**.

→ Ainsi, pour réaliser une PCR, il faut que chacune des étapes soient bien séparées (dans des pièces distinctes) de façon à ne pas contaminer les échantillons les uns avec les autres.

→ Il existe donc un **circuit monodirectionnel** au sein du laboratoire avec :

- Une **pièce d'extraction**
- Une **pièce de pré-mix**, donc c'est-à-dire une pièce dans laquelle on prépare nos tubes avec tous nos éléments sauf l'ADN
- Une **pièce avec la machine PCR**, dans laquelle on va rajouter l'ADN du patient dans les tubes
- Une **pièce post-PCR**, lieu de manipulation des produits d'amplification. C'est dans cette 4e pièce que l'on retrouve des produits hautement contaminants comme des amplicons en quantité très importante.

→ Il n'y a pas de retour en arrière pour ne pas contaminer l'ADN de la 1ère pièce.



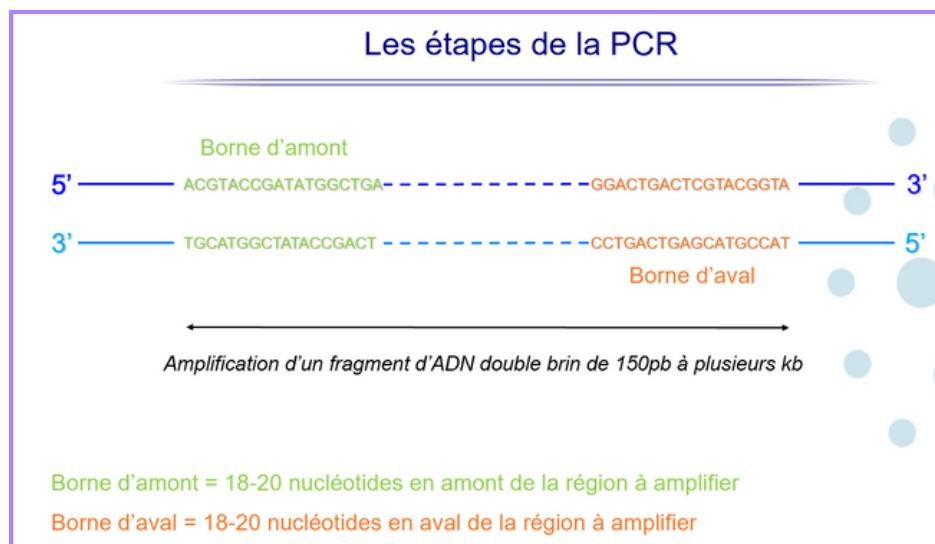
LES ETAPES DE LA PCR

Pour réaliser cette PCR, on part d'un ADN double brin dont on veut amplifier spécifiquement une région (ici schématisé en pointillé).

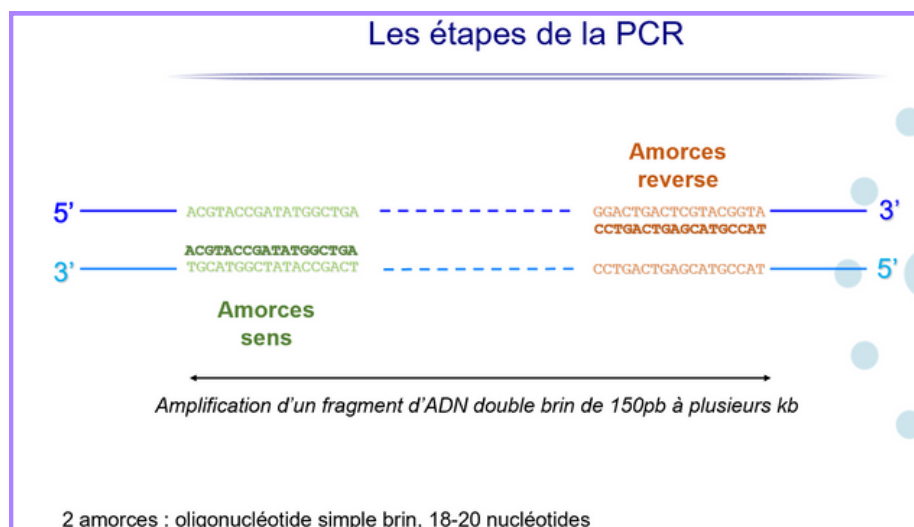
La taille de ce fragment d'ADN à amplifier, appelé amplicon, va varier de 150 paires de bases (pdb) à 3kB. On amplifie généralement un fragment d'ADN de l'ordre de quelques centaines de pdb.

2 choses sont à connaître avant de pouvoir commencer la PCR :

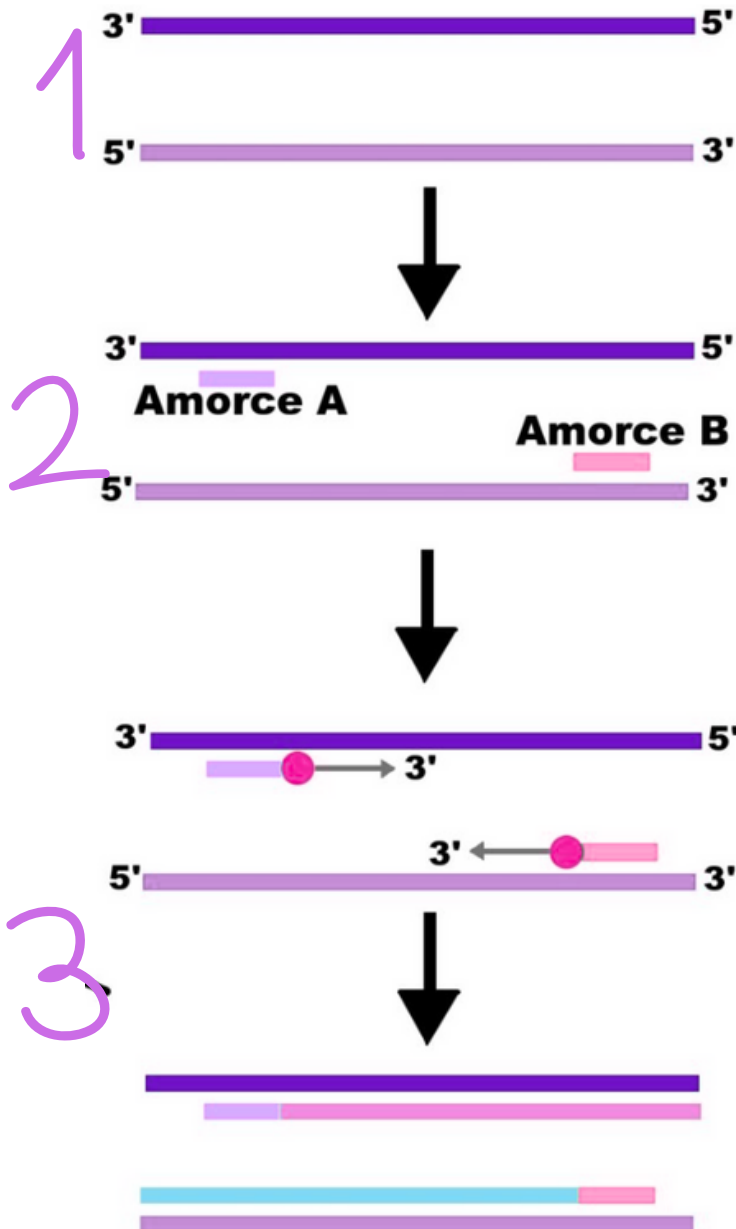
- La **séquence en amont** = borne d'amont : les 18 à 20 nucléotides en amont de la région à amplifier
- La **séquence en aval** = borne d'aval : les 18 à 20 nucléotides en aval de la région à amplifier



On doit connaître la séquence en amont et en aval de cette région pour être **capable d'ajouter des petites amorces** donc des morceaux d'ADN simple brin complémentaires soit de la partie 5' ou 3' de la partie du fragment à amplifier. Grâce à la complémentarité des bases, ces amorces vont donc s'apparier sur notre fragment d'ADN simple brin.



Au cours de la PCR, on va avoir une variation de température :



Dénaturation 95° : L'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin par rupture des liaisons hydrogènes.

Hybridation des amorces 55° : On va placer nos simples brins dans certaines conditions, pour que des **primers** (= **amorces** = oligonucléotides simple brin de 18 à 20 nucléotides) s'hybrident par complémentarité sur les bornes d'amont et d'aval des brins dénaturés (d'où la nécessité de les connaître).

→ Ils définissent ainsi les bornes du fragment d'ADN que l'on va amplifier

Élongation d'amorce 72° (Température de fonctionnement de la Taq polymérase) : La **Taq Polymérase** va copier le brin d'ADN, à partir des primers (comme toutes les ADN polymérases), dans le sens 5' - 3' (sens du brin fils).

La température de l'automate (95°, 55° puis 72°) **est très importante** pour son bon fonctionnement.

→ Par exemple, il est nécessaire que la 2e étape se fasse à 55° car à cette température c'est encore trop chaud pour que les 2 brins d'ADN se referment mais les amorces sont capables de s'hybrider sur leur région complémentaire.

Pas besoin de les connaître par cœur (sauf le 95°) mais il faut juste savoir qu'on chauffe = on dénature, on baisse la température = pour que nos amorces s'hybrident et la troisième température = température de fonctionnement de la polymérase que l'on va utiliser.

Ces 3 étapes vont être **répétées n fois**, il y a généralement entre **30 et 45 cycles PCR**. Il y aura **2n molécules au bout de n cycles**.

→ Là il est à compter juste « 30 et 35 » ou « 35 et 45 » ... tout ce qui est entre 30 et 45 c'est juste.

→ Le but de faire plusieurs cycles, c'est donc d'avoir une très grande quantité d'ADN.



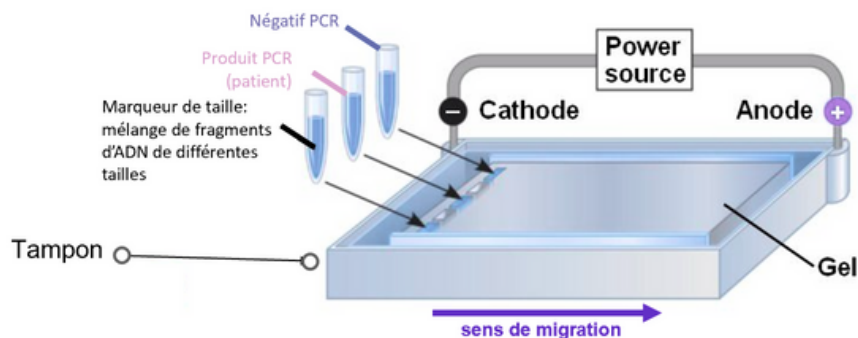
Ces réactions se font dans un **thermocycleur**.

→ Soit un appareil faisant juste des variations de température de manière très rapide (en quelques secondes), c'est lorsqu'on ouvre ce tube que notre ADN alors très volatile peut s'échapper et contaminer les échantillons suivants.

On va ensuite vérifier notre produit de PCR, c'est-à-dire qu'on va regarder si cette amplification s'est faite correctement et si on a obtenu un fragment à la taille souhaitée.

Dans ce cas, on va utiliser la propriété de l'ADN de migrer dans un champ électrique.

→ On va donc déposer nos produits PCR (dans nos tubes qui contiennent notre amplification) dans un gel d'agarose (un support solide) auquel on va ensuite appliqué un champ électrique.



Ce champ électrique va faire migrer notre ADN. **L'ADN, chargé négativement grâce aux groupements phosphate (PO_4^-), migre du - (cathode) vers le + (anode).**

En fonction de la composition de notre gel d'agarose, on va pouvoir séparer nos fragments d'ADN selon leur taille.

→ Les petits fragments avancent plus vite et descendent plus loin, les gros fragments restent en haut.

La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique (ADN) sera fonction :

- de sa masse moléculaire (nombre de paires de bases pb)
- de la concentration en agarose ou en acrylamide du gel

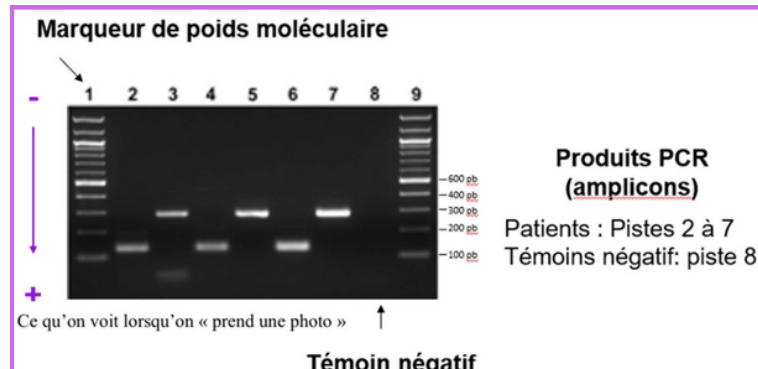
Si c'est un peu compliqué, pas de panique, vous verrez toutes les explications en P1 comme il se doit. Pour l'instant, ne cherchez pas trop loin <3

Ces différents fragments peuvent être visualisés sous une lampe à UV. On obtient donc le résultat de notre amplification PCR.

→ Vous voyez que dans les différents puits (2,3, 4, 5, 6, 7) : on déposé nos différents patients et on amplifié des fragments à des tailles différentes.

EXEMPLE :

Lors de la coloration du gel par le Bromure d'Éthidium, nous obtenons ceci :



Le gel contient 8 pistes (dans cet exemple, le nombre de pistes peut varier) :

- **La première** : nous avons fait migrer un **marqueur** de taille/de poids moléculaire, c'est à-dire des fragments d'ADN dont la taille est connue.
→ Cette **piste correspond donc à un repère**, pour les tailles de nos amplicons (ainsi, on pourra connaître la taille de nos morceaux d'ADN amplifiés en fonction de l'endroit où ils s'arrêtent par migration en comparant avec notre repère).
- **Les pistes 2 à 7** : ce sont les **migrations de nos produits** PCR (= nos amplicons) provenant de différents patients.
→ L'intensité de la bande (bande très peu ou très visible) donne une idée sur la quantité d'amplifications PCR de cette taille puisqu'au plus la bande est visible, au plus la quantité est importante.
- **La 8e piste** : c'est notre **témoin négatif**.
→ Cette piste existe toujours, elle est **indispensable** à toutes expérience PCR car elle témoigne de la non contamination de nos amplicons.
→ Elle est le **résultat de la migration** de tous nos produits mis dans le tube de départ **sauf l'ADN** (= tout ce qu'on met dans le tube dans la 2e pièce lors de la PCR).
→ La piste doit donc **rester noire** :
 - Si une **fluorescence apparaît** sur cette piste, **les résultats ne sont pas interprétables** car ils auront été contaminés par un autre ADN. En effet, on n'a pas mis d'ADN dans ce tube donc l'ADN présent provient d'une contamination. Ainsi, nos autres tubes aussi sont probablement contaminés, donc on ne regarde même pas les autres pistes, **on doit tout recommencer !**
 - Si cette **piste reste noire**, cela veut dire que les pistes 2 à 7 sont bien des amplifications des ADN de nos patients, et non d'un ADN contaminant (les résultats sont donc interprétables) → **notre PCR a donc marché.**

3- Le séquençage de l'ADN

Après avoir amplifié notre fragment d'intérêt, on va vouloir rechercher la faute d'orthographe. On va donc séquençer = lire notre fragment d'ADN (produit PCR).

Le séquençage va permettre de **déterminer la succession des nucléotides qui constitue notre fragment d'ADN**, on va pouvoir utiliser la méthode enzymatique des didésoxyribonucléotides (ddNTPS) ou **méthode de Sanger**.

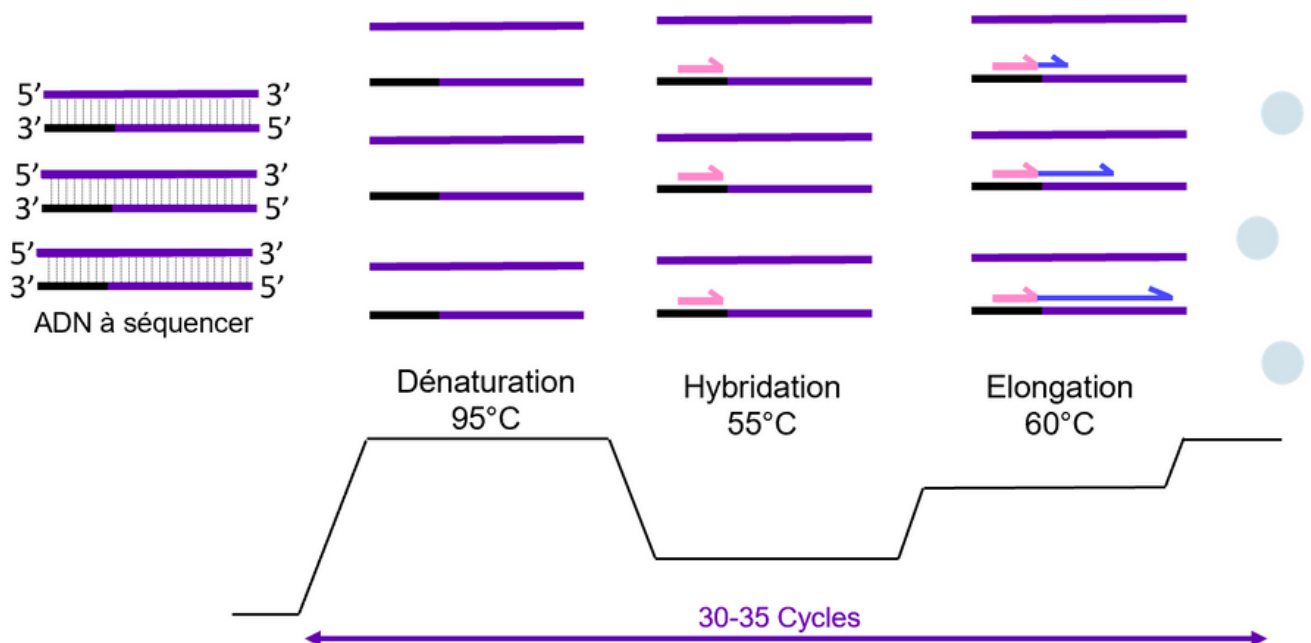
On va retrouver **un peu les mêmes éléments que pour la PCR**, il nous faut :

- le **fragment d'ADN** que l'on veut séquençer (notre produit PCR)
- une **amorce complémentaire** à ajouter
- une **ADN polymérase** qui va synthétiser le brin complémentaire

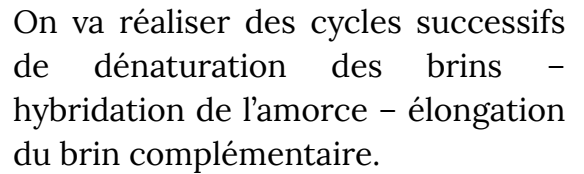


On a donc également les **mêmes étapes que pour la PCR**, c'est-à-dire une succession de changements de température de façon à **dénaturer notre produit PCR, hybrider nos petites amorces et de permettre à l'ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire**.

Les étapes:



→ Ces ddNTPS sont “taggées” soit recouverts d’un flurochrome qui leur donne une couleur spécifique pour qu’ils soient reconnaissables.



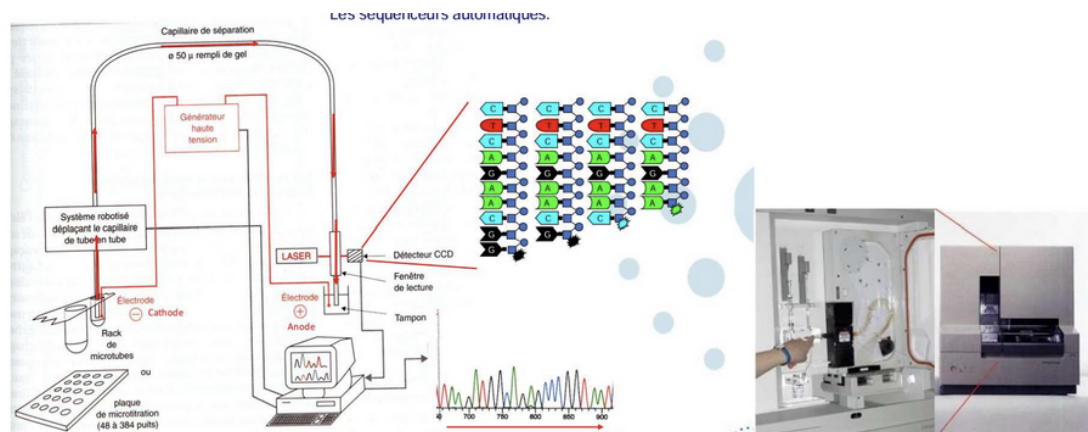
Le tutorat niçois est gratuit. Toute reproduction ou vente est interdite.

Détection

Au fur et à mesure de la migration, les fragments passent devant une caméra/laser.

Le fluorophore du ddNTP incorporé est lu : vert = A, rouge = T, bleu = C, noir = G.

Chaque tube de séquençage correspond à un capillaire, et chaque fragment qui passe est identifié par sa taille (position) et sa couleur (nucléotide).



Traitement informatique

Le signal est converti en électrophorégramme, un tracé de pics colorés.

- Position (taille du fragment) → indique l'ordre des bases.
- Couleur (fluorophore du ddNTP) → indique l'identité de la base.

➡ On obtient ainsi directement la séquence nucléotidique.

4 - Le séquençage Haut Débit (NGS)

La biologie moléculaire et la génétique moléculaire sont **très dépendantes des technologies**, c'est particulièrement le cas pour le séquençage.

→ Le génome humain est composé de **3 milliards de paires de bases**, aujourd'hui on est capable de séquencer un génome au complet (soit déterminer la succession de ces 3 milliards de paire de bases).

→ Ceci est possible grâce à l'évolution des techniques.

La technique de Sanger (vue précédemment) aurait nécessité un an et 120 machines pour pouvoir décrypter la séquence du génome humain.

Aujourd'hui, avec les nouvelles techniques de séquençage Haut Débit, on est **capable de séquencer le génome humain en une semaine voire moins avec une seule machine**.

Ceci s'est fait en quelques années où l'on a développé très rapidement ces nouvelles technologies.

Depuis 2003, on connaît la séquence complète du génome humain.

Donc, aujourd'hui on peut séquencer soit l'ensemble du génome d'individu soit séquencer uniquement les régions codantes de ce même génome (Whole Exome Sequencing).

Il faut bien comprendre que l'exome (soit les régions codantes) ne représentent que 2% de la totalité de notre génome.

→ Les autres régions ne servent pas à rien, on a juste beaucoup de mal à interpréter des variations génétiques que l'on trouverait sur ces régions non codantes.

LEXIQUE :

Exome : Ensemble des exons (régions codantes du génome)

Génome : Ensemble des gènes (comprenant les exons et les introns)

Séquençage : Le séquençage haut débit est un séquençage massif en parallèle de molécules d'ADN individuellement séparées et amplifiées sous forme de clones ou de molécules uniques.

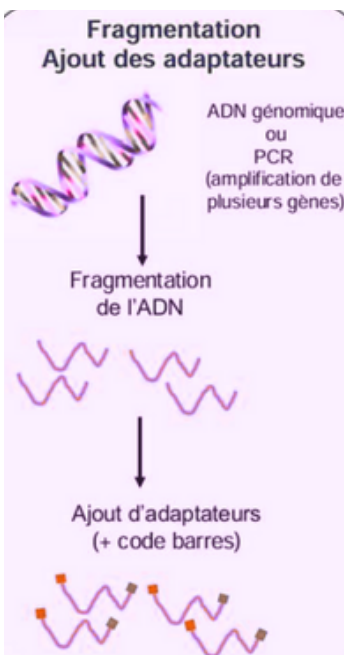
Actuellement, il existe deux plateformes (2 sociétés) qui commercialisent deux technologies différentes au niveau des étapes d'amplification et de séquençage les sociétés :



Illumina est la plateforme la plus fréquemment utilisée.

La professeure vous conseille de voir 2 vidéos YouTube (qui explique chacune le déroulement de ces 2 méthodes) dont vous avez le lien ci-contre. Ces liens sont directement issus du diaporama du Pr. Bannwarth.

1



La préparation des échantillons/librairies : Cette étape est identique quelle que soit la plateforme utilisée (illumina ou ThermoFischer).

Elle consiste à **fragmenter notre ADN** (ADN génomique ou des fragments PCR) avec des endonucléases.

A ces petits fragments d'ADN, vont être ajoutés **des adaptateurs (= primers)** à chacune de ces extrémités.

Ces adaptateurs servent à ce que toutes les extrémités 5' et 3' soient identiques et donc qu'on puisse amplifier l'ensemble de nos fragments d'ADN avec uniquement un seul couple de primer (1 primer sens + 1 primer reverse).

On va également ajouter **des barres-codes = BC**.

Ces BC ont une séquence bien déterminée et chaque BC va être attribué à un patient, soit **une séquence de BC = un patient**.

Dans les étapes de séquençage on va donc pouvoir mélanger nos patients dans un même run, dans une même réaction.

2

Enrichissement : PCR Clonale

Fixation et amplification
des fragments d'ADN
sur support solide

Illumina :
Lame de verre (Flow cell)
PCR « Bridge » en clusters

ThermoFisher :
Sphères métalliques
PCR en émulsion



3

Séquençage

Illumina:
Séquençage par synthèse
Détection de fluorescence

ThermoFisher:
Semi-conducteur
Séquençage par synthèse
Détection de variation de pH



4

Analyse Bioinformatique

- Détermination des bases
- Contrôle qualité
- Alignement au génome de référence
- Détermination des variants
- Annotation
- Interprétation

La PCR : **Enrichissement de nos fragments d'ADN** par PCR clonale, (car on part d'un seul fragment et on l'amplifie x fois) il va y avoir une étape de fixation et d'amplification de chacun des fragments d'ADN sur un support solide, différents selon les plateformes :

- > Technologie **Illumina** = **Lame de verre**
- > Technologie **Thermo Fischer** = **sphères métalliques**

L'idée c'est de **séparer** tous les fragments d'ADN (en les fixant) de manière à pouvoir les **amplifier** de manière clonale (à en avoir des copies, des clones). Il faut imaginer qu'on le fait pour nos milliards de séquence en même temps.

Le séquençage : Ces supports solides (lame de verre, sphère métallique) vont être **séquencés individuellement**. On retrouve un peu ce qu'on avait avec le séquençage Sanger mais avec des détections qui vont être différentes en fonction des plateformes :

- > **Illumina** : détection de **fluorescence** (*mémo de ma vieille : illumina → lumière → fluorescence*)
- > **ThermoFischer** : des variations de **pH**

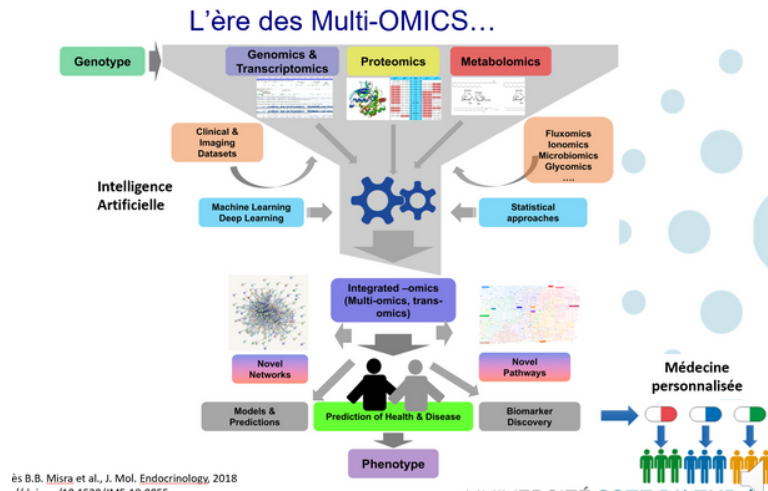
Mots du Pr Bannwarth « Peu importe ce qu'il faut que vous compreniez c'est **qu'on fragmente, on isole, on amplifie et on séquence** »

L'analyse bio-informatique : C'est elle qui va permettre de :

- **déterminer si on a une différence de nucléotide** par rapport à la séquence de référence
- **d'annoter** l'ensemble de ces données afin de nous dire au niveau de quel gène et de quel exon on a une variation nucléotidique
- de nous dire **si on a une mutation à l'état homozygote ou hétérozygote**
- de nous dire **quel acide aminé** est touché par la mutation

Néanmoins, cette **interprétation reste à la charge du biologiste**, il doit interpréter environ 67 000 variants après un séquençage d'exome. Il faut trouver le variant (ou les 2 variants si c'est une maladie récessive) qui sera responsable de cette maladie parmi les 67 000 variants.

Cette interprétation nécessite une connaissance des gènes et des échanges entre les cliniciens et les biologistes. Il faut des **concertations pluridisciplinaires** et toujours revenir à la clinique afin de comprendre pourquoi la mutation identifiée est responsable de cette maladie (quelle protéine impliquée etc..)



Pour se projeter un petit peu dans l'avenir, c'est l'ère du multi-omics qui arrive.

Là encore **on est dépendant des technologies**, les technologies nous permettent aujourd'hui de séquencer un génome complet ou encore de s'intéresser aux protéines, au métabolisme, aux lipides.

→ Ce qu'on appelle les "omics", c'est toutes les techniques qui permettent d'appréhender à la fois le génome, les protéines, les lipides, les sucres.

→ Grâce à des outils d'intelligence artificielle, on va **pouvoir combiner ces différentes informations** car finalement un individu, sa pathologie ou encore son phénotype dépendent de beaucoup de choses différentes.

→ Par exemple, au niveau de la biologie cellulaire, vous avez vu que l'on a besoin de conserver l'homéostasie pour que tout fonctionne correctement car tout est relié !

→ Ainsi, la médecine personnalisée va permettre de combiner et comprendre les différentes voies métaboliques relatives à chaque individu afin de développer des médicaments qui leur seront propres. Ils seront donc déterminés grâce à l'analyse de ces multi-omics.

→ On y est pas encore, mais ce qu'il faut comprendre c'est que ces disciplines vont évoluer à l'avenir très rapidement.

→ L'analyse de ces multi-omics est en pleine expansion et vont définir la médecine de demain.

CONCLUSION

- La **biologie cellulaire** et la **biologie moléculaire** sont des disciplines qui s'articulent entre elles et maintiennent un équilibre indispensable au bon fonctionnement d'un organisme.
- Ces disciplines évoluent rapidement et en lien avec l'évolution des technologies.
- Elles seront au cœur de la médecine de demain, soit une médecine personnalisée

Place aux dédiiiis (vous allez adorer ça l'année prochaine hihi)

- Dédi au **Tutorat Niçois**, une deuxième famille pendant cette année de P1 ! Aujourd'hui en faire partie est un véritable honneur, gros cœur sur tous les tuteurs de cette année (notamment ma cotut' Maïssa, quelle team d'enfer la biomol/gé) <3
- Mais surtout **dédi à vous les Terminales**, vous allez vous lancer dans une année, certes compliquée, mais passionnante ! Donnez tout, vous en êtes capables, tout le Tutorat est derrière vous !
- Spéciale dédi à **Lina**, je sais que tu vas réussir, et tu seras un médecin formidable !