

L1- Sciences pour la Santé UE Bases en Sciences de la Vie

-

Génétique

Techniques NGS et cytogénétique : introduction aux techniques

Dr Maud TUSSEAU

Service de génétique médicale

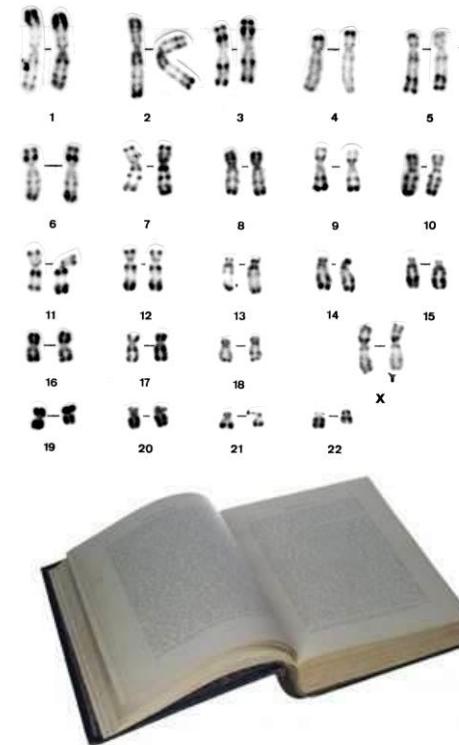
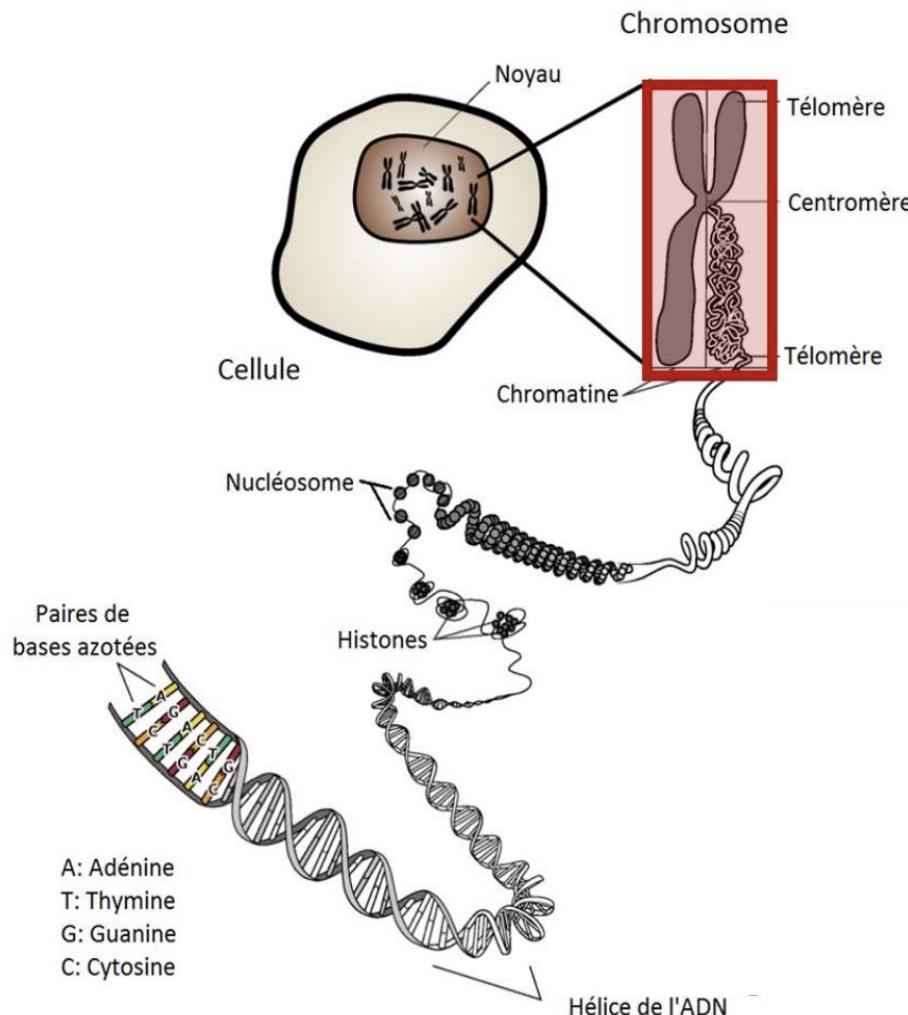
07/11/2025



Plan du cours

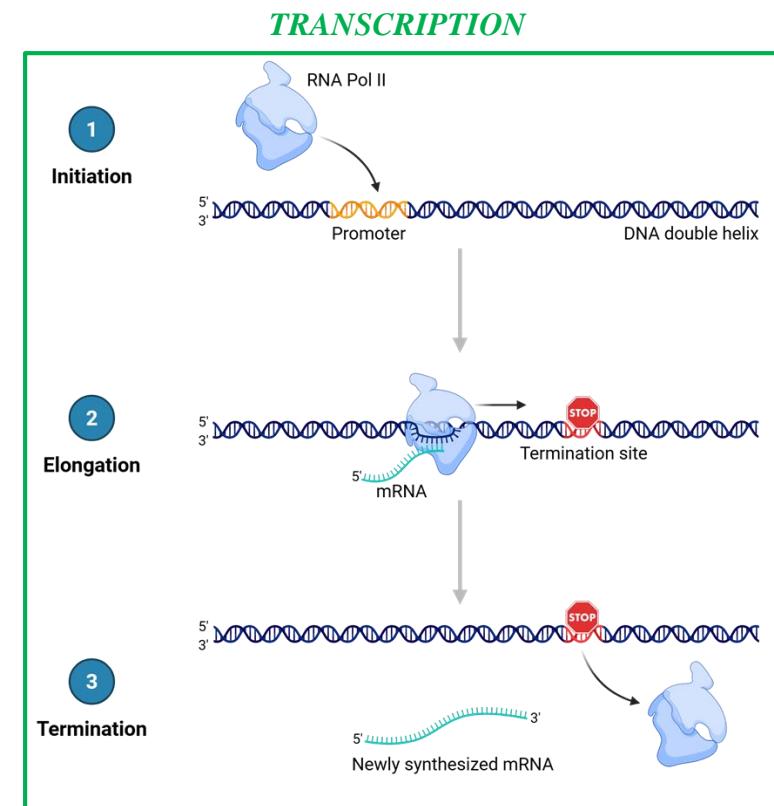
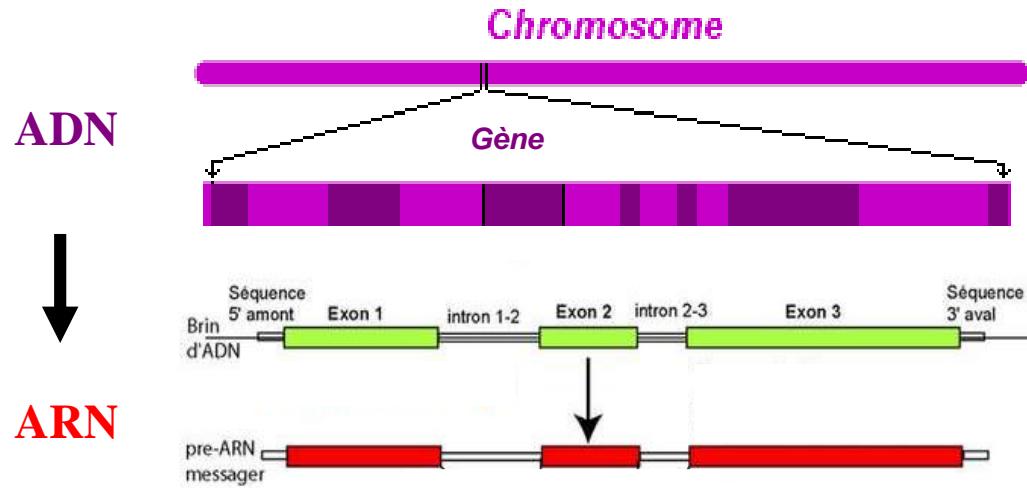
- Introduction :
 - Notions de bases de génétique
 - Intérêt des études génétiques
- Aperçu des techniques de génétique : du caryotype au NGS
 - Cytogénétique : le caryotype
 - PCR et séquençage sanger
 - Génétique moléculaire : le NGS
- Le parcours génétique (en France, en 2023)
- Modes de transmission et exemples de maladies génétiques
- Enjeux éthiques

ADN et chromosome

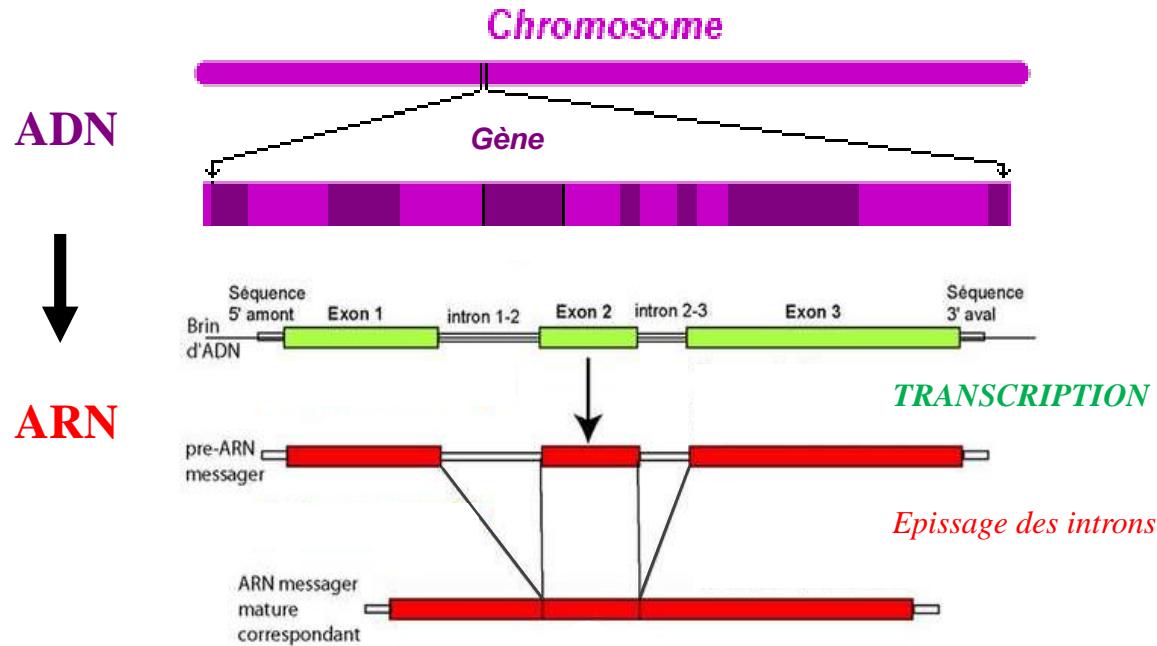


Le génome humain = 3 milliards de paires de bases – environ 20 000 gènes

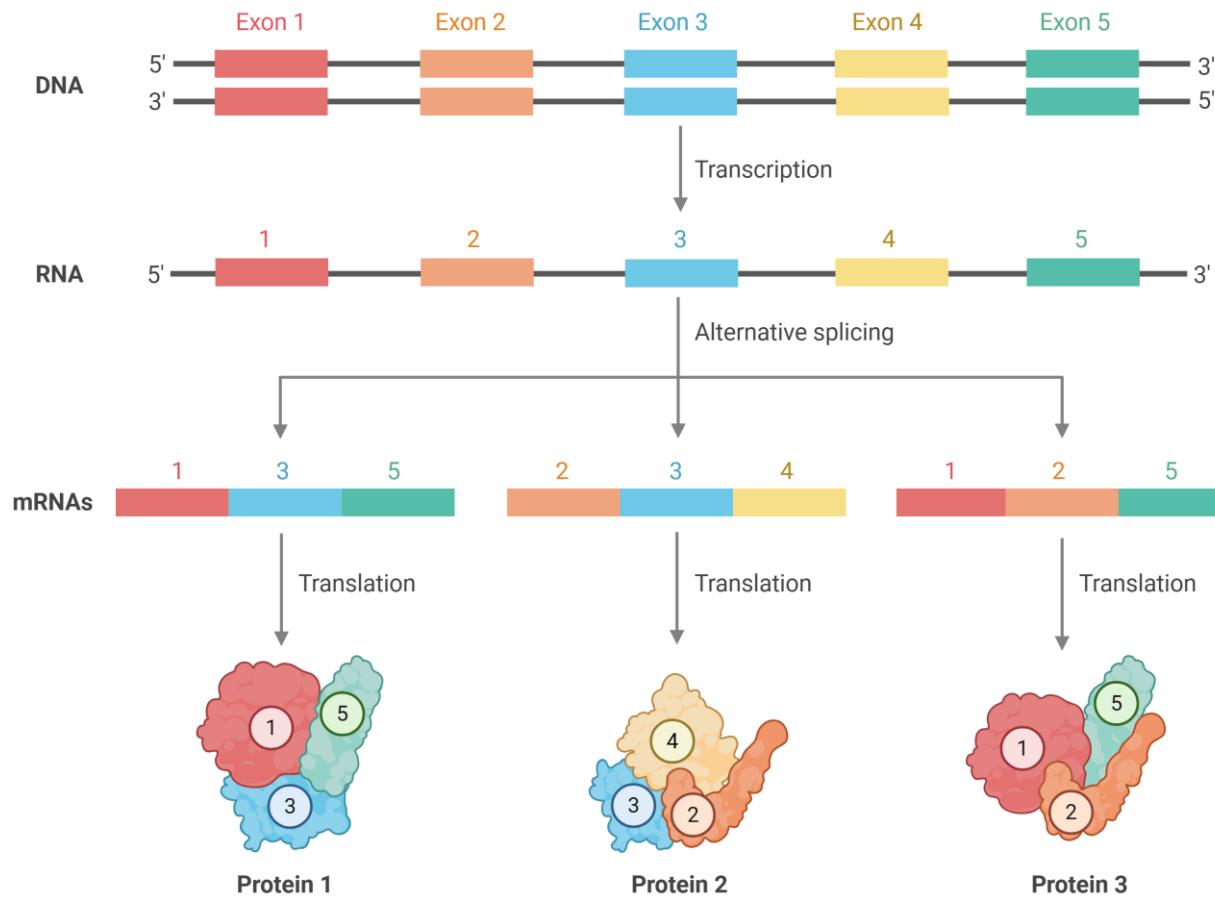
De l'ADN à la protéine



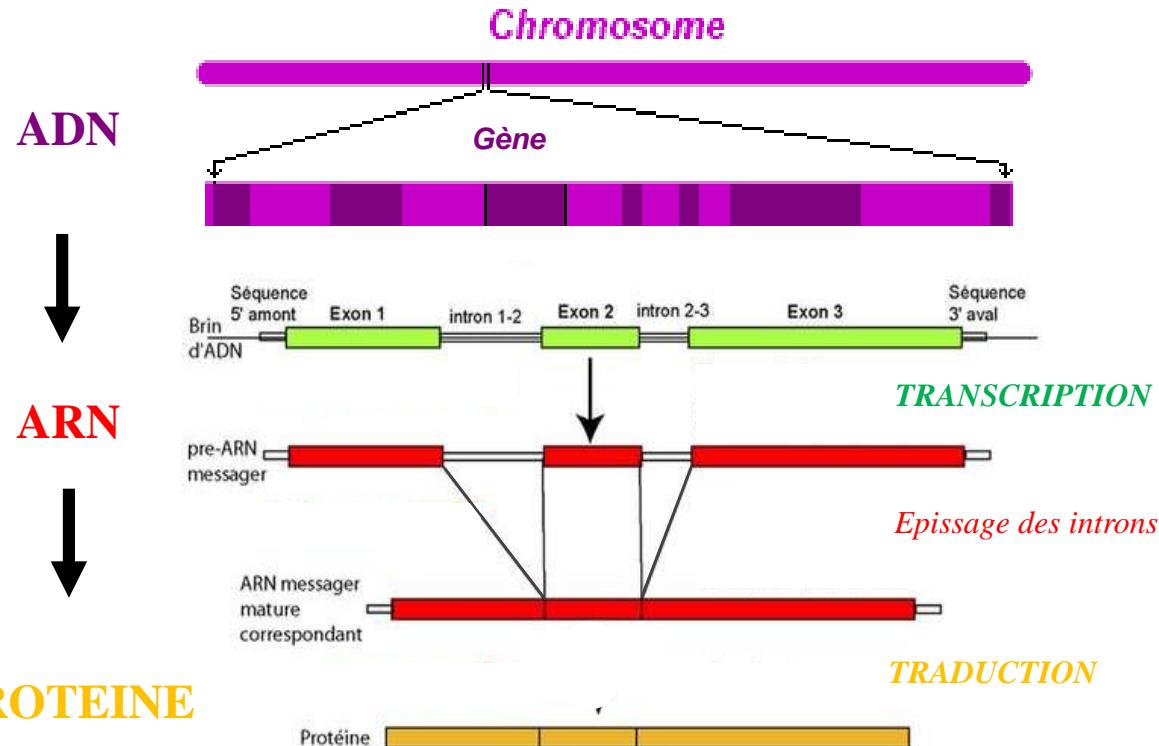
De l'ADN à la protéine



Epissage alternatif

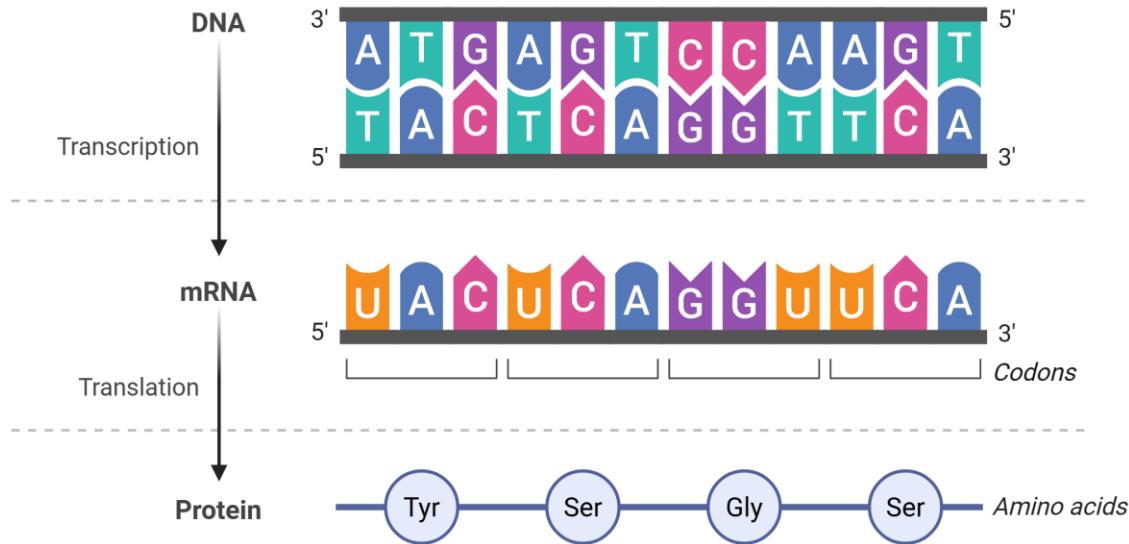


De l'ADN à la protéine



Traduction

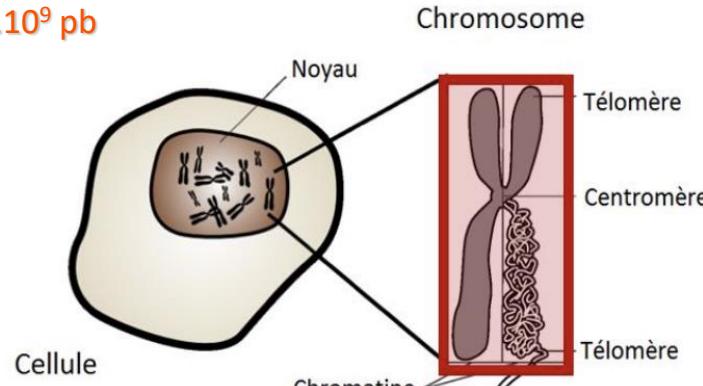
Etape qui consiste à décoder l'information génétique portée par l'ARNm pour assembler une chaîne d'acides aminés constituant une protéine.



LE CODE GENETIQUE				
ARN messager Codon : deuxième base azotée				
U	C	A	G	
ARN messager Codon : première base azotée	Phe	Ser	Tyr	Cys
	Phe	Ser	Tyr	Cys
	Leu	Ser	STOP	STOP
	Leu	Ser	STOP	Trp
	Leu	Pro	His	Arg
	Leu	Pro	His	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
	Leu	Pro	Gln	Arg
	Ile	Thr	Asn	Ser
	Ile	Thr	Asn	Ser
	Ile	Thr	Lys	Arg
	Met	Thr	Lys	Arg
ARN messager Codon : troisième base azotée	Val	Ala	Asp	Gly
	Val	Ala	Asp	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly
	Val	Ala	Glu	Gly

Niveaux d'études du génome

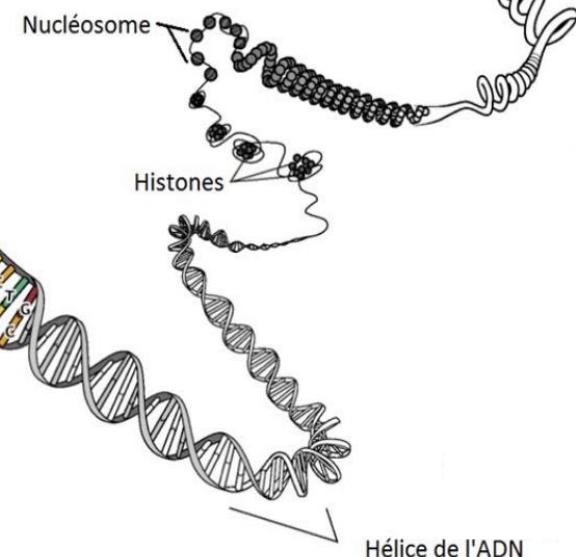
Génome: 3.10^9 pb



Chromosome: 2.10^8 pb

Cytogénétique conventionnelle

« Etude à l'échelle du chromosome »
Caryotype : résolution 10-15 Mb



Sous-bande: 2.10^6 pb

Cytogénétique moléculaire

CGH : résolution jusqu'à quelques kb

Gène moyen: 2.10^4 pb

Biologie moléculaire

« Etude à l'échelle du nucléotide »

Exon: 50 à 1000 pb

A: Adénine
T: Thymine
G: Guanine
C: Cytosine

Intérêt des études génétiques : Exemple des maladies rares

- Notion de maladies orphelines/rares : maladies touchant moins d'une personne sur 2 000
- 80% sont des maladies génétiques
- Plus de 6 000 maladies orphelines
- 3 millions de personnes touchées en France



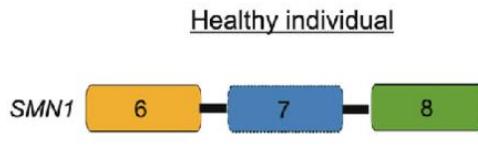
Pourquoi faire un test génétique ?

- Identifier les variants génétiques responsables d'une maladie chez un patient : « mettre un nom » sur la maladie
- le conseil génétique : identifier les personnes à risque de transmettre une maladie, déterminer un risque d'atteinte du fœtus pour une future grossesse ...
- Identifier les personnes à risque de développer une maladie : diagnostic présymptomatique, facteurs de risque
- Thérapies ciblées (cancers, maladies rares : amyotrophie spinale, épilepsies monogéniques...)
- Amélioration des connaissances : meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie, constitution de groupes de patients homogènes

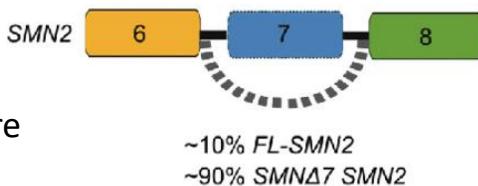
Les thérapies ciblées : ex de la SMA

- Amyotrophie spinale (SMA) : pathologie neuromusculaire liée à une mutation du gène *SMN1*, de transmission autosomique récessive

Gène *SMN1* : protéine fonctionnelle



Gène *SMN2* : protéine sans l'exon 7, moins stable



Codent pour protéines nécessaire à la survie des motoneurones

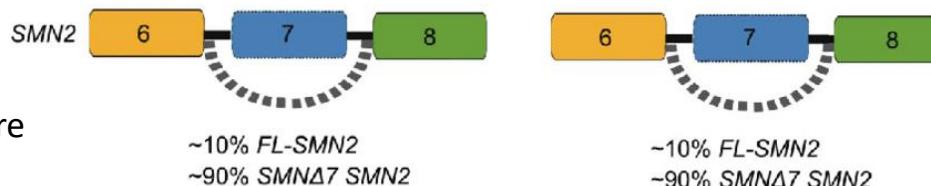
Les thérapies ciblées : ex de la SMA

- Amyotrophie spinale (SMA) : pathologie neuromusculaire liée à une mutation du gène *SMN1*, de transmission autosomique récessive

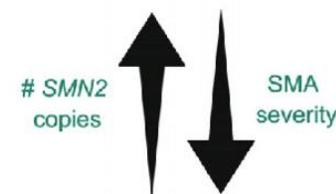
Gène *SMN1* : protéine fonctionnelle



Gène *SMN2* : protéine sans l'exon 7, moins stable



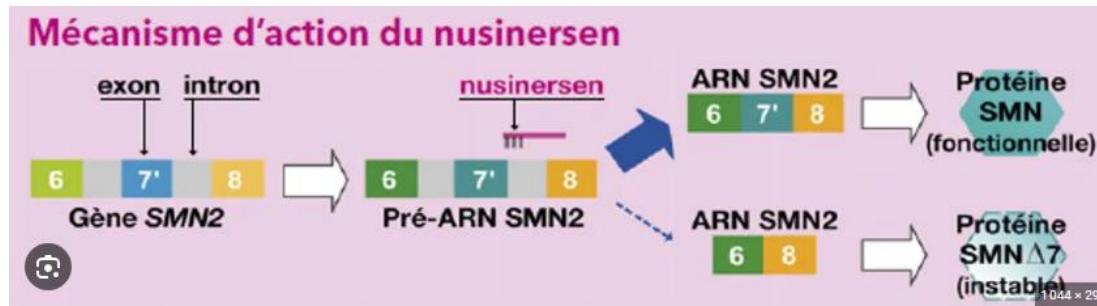
Codent pour protéines nécessaires à la survie des motoneurones



Les thérapies ciblées : ex de la SMA

- Oligonucléotide antisens : le Nusinersen ou Spinraza

Petite molécule qui se fixe sur l'ARN messager du gène SMN2 pour en modifier l'épissage alternatif et ainsi permettre sa traduction en protéine SMN2 fonctionnelle



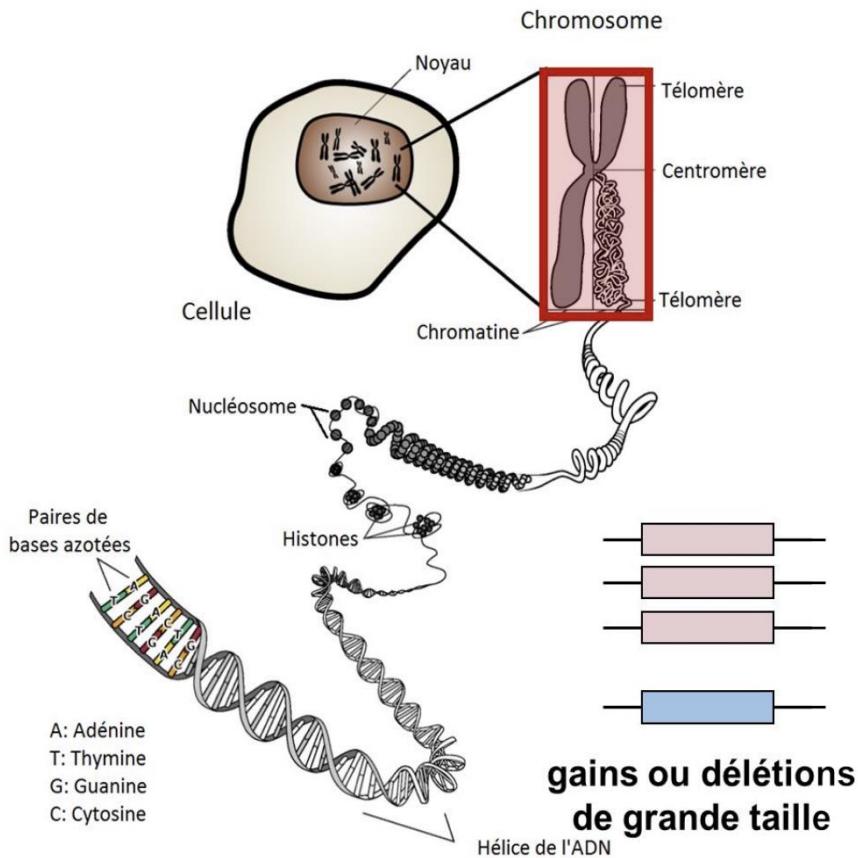
- Thérapie génique : Onasemnogene abeparvovec : ZOLGENSMA
Vecteur adénovirus non réplicant AAV 9 apportant le gène SMN1

À compter du 1er septembre 2025, l'amyotrophie spinale infantile est systématiquement dépistée chez les nouveau-nés en France dans le cadre du dépistage néonatal

Aperçu des techniques de génétique : du caryotype au NGS

Le caryotype

Le caryotype



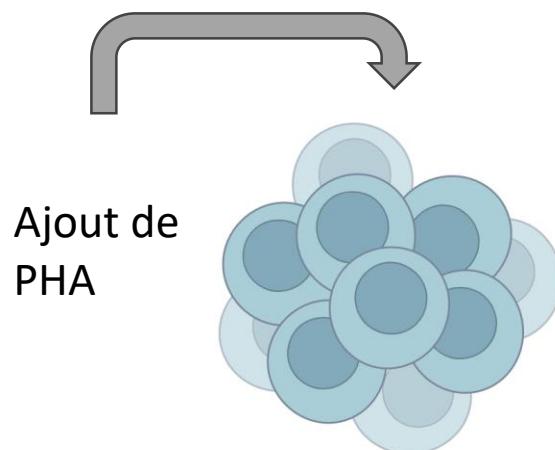
Permet une vision globale : analyse pangénomique

- des anomalies de nombre
- des anomalies de structure équilibrées ou déséquilibrées

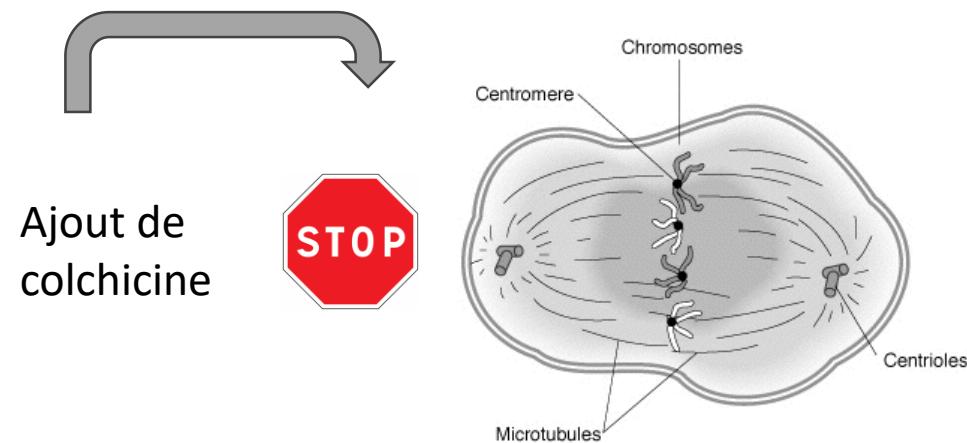
Echelle de résolution : 10-15 Mb

Principe de réalisation du caryotype

- 1/ Prélèvement initial : sang sur tube hépariné (en postnatal, sinon d'autres types de prélèvements sont possibles)
- 2/ Mise en culture des cellules (avec potential prolifératif : lymphocytes +++, monocytes) avec un agent mitogène (ex : la PHA)
- 3/ Blocage des cellules en division au stade metaphase : ajout de colchicine, produit dérivé du colchique, qui bloque la polymérisation de la tubuline et donc la formation du fuseau mitotique



Prolifération des lymphocytes T



Blocage de la division cellulaire au stade métaphase

Principe de réalisation du caryotype

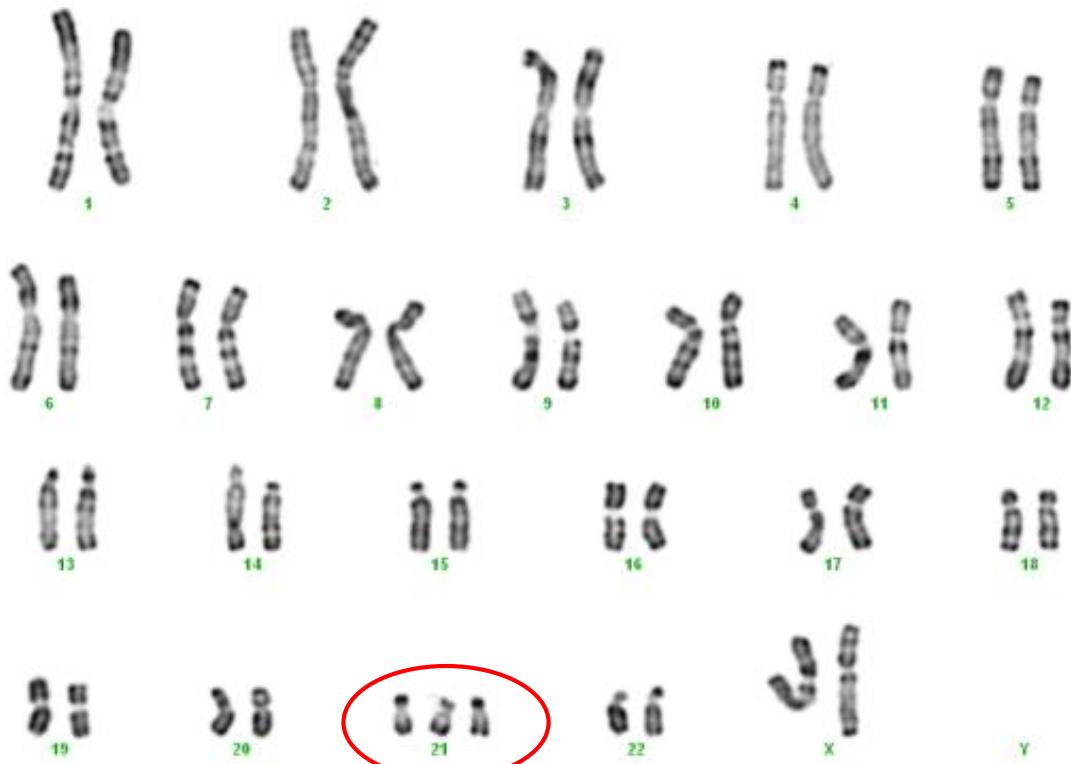
- 4/ Choc hypotonique : fait gonfler les cellules par différence de pression osmotique
- 5/ Fixation des constituants cellulaires (ex acide acétique, méthanol)
- 6/ Etalement sur une lame de verre : la suspension cellulaire est déposée sur la lame, faisant éclater les cellules et libérant les chromosomes
- 7/ Observation des lames en microscopie optique après coloration
- 8/ Classement des chromosomes

Exemple de coloration : bandes G (GTG) obtenues par dénaturation enzymatique ou bandes R (RHG) par dénaturation thermique



Photo d'une mitose avant
classement des chromosomes

Exemple 1



O'Connor, 2008, Nature Education
et <http://www.nichd.nih.gov/>

Patient porteur d'une
trisomie 21
Particularités
morphologiques

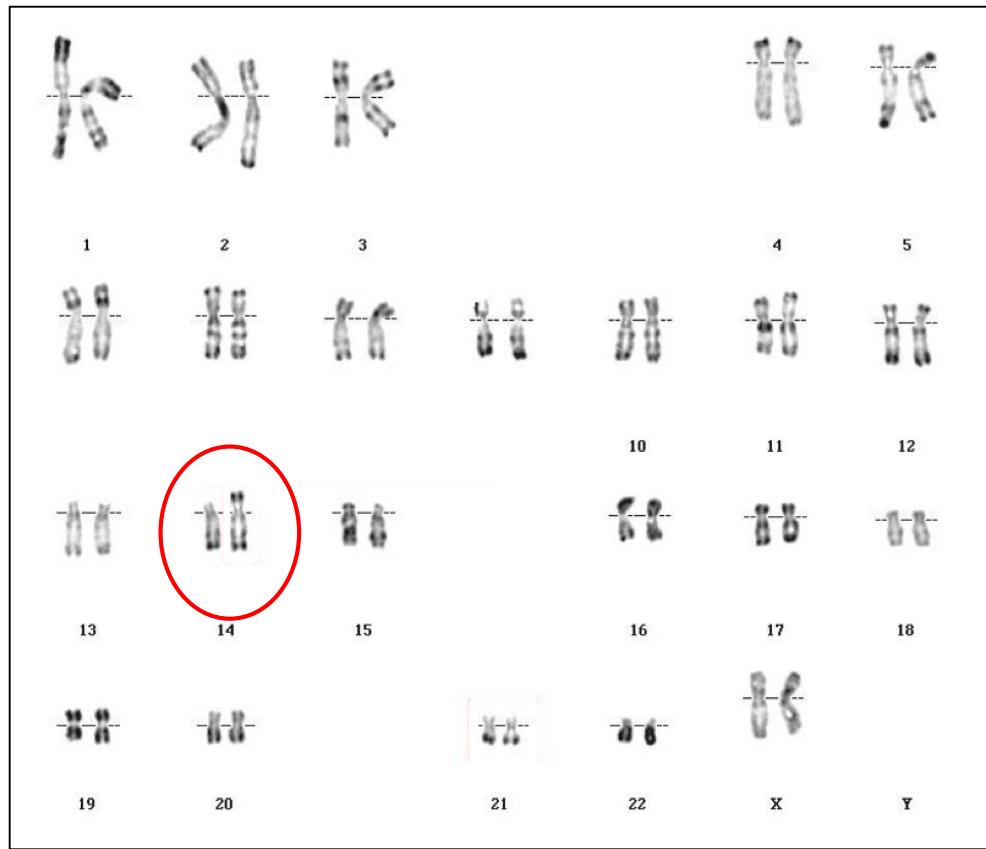
Formule chromosomique : 47,XX,+21
Caryotype montrant une trisomie 21 libre (chromosomes 21 en trois exemplaires)
Risque de récidive : environ 1% selon âge maternel

Exemple 1 bis



Patient porteur d'une trisomie 21
Particularités morphologiques

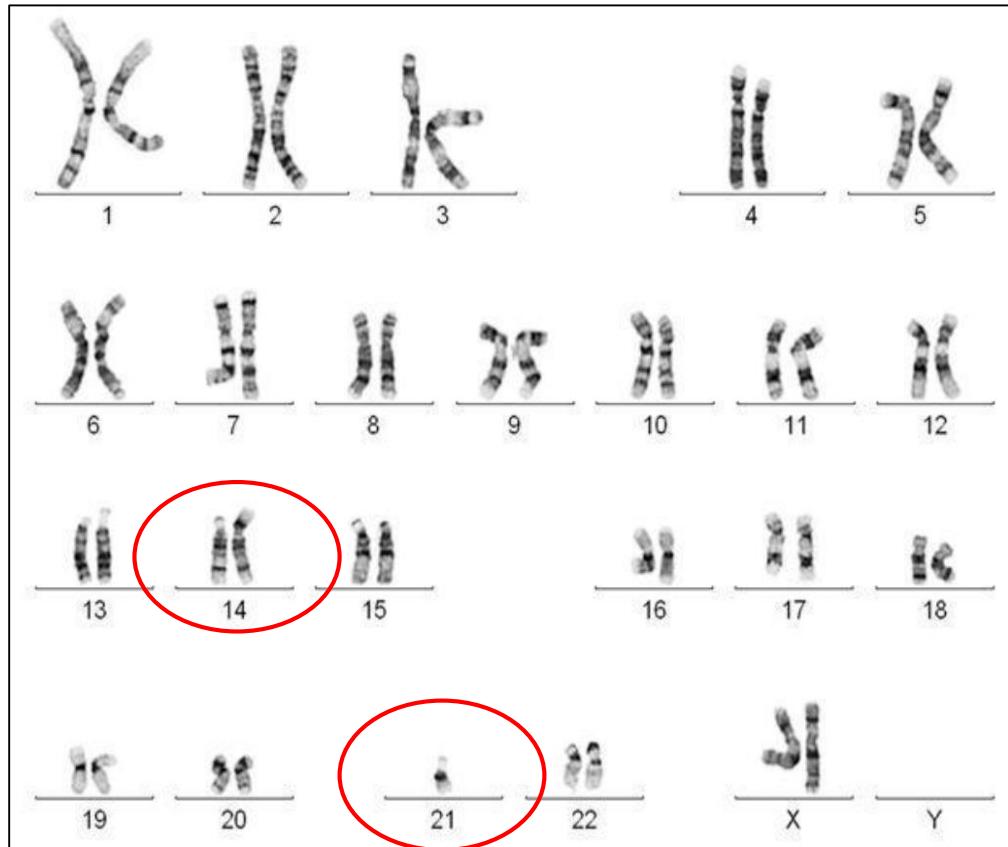
Même phénotype



Formule : 46,XX,der(14;21)

Caryotype montrant une trisomie 21 par translocation 14;21
Dérivé issu de la fusion de deux chromosome acrocentriques
> Le patient possède trois bras longs de chromosomes 21

Exemple 1 bis

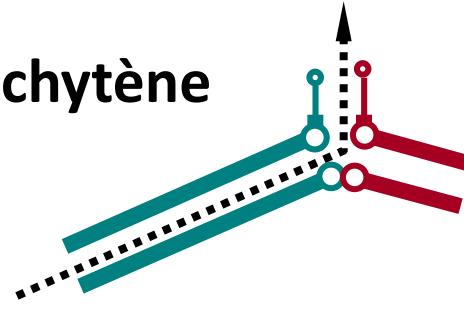


- Caryotype de la maman présentant une translocation robertsonienne 14, 21
- = anomalie de structure caractérisée par la fusion de deux chromosomes acrocentriques
 - Pas de symptômes chez la maman
 - Mauvaise division des chromosomes lors de la méiose
 - Risque élevé de recurrence d'une trisomie 21 : 15%

Exemple 1 bis

Ségrégation
adjacente

pachytène



der(14;21)

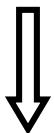
14

21

GAMETES

disomie 21

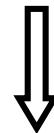
nullosomie 14



ZYGOTES

Trisomie 21

monosomie 14



Récapitulatif Caryotype

Définition :

Représentation ordonnée de **l'ensemble des chromosomes** d'une cellule, classés par paires homologues selon leur taille, la position du centromère et la morphologie.

Technique :

Il est réalisé à partir de **cellules en division** bloquées en métaphase, colorées et observées au microscope.

Anomalies détectables :

- **De nombre** : trisomie 21, monosomie X, etc...
- **De structure** : délétions, duplications, inversions, translocations équilibrées ou non.
- **De grande taille (résolution : 10-15 Mb)**

Les approches moléculaires

SANGER ET NGS

Les approches moléculaires

- Approches **moléculaires** : étude de la **séquence** d'ADN

Séquençage Sanger



Le souvent un gène ou un exon
quelques centaines de paires bases
jusqu'à 10 Kb

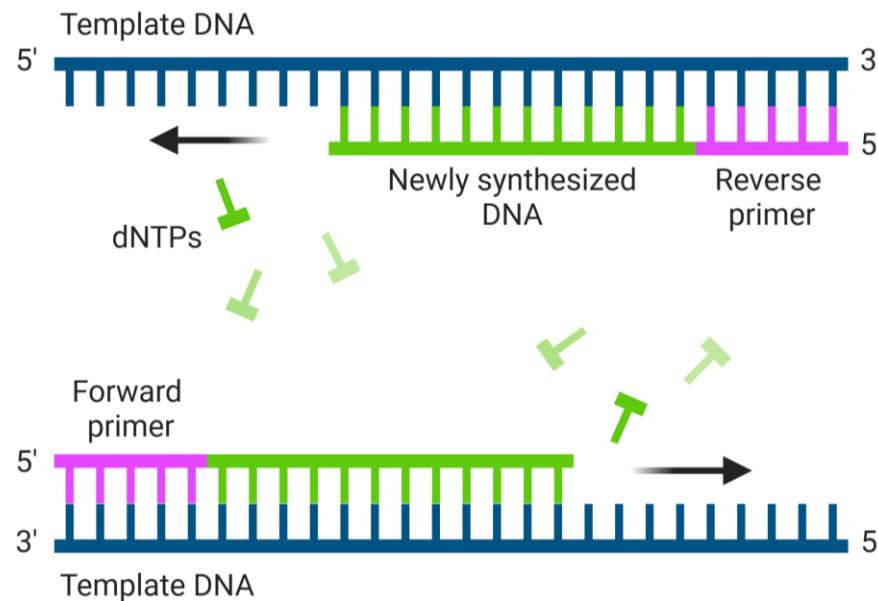
NGS



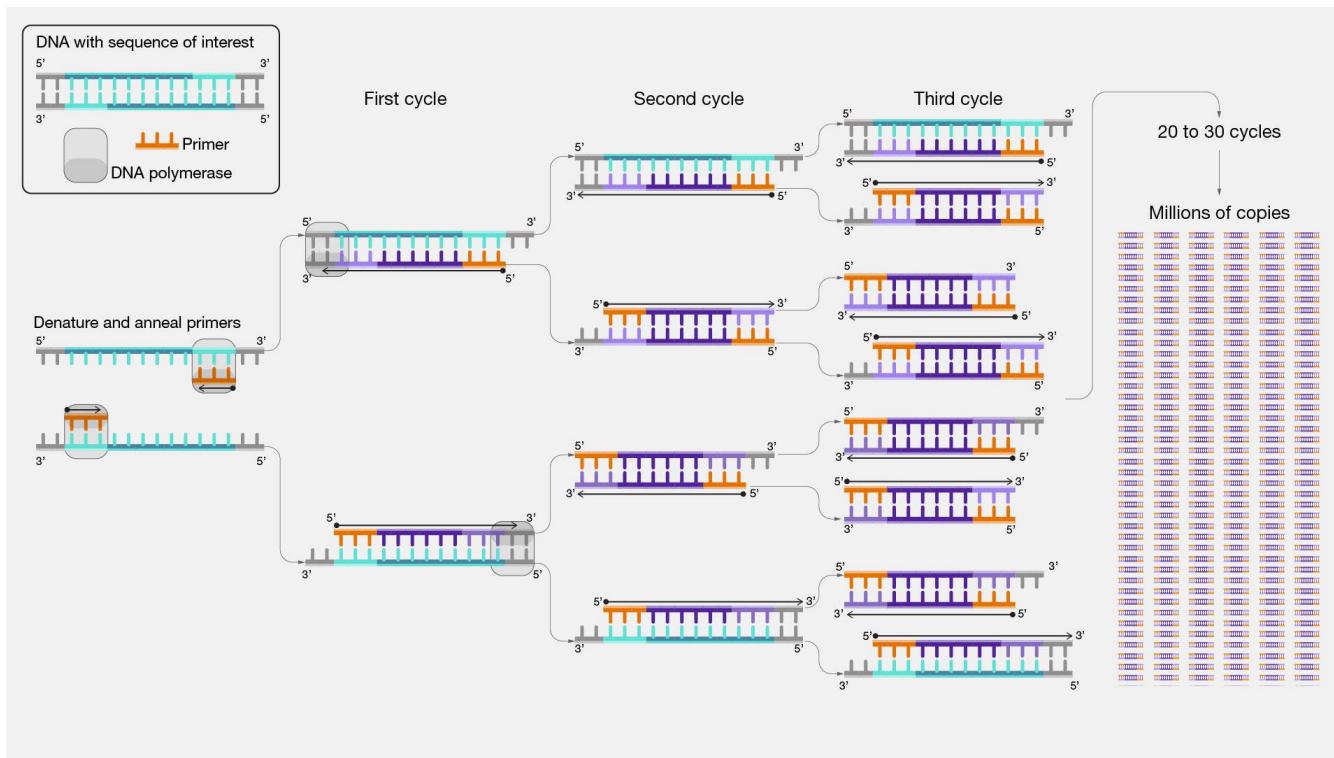
De plusieurs dizaines de gènes à
l'ensemble du génome soit **3.10^9 bases**

Pré-recquis : la PCR

- *Polymérase Chain Reaction*, ou reaction de polymérisation en chaîne : technique de biologie moléculaire qui permet d'obtenir un grand nombre de segments d'ADN identiques (appelés amplicons), le plus souvent < 1000 pb



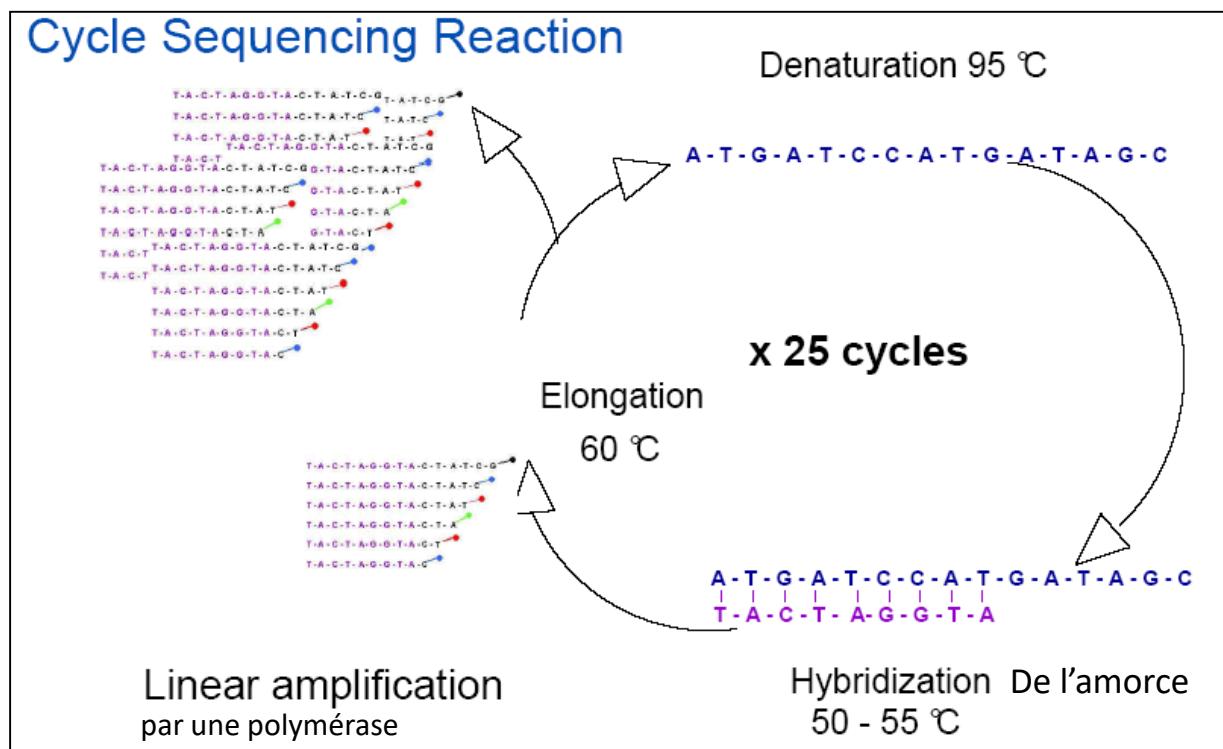
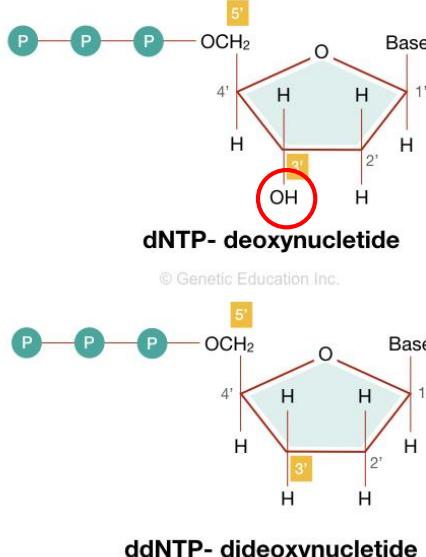
Pré-recquis : la PCR



Le séquençage sanger

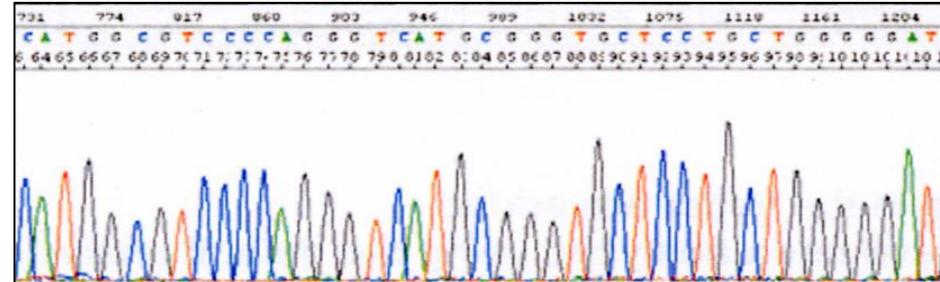
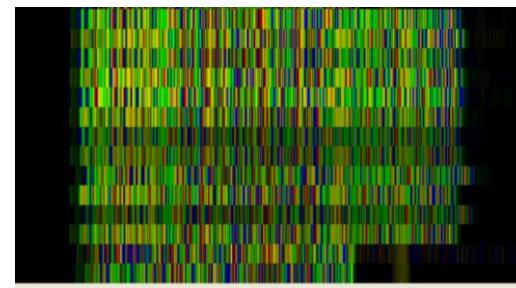
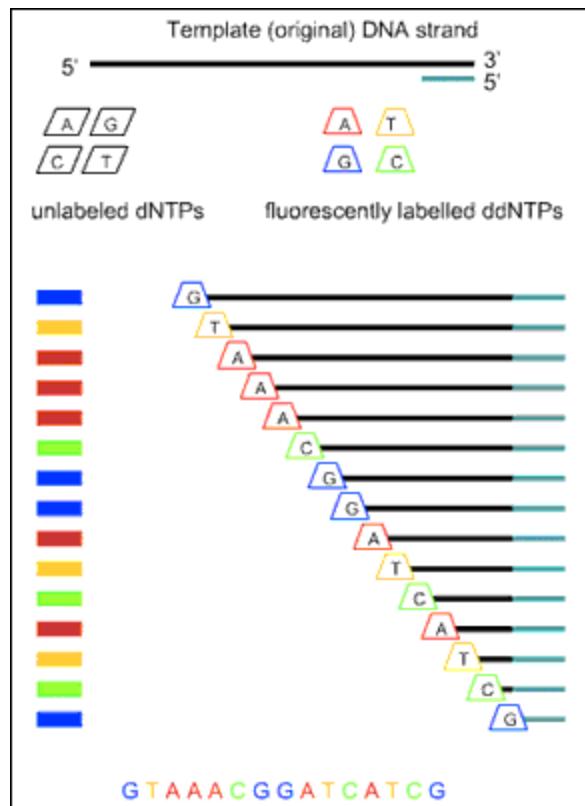
Séquençage par la méthode Sanger

- PCR d'amplification
- Réaction de séquence : 1 seule amorce F ou R, incorporation de dNTP + ddNTP marqués en faible quantité (absence de –OH en C3') qui vont bloquer l'elongation > effet terminateur de chaîne



Séquençage par la méthode Sanger

En fin de réaction, chaque base est marquée



Récapitulatif Sanger

Principe :

Méthode de séquençage par terminaison de chaîne développée.

Elle repose sur l'incorporation aléatoire de didésoxynucléotides (ddNTPs) marqués, qui stoppent l'élongation de l'ADN lors de la synthèse.

Technique :

- Amplification de la région d'intérêt (PCR).
- Mélange d'ADN matrice, d'amorce, de dNTPs et d'une faible proportion de ddNTPs fluorescents.
- Synthèse de fragments d'ADN de longueurs variées, stoppés aux différentes bases.
- Séparation par électrophorèse capillaire et lecture du signal fluorescent.

Anomalies détectables :

- Confirmation de variants nucléotidiques ou indels identifiés par d'autres méthodes
- Étude ciblée de gènes ou d'exons spécifiques



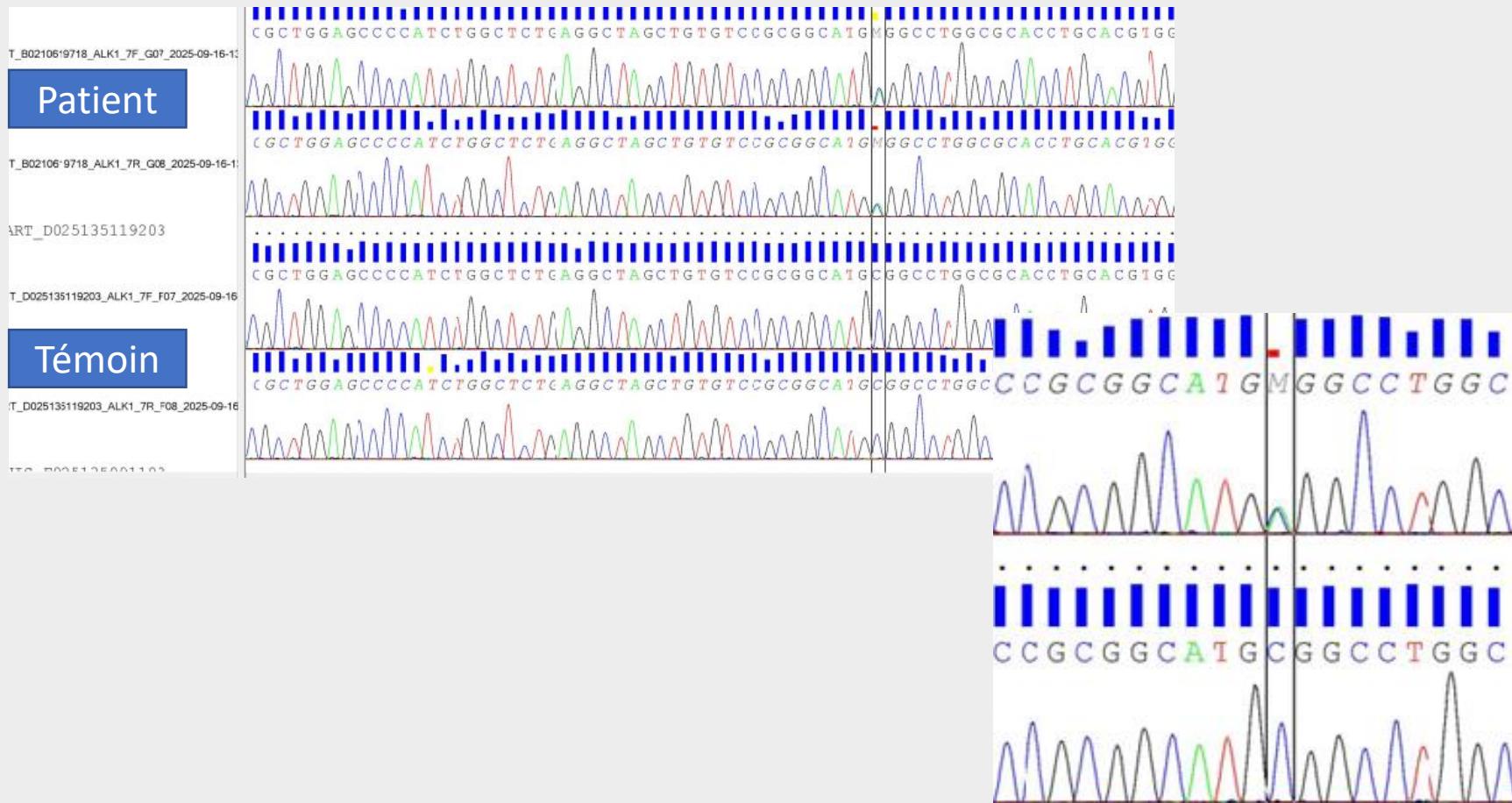
Haute fidélité / précision sur de courtes séquences (≤ 1000 pb)



Faible rendement, coûteux et lent pour de grands gènes ou panels → remplacé par le **NGS** pour les analyses à grande échelle

Exemple 1 : substitution nucléotidique

ACVRL1:c.924C>A, hétérozygote

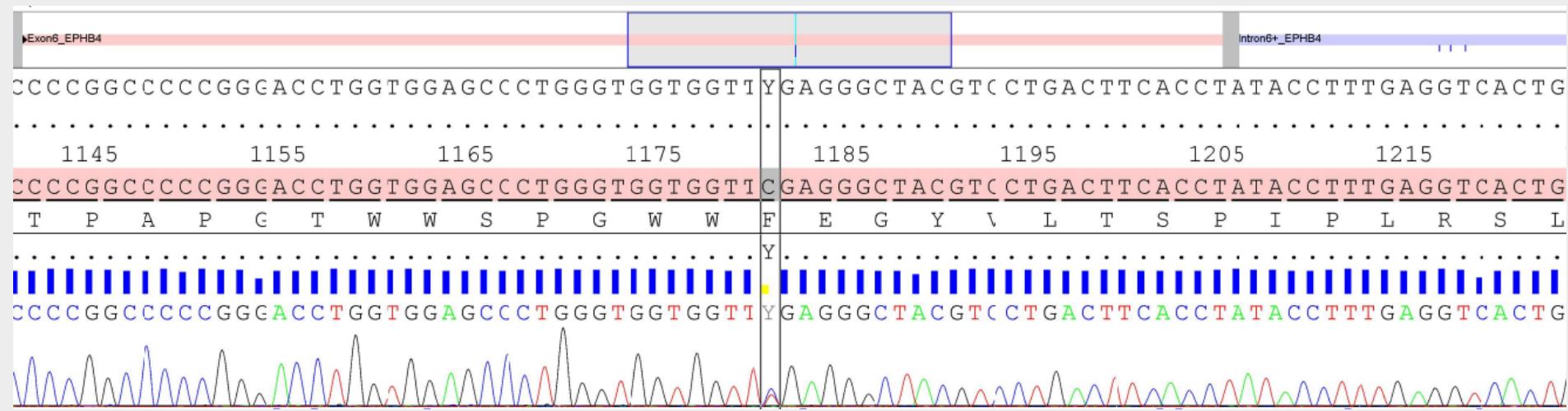


Exemple 2 : substitution nucléotidique



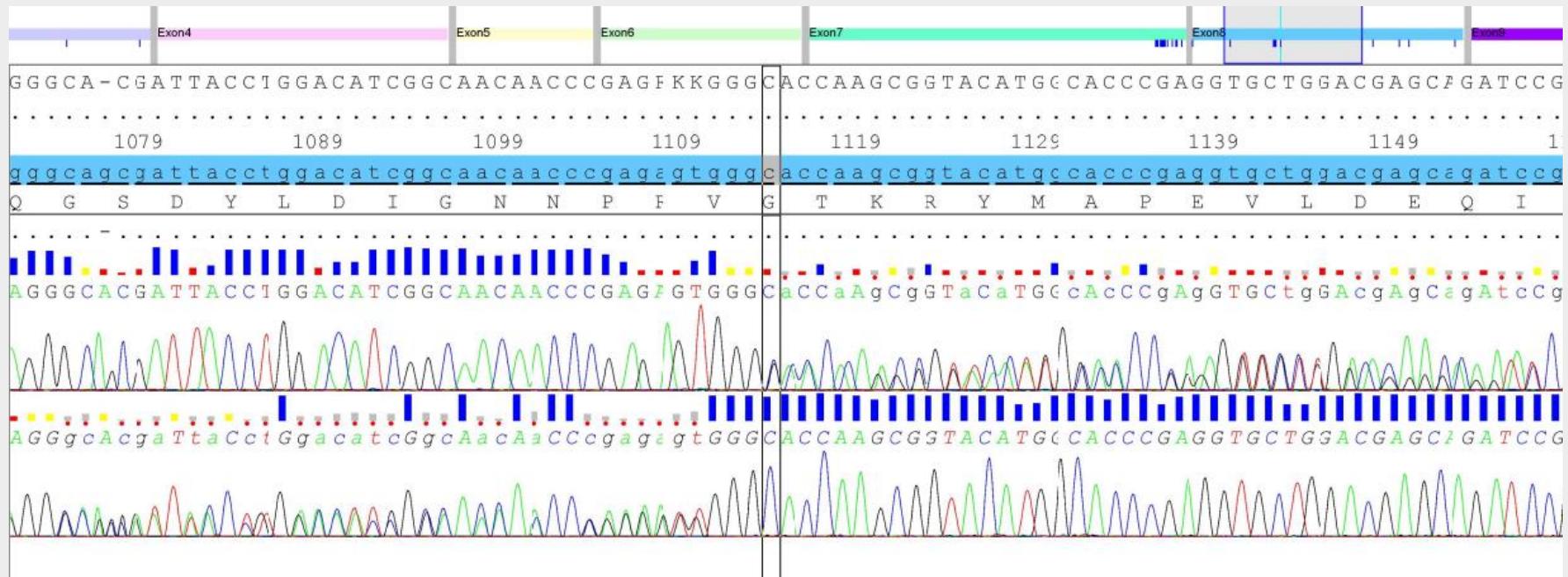
Exemple 2 : substitution nucléotidique

EPHB4: c.1180C>T, hétérozygote



Exemple 2 : duplication d'un nucléotide

- *ACVRL1:c.1112dup*, hétérozygote



Que voyez-vous ?

Le NGS

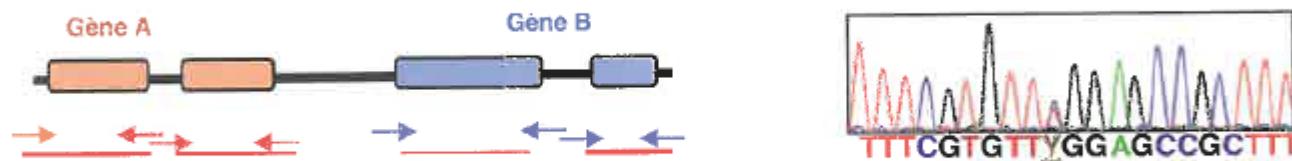
Next generation sequencing

Ou séquençage à haut debit

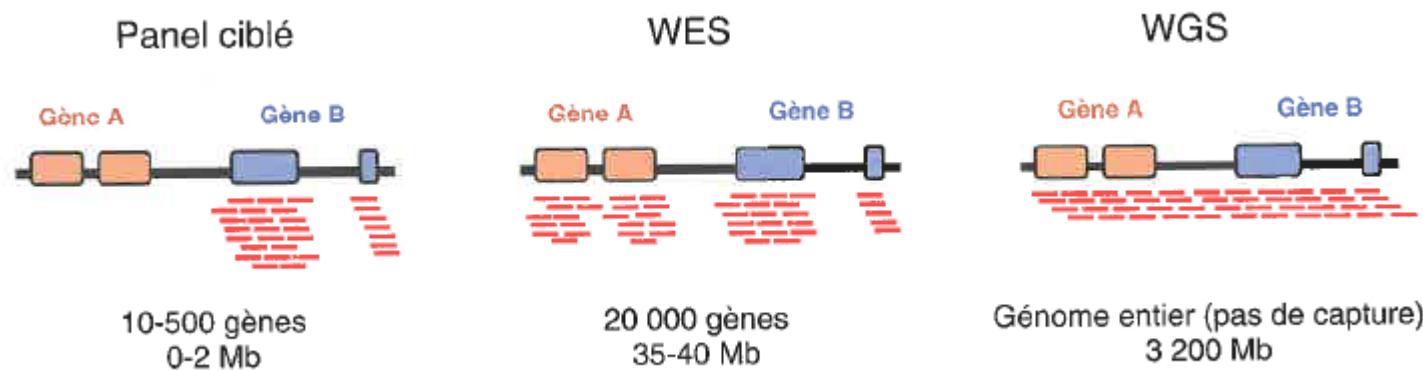
Ou séquençage massif en parallèle

Sanger vs NGS

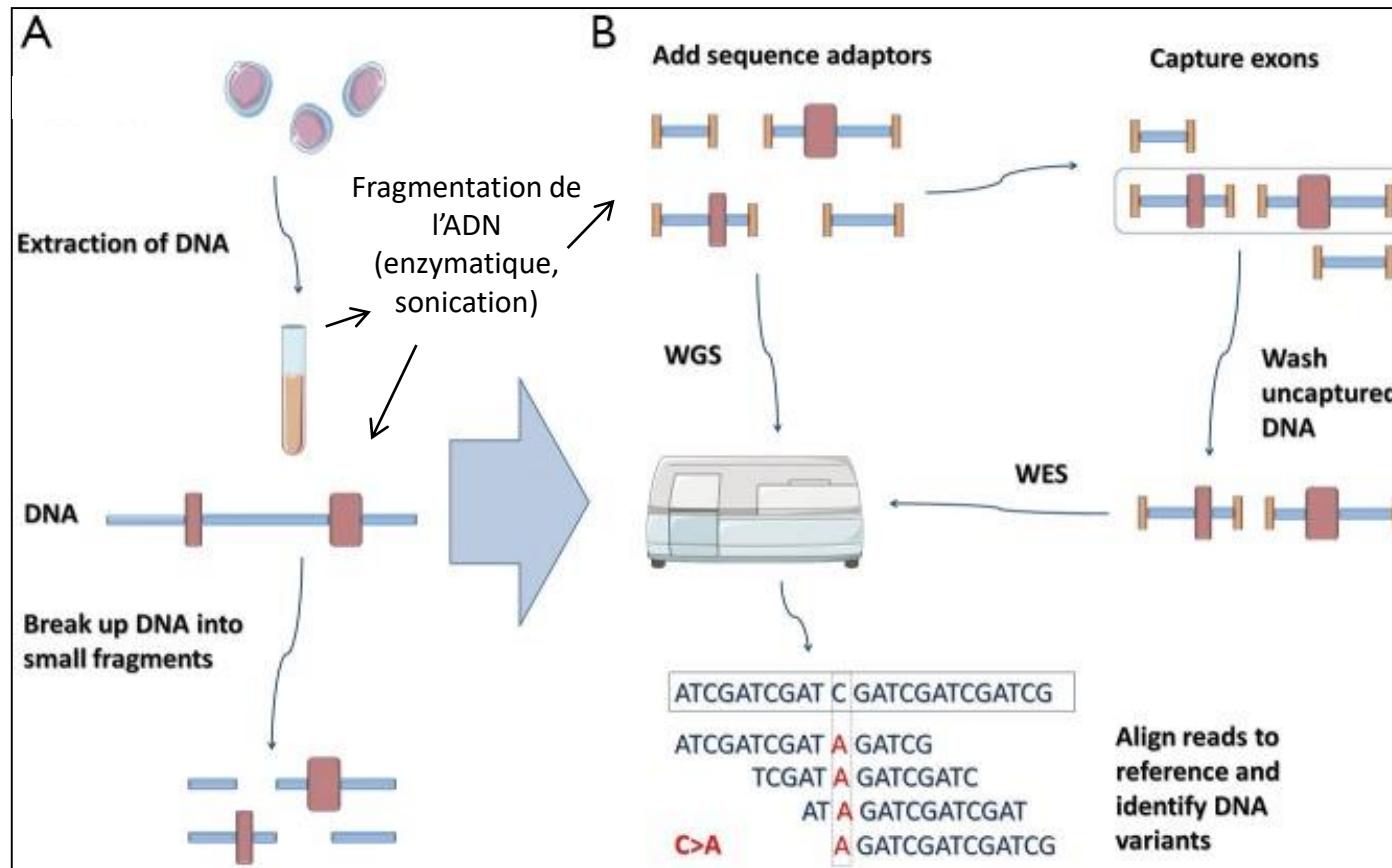
(A) Séquençage Sanger



(B) Séquençage par fragmentation



Capture des régions d'intérêt

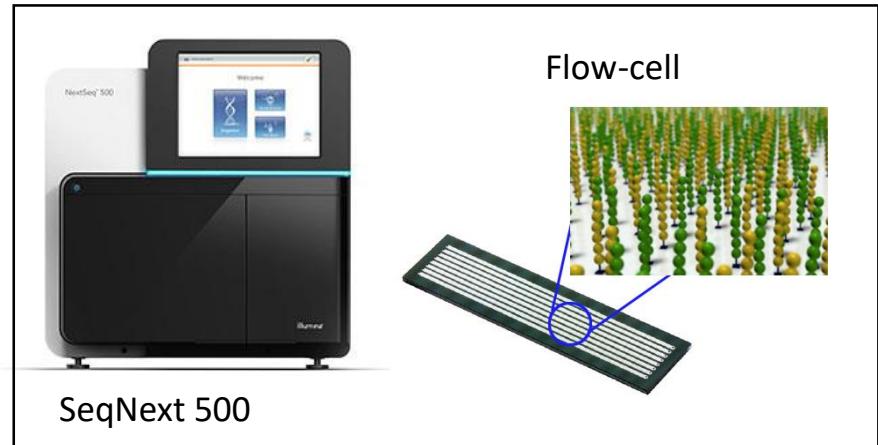


- Multiplexage des échantillons
- Librairie enrichie en régions d'intérêt (panels, exome)
- Pas pour le séquençage du génome

Jiang et al. Ann Transl Med 2014; 2(12): 125

Séquençage

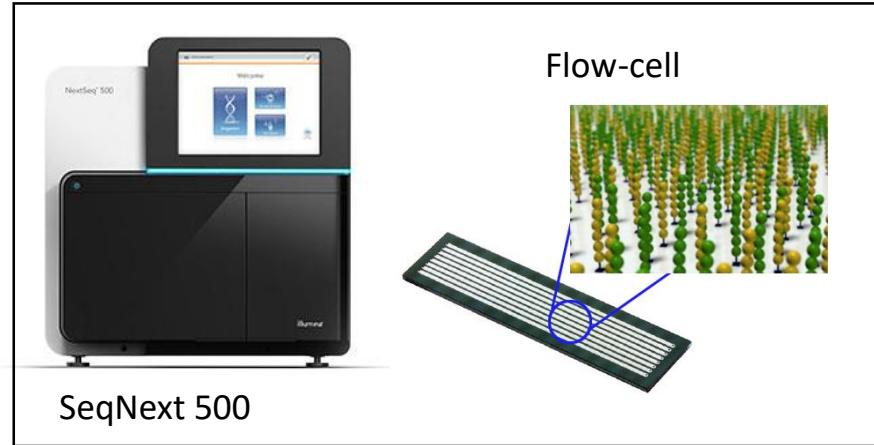
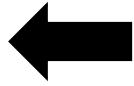
(exemple de la technique Illumina®)



Séquençage

(exemple de la technique Illumina®)

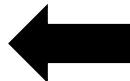
Hybridation de la librairie



Séquençage

(exemple de la technique Illumina®)

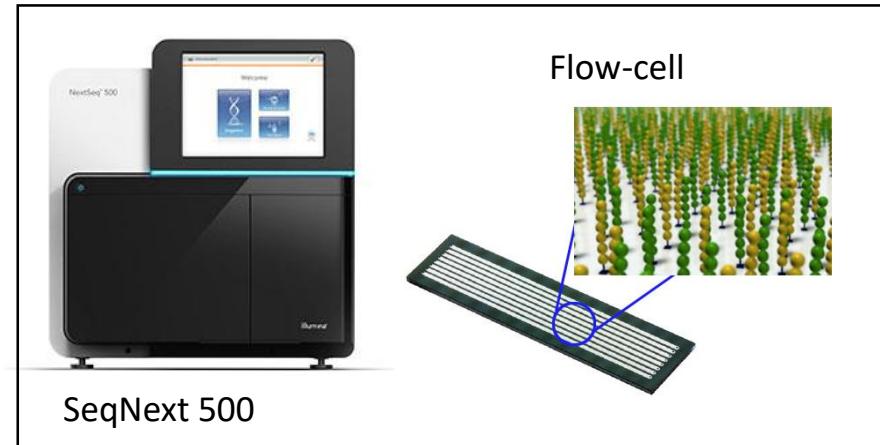
Hybridation de la librairie



Génération de clusters par PCR
(Bridge amplification)



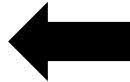
Cluster



Séquençage

(exemple de la technique Illumina®)

Hybridation de la librairie



Flow-cell



SeqNext 500

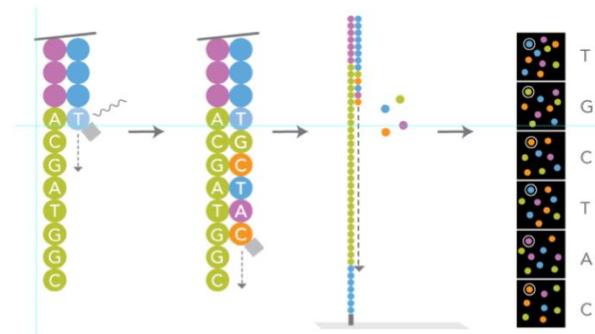
Génération de clusters par PCR
(Bridge amplification)



Cluster



Lavage des brins reverse et séquençage

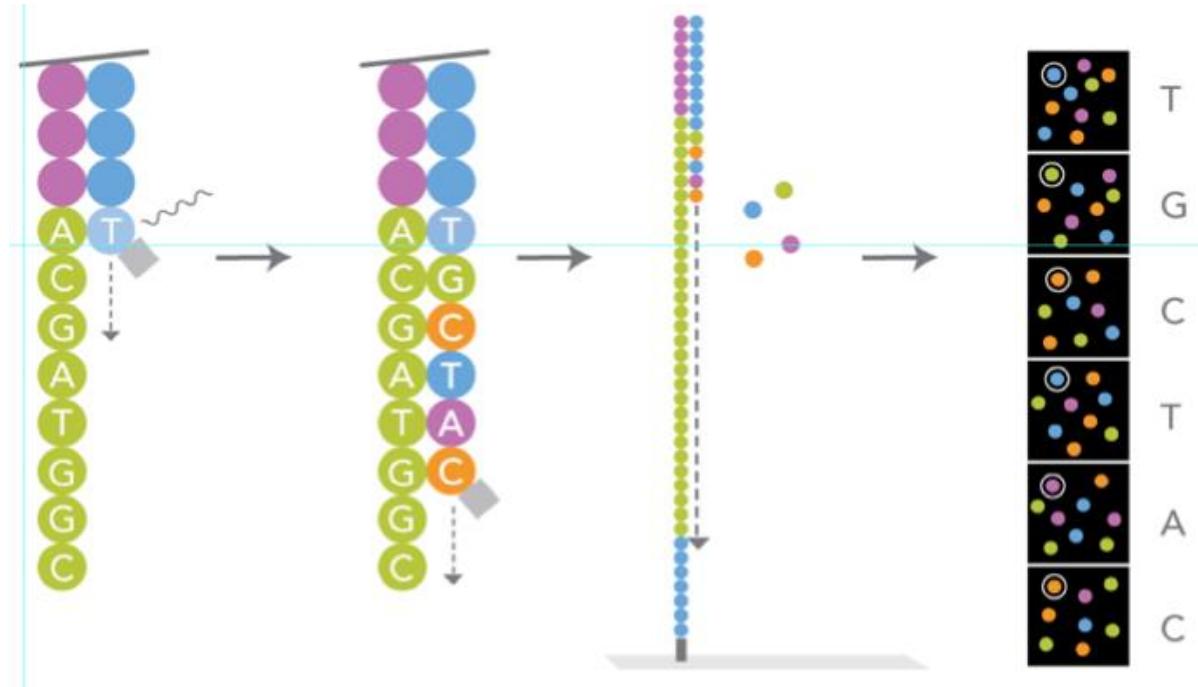


Séquençage

(exemple de la technique Illumina®)

Scan and wash :

- Ajout d'une base bloquante
- Lecture du signal au niveau de millions de clusters
- Excision du groupement fluorescent et bloquant
- Fragments de 75 à 150 bases



Récapitulatif NGS

Principe :

Le NGS permet le séquençage massif en parallèle de millions de fragments d'ADN : il lit **des milliers à des millions de fragments simultanément**

Technique :

1. Préparation de la librairie : fragmentation de l'ADN + ajout d'adaptateurs
2. Amplification clonale
3. Séquençage (par synthèse selon les techniques)
4. Analyse bioinformatique : alignement, appel de variants, annotation.

Résultats

- Selon la stratégie :
 - **Panel ciblé** : gènes d'intérêt dans une pathologie (exemple : gènes responsables de déficits immunitaires)
 - **Exome** : régions codantes du génome (l'ensemble des exons de l'ensemble des gènes)
 - **Génome entier** : toutes les régions (codantes + non codantes)
- Identification de **variants nucléotidiques** (SNV, indels) +/- Variants de structures selon la technique



Très haut débit



Nécessite analyse bioinformatique complexe

Interprétation et rendus des résultats

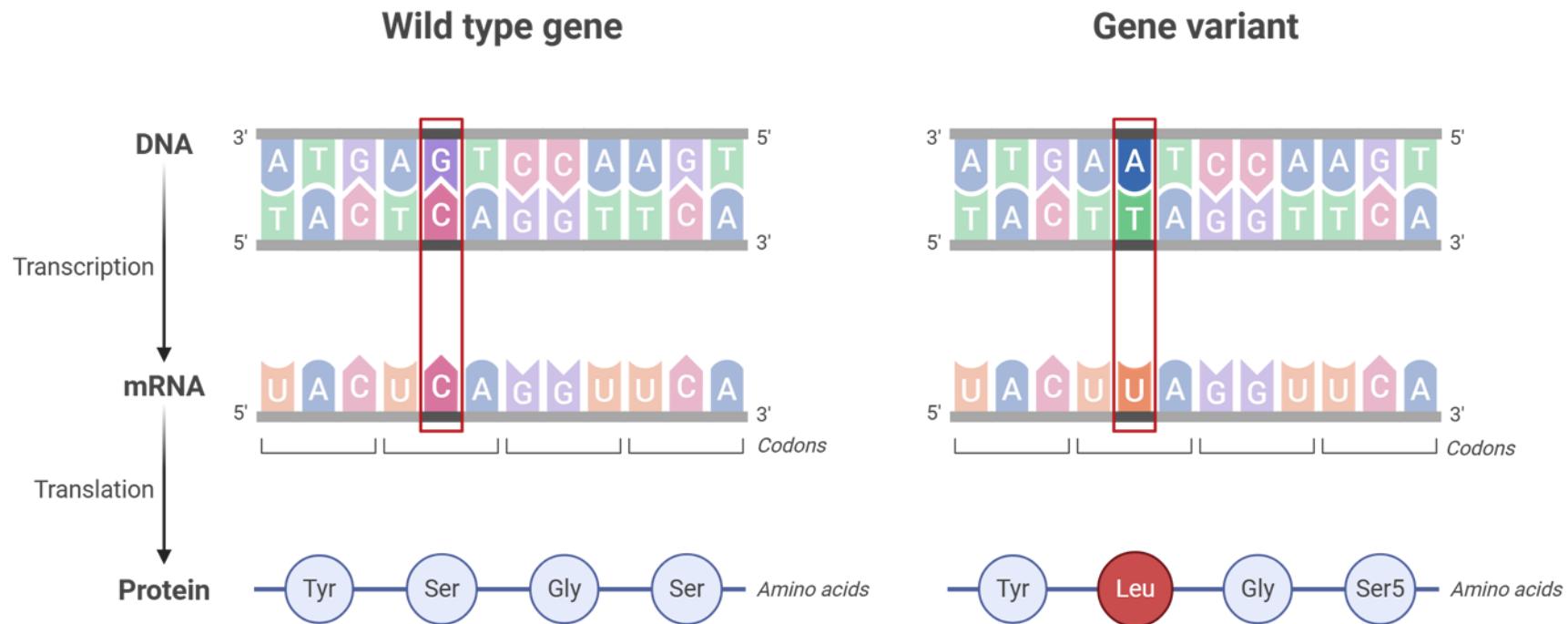
Les différentes approches

NGS				
	Analyse ciblée	Analyse pangénomique		
	SANGER	PANEL	EXOME SEQUENCING	GENOME SEQUENCING
Analyse	1 gène Exon par exon	5-500 gènes	Tous les gènes Seulement régions codantes	Génome entier : gènes avec introns + régions intergéniques
Type de variants détectés	SNV	SNV CNV	SNV CNV (selon technique)	SNV CNV SV Variants introniques



Les types de variants

- **Les SNV (Single Nucleotide Variations)** : variants nucléotidiques (et indels)
 - Substitution nucléotidique : Iso-sémantique, faux-sens, non-sens (codon stop), site d'épissage, régions non codantes : 5'UTR, 3'UTR, intron, promoteur...
 - Indels = insertion, délétion, duplication d'un ou de plusieurs nucléotides



Les types de variants

- **Les SNV (*Single Nucleotide Variations*)** : variants nucléotidiques (et indels)
 - Substitution nucléotidique : Iso-sémantique, faux-sens, non-sens (codon stop), site d'épissage, régions non codantes : 5'UTR, 3'UTR, intron, promoteur...
 - Indels = insertion, délétion, duplication d'un ou de plusieurs nucléotides
- **Les expansions de motifs répétés** : triplets, quadruplets, dodécamères
- **Les CNV (*Copy Number Variations*)** : Duplications ou délétions d'exons ou de gènes entiers
- **Les SV (*Structural Variants*)** : remaniements chromosomiques
 - inversions, translocations équilibrées/déséquilibrées

Combien de variants nucléotidiques rares sur un exome ?

- 40
- 400
- 4000
- 40 000

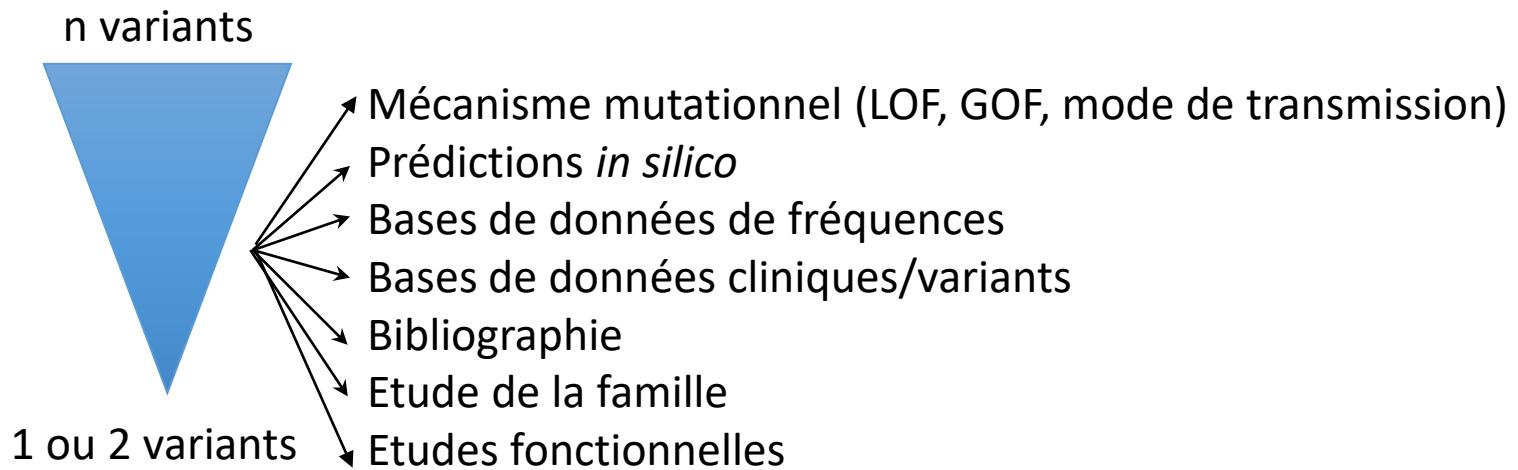
Combien de variants nucléotidiques rares sur un exome ?

- 40
- 400
- 4000
- 40 000

Environ 3000-4000 variants rares (<1%), pour un individu caucasien

Dépend de : database, origine ethnique, qualité des données

Interprétation des variants : outils



Classification des variants

(American College of Medical Genetics, 2015)

- Guide pour l'interprétation des variants génétiques
- Terminologie standardisée
- Uniquement pour les maladies mendéliennes (monogéniques)

Terminology

Mendelian disease variant terminology

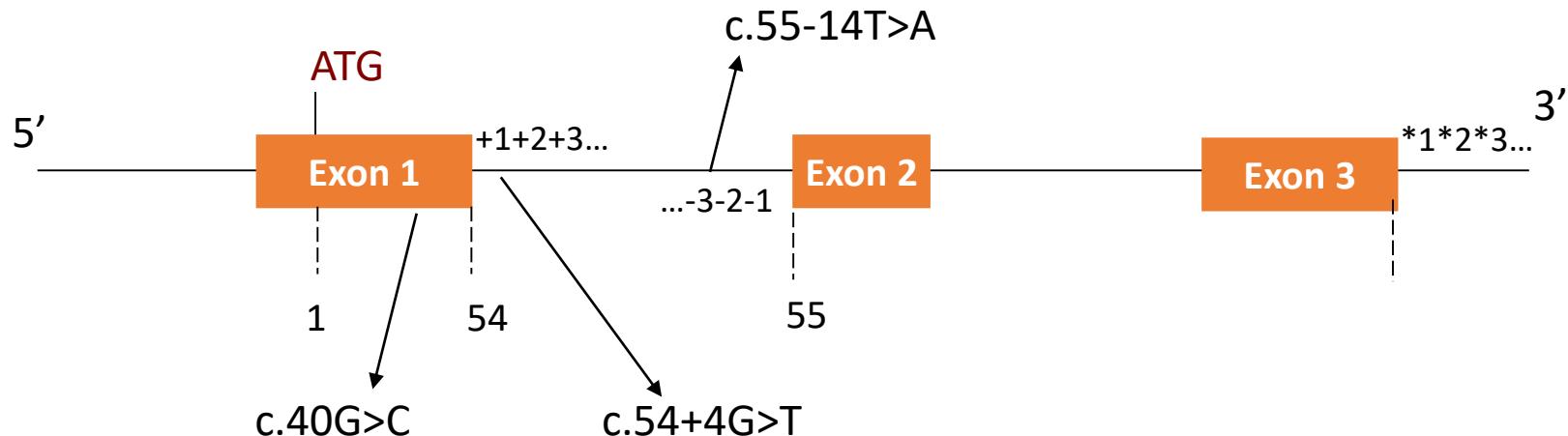
- Pathogenic
- Likely pathogenic ← ($\geq 90\%$ confidence)
- Uncertain significance (VUS)
- Likely benign
- Benign

Nomenclature des variants génétiques

ADN complémentaire (ADNc) :

= simple brin d'ADN artificiellement synthétisé à partir d'un ARNm, qui représente la partie codante de la région du gène ayant été transcrit en cet ARNm.

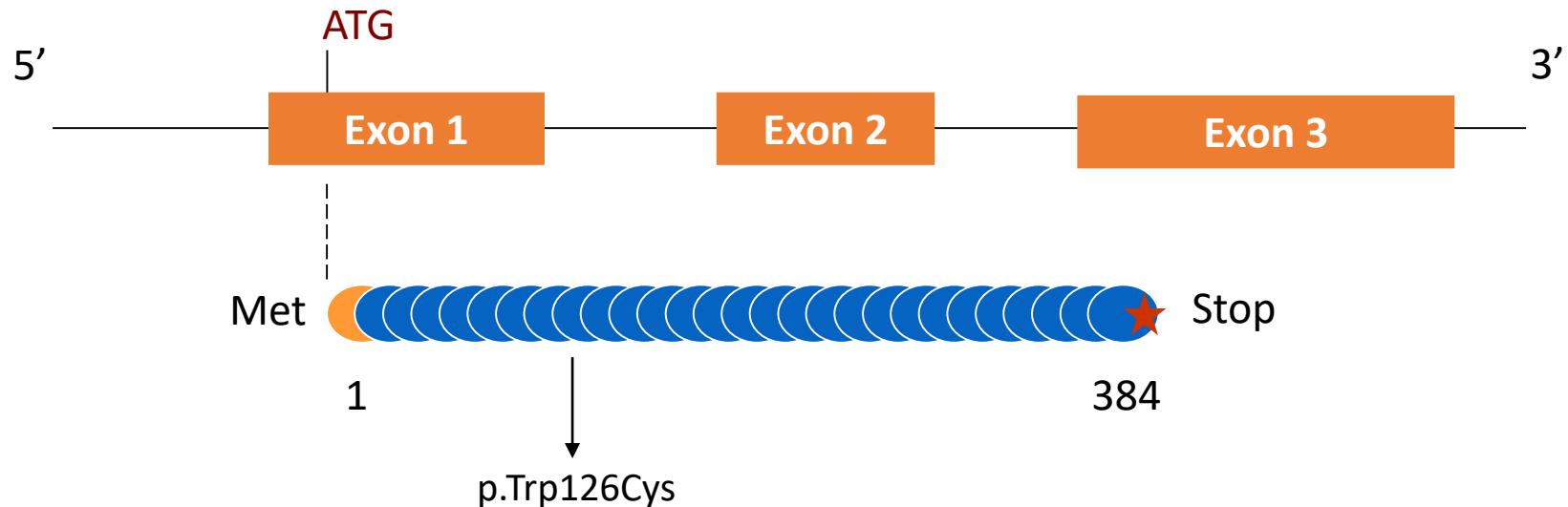
- le n°1 correspond au A du codon d'initiation de la traduction (ATG)
- Puis la numérotation dépend de la transcription et de la traduction



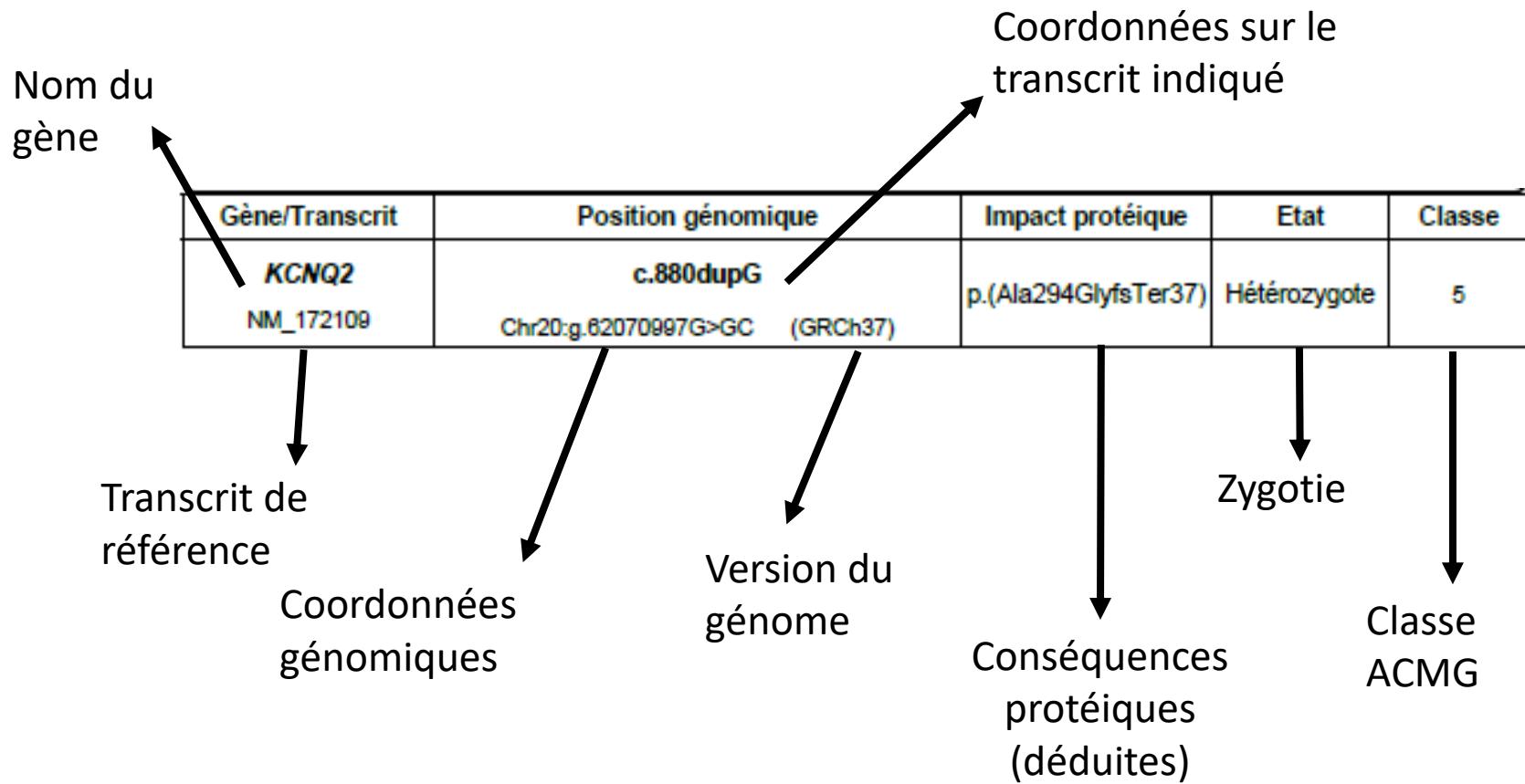
Nomenclature des variants génétiques

Protéine :

- Le n°1 correspond au codon d'initiation de la traduction
- Les conséquences sont le plus souvent déduites



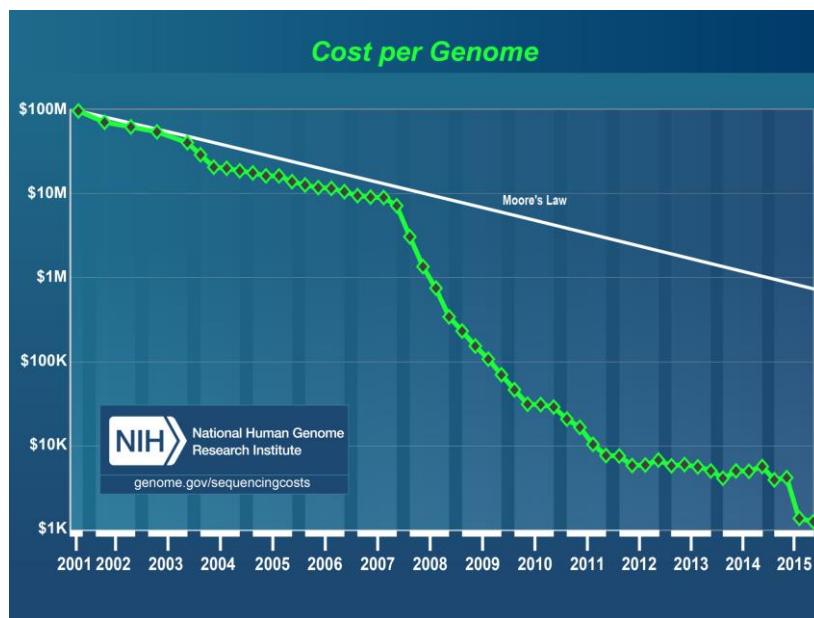
Nomenclature des variants génétiques



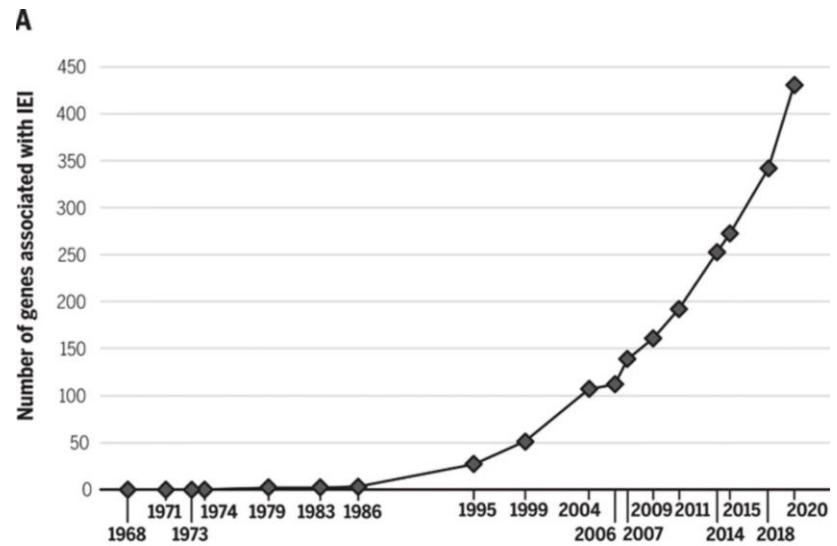
Questions éthiques soulevées par les analyses pangénomiques

Vers l'ère du génome

Prix d'un génome



Nombres de gènes impliqués dans pathologies dysimmunitaires



Notarangelo et al, Science immunology 2020

La diminution du coût facilite la recherche et donc la découverte de nouveaux gènes

Données incidentes / secondaires

- Concerne les études génétiques non ciblées (=pangénomiques)
- Identification de variants sans lien avec la demande initiale (facteurs de prédisposition aux cancers, maladies neurodégénérative de l'adulte ...)

Exemple : un enfant bénéficie d'un exome en trio pour une déficience intellectuelle et on retrouve un variant du gene BRCA1 hérité de sa maman, qui predispose aux cancers du seins

Données incidentes / secondaires

- Concerne les études génétiques non ciblées (=pangénomiques)
- Identification de variants **sans lien avec la demande initiale** (facteurs de prédisposition aux cancers, maladies neurodégénérative de l'adulte, etc ...)

Exemple 1: un enfant bénéficie d'un génome en trio pour une déficience intellectuelle et on retrouve un variant du gene BRCA1 hérité de sa maman, qui predispose aux cancers du seins

Exemple 2: on retrouve sur ce même génome une expansion de triplet dont l'interpretation est difficile dans un gene impliqué dans une maladie neurodégénérative qui débute à l'âge adulte, et pour laquelle il n'existe pas de traitement préventif ou curatif

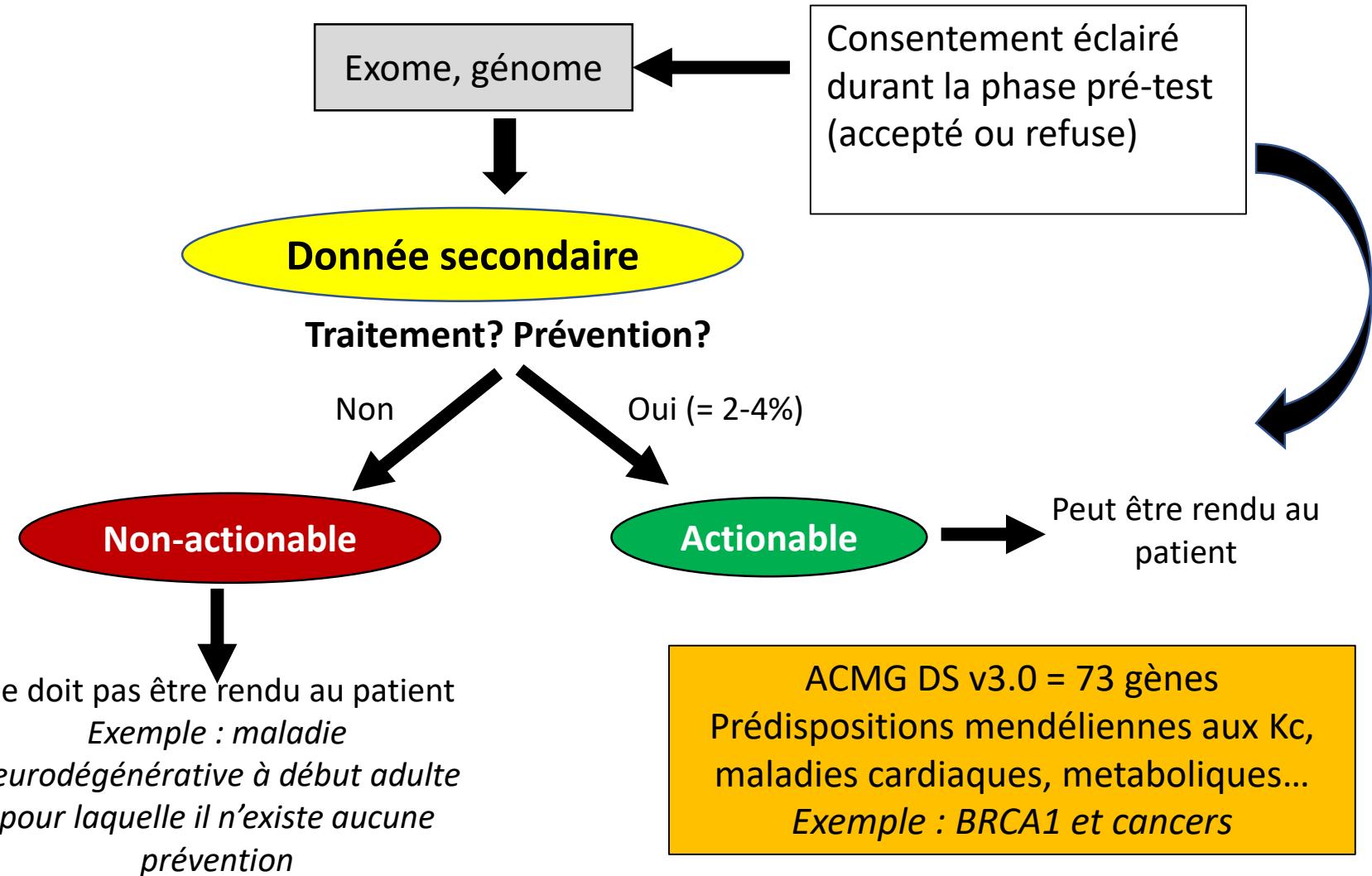
- Donnée incidente = non recherchée activement

Exemple : En lisant le génome d'un patient, on "tombe" sur une mutation heterozygote responsable de la mucoviscidose

- Donnée secondaire = recherchée activement dans une liste de genes dits "actionables"

Non fait en France

Données incidentes / secondaires



Etude Babyseq

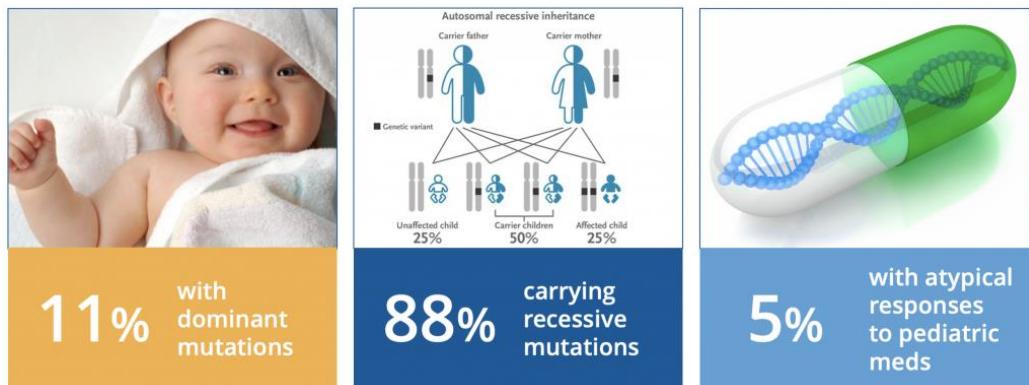
ARTICLE

Interpretation of Genomic Sequencing Results in Healthy and Ill Newborns: Results from the BabySeq Project

Ozge Ceyhan-Birsoy,^{1,2} Jaclyn B. Murry,^{2,4} Kalotina Machini,^{2,4} Matthew S. Lebo,^{2,3,4,11}
Timothy W. Yu,^{4,5,6} Shawn Fayer,⁷ Casie A. Genetti,⁵ Talia S. Schwartz,⁵ Pankaj B. Agrawal,^{4,5,8}
Richard B. Parad,^{4,9} Ingrid A. Holm,^{4,5} Amy L. McGuire,¹⁰ Robert C. Green,^{4,7,11} Heidi L. Rehm,^{2,3,4,11,12}
Alan H. Beggs,^{4,5,*} and The BabySeq Project Team

n=159 bébés inclus dans le bras
génome
127 « well baby »
32 ICU

Newborn genomic sequencing may reveal...



- Maladie génétique de début pédiatrique (9,4%) ou impliquant un gène actionnable d'une maladie de l'adulte (3,5%)
- Diagnostic moléculaire pour 18 enfants sur 159

Babyseq

- La majorité des résultats trouvés concernent la famille et pas seulement le nouveau-né
- Exemple : 3 mutations de predisposition aux cancers (sur 18)

16	ICU admission for respiratory distress (F)	<i>MSH2</i> , c.1637_1638insA (p.Asn547Glufs*4) (GenBank: NM_000251.2)	P (Mat)	Lynch syndrome, AD	no, predicts risk of future disease	yes, known prior to infant sequencing	specialist consultation in future [oncology]	mother: specialist consultation [oncology]	44.7	not applicable	not applicable	ongoing surveillance	mother underwent prophylactic risk-reducing surgery and undergoing ongoing surveillance
9	ICU admission for hypoplastic left heart syndrome (M)	<i>BRCA2</i> , c.3545_3546del (p.Phe1182*) (GenBank: NM_000059.3)	P (Mat)	hereditary breast and ovarian cancer syndrome, AD	no, predicts risk of future disease	yes, recognized after infant sequencing	(passed away from complications of primary presenting disease)	mother: specialist consultation [oncology]	N/A	not applicable	not applicable	ongoing surveillance	mother underwent prophylactic risk-reducing surgery and undergoing ongoing surveillance
10	well baby (M)	<i>BRCA2</i> , c.8297delC (p.Thr2766Asnfs*11) (GenBank: NM_000059.3)	P (Mat)	hereditary breast and ovarian cancer syndrome, AD	no, predicts risk of future disease	yes, known prior to infant sequencing	specialist consultation in future [oncology]	mother: specialist consultation [oncology, was previously followed because of family history]	60.6	not applicable	not applicable	ongoing surveillance	mother underwent prophylactic risk-reducing surgery and undergoing ongoing surveillance



Perspectives of Rare Disease Experts on Newborn Genome Sequencing

Nina B. Gold, MD; Sophia M. Adelson, BA; Nidhi Shah, MD; Shardae Williams, MEd; Sarah L. Bick, MD; Emilie S. Zoltick, ScD, MPH; Jessica I. Gold, MD, PhD; Alanna Strong, MD, PhD; Rebecca Ganetzky, MD; Amy E. Roberts, MD; Melissa Walker, MD, PhD; Alexander M. Holtz, MD, PhD; Vijay G. Sankaran, MD, PhD; Ottavia Delmonte, MD, PhD; Weizhen Tan, MD; Ingrid A. Holm, MD, MPH; Jay R. Thiagarajah, MD, PhD; Junne Kamihara, MD, PhD; Jason Comander, MD, PhD; Emily Place, MS, CGC; Janey Wiggs, MD, PhD; Robert C. Green, MD, MPH

Enquête récente de plus de 200 experts de maladies rares

- 87,9% pensent que le NBSeq pour les maladies monogéniques qui se traitent devrait être proposé pour tous les NN
- 58,9% pensent que ce test devrait inclure les maladies avec penetrance faible
- 37,2% pensent que ce NBSeq devrait inclure un screening pour les maladies pour lesquelles il n'y a ni traitement ni prise en charge établie

Génétique et business

The leading health and ancestry DNA service [sign in](#) [register kit](#) 

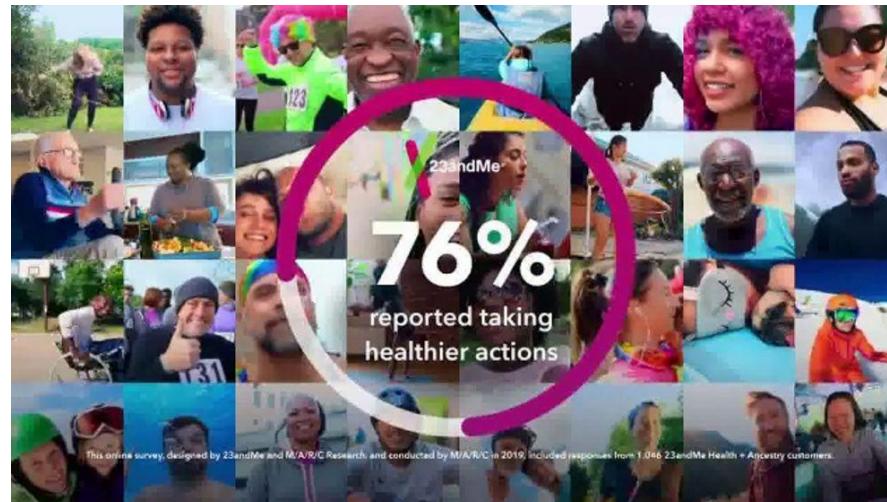
welcome [health](#) [ancestry](#) [how it works](#) [buy](#) help

Get to know you. Health and ancestry start here.



- Reports on 240+ health conditions and traits
- Discover your lineage, find relatives and more
- Get updates on your DNA as science advances

[order now](#) **\$99**



Génétique et business



MON QUOTIDIEN | EXERCER MES DROITS | À TÉLÉCHARGER | LA CNIL |

< Tests génétiques à usage récréatif : pourquoi et comment demander l'effacement de vos données auprès de la société 23andMe ?

Tests génétiques à usage récréatif : pourquoi et comment demander l'effacement de vos données auprès de la société 23andMe ?

28 mars 2025

Vous avez effectué un test génétique récréatif via 23andMe, désormais en redressement judiciaire ? Découvrez comment demander la suppression de vos données personnelles.

Une pratique très encadrée

Aujourd'hui, en France, les tests génétiques ne peuvent être réalisés que dans le cadre d'une enquête judiciaire, pour la prise en charge médicale ou à des fins de recherche. Sauf dans ces cas très particuliers, le consentement de la personne doit être recueilli.

De nombreux textes (code civil, code de la santé publique, code pénal, etc.) encadrent très strictement la réalisation des analyses génétiques et interdisent en France la réalisation de tests génétiques « récréatifs », même avec le consentement de la personne concernée.

L'achat d'un test génétique sur Internet par des personnes résidant en France est ainsi possible de 3 750 € d'amende. De même, la réalisation d'un test génétique en dehors des domaines médical et scientifique est interdite et possible de 15 000 € d'amende et d'un an de prison pour les personnes ou entreprises proposant ces tests.

- Des questions ?
- Maud.Tusseau@chu-lyon.fr