# L1- Sciences pour la Santé
# UE Bases en Sciences de la Vie
# -
# Génétique
## Techniques NGS et cytogénétique : introduction aux techniques

Dr Maud TUSSEAU

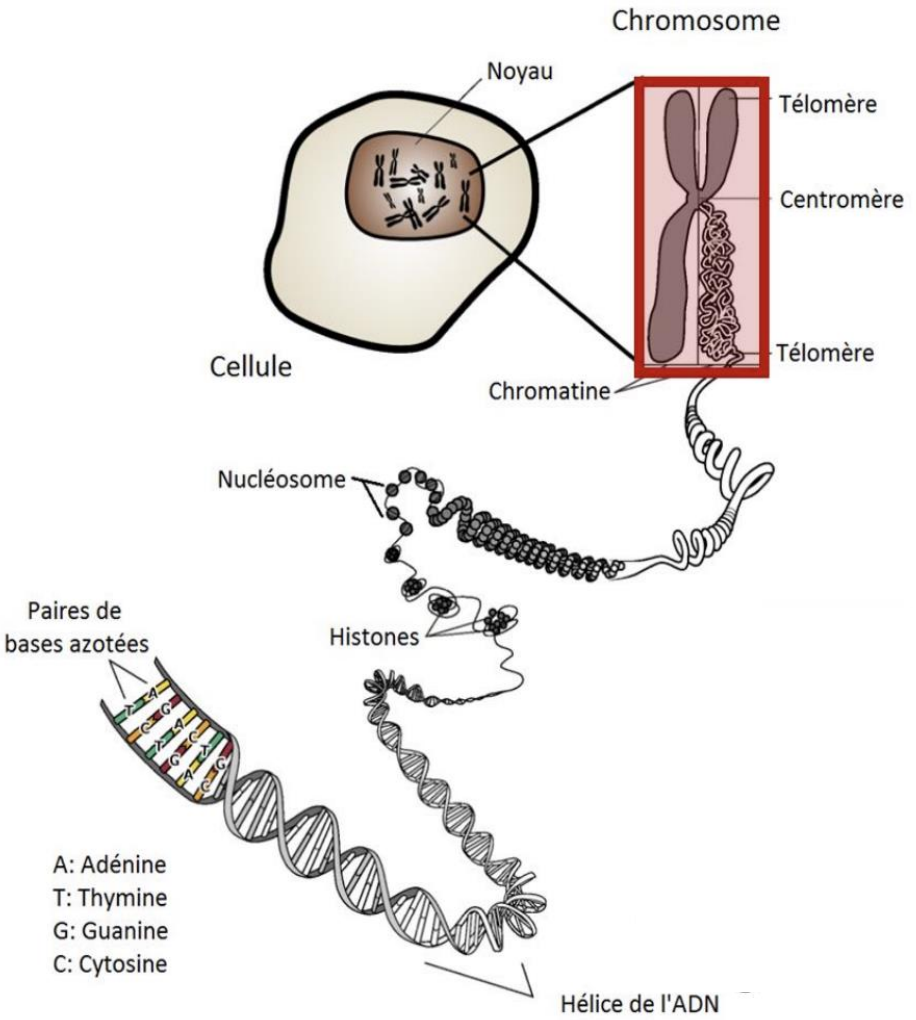
Service de génétique médicale

06/11/2026

# 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



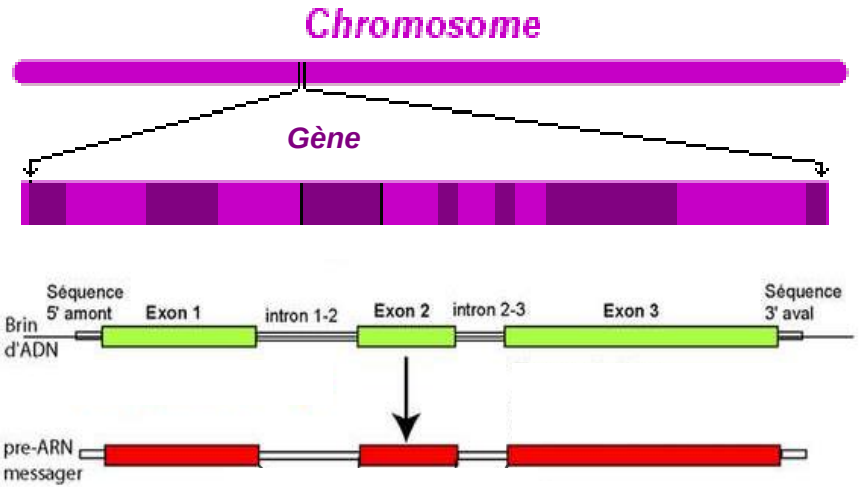




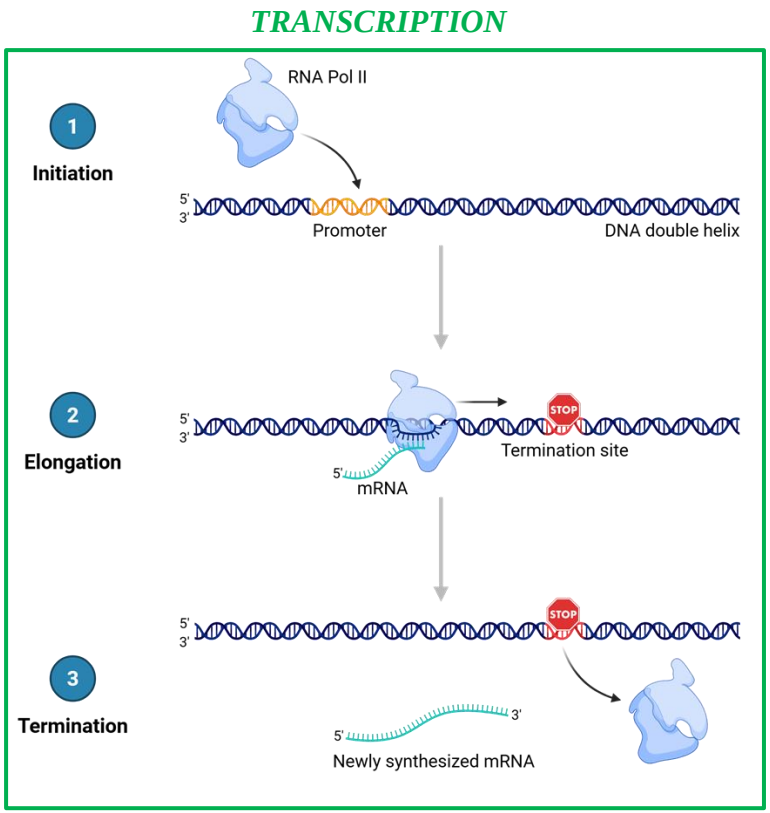

Le génome humain = 3 milliards de paires de bases – environ 20 000 gènes

# De l'ADN à la protéine

**ADN**




**ARN**

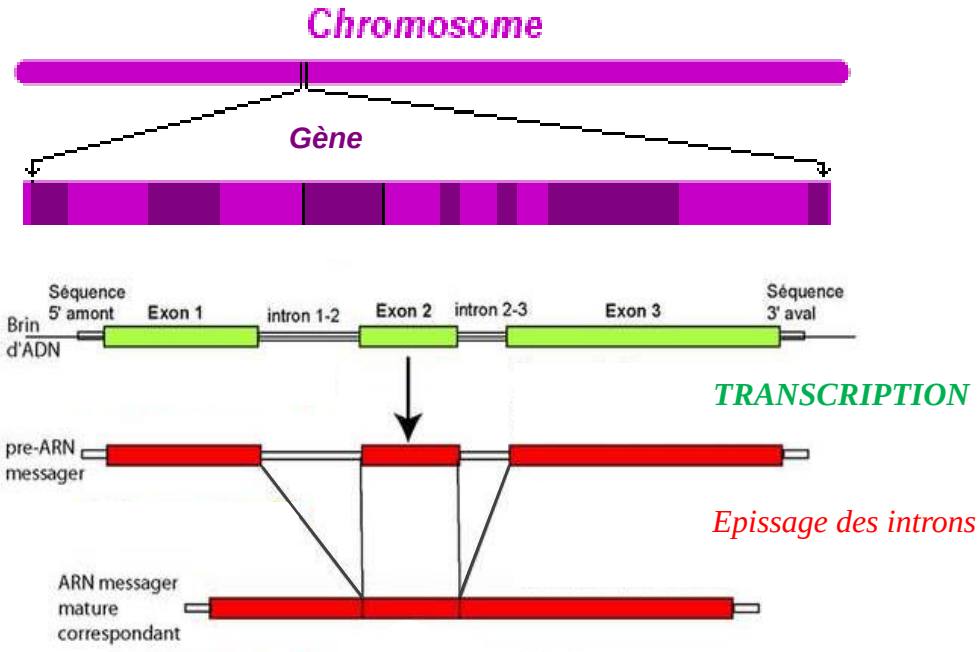



*Modifié à partir de http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/evolution/evol/traits_2.html*

# De l'ADN à la protéine

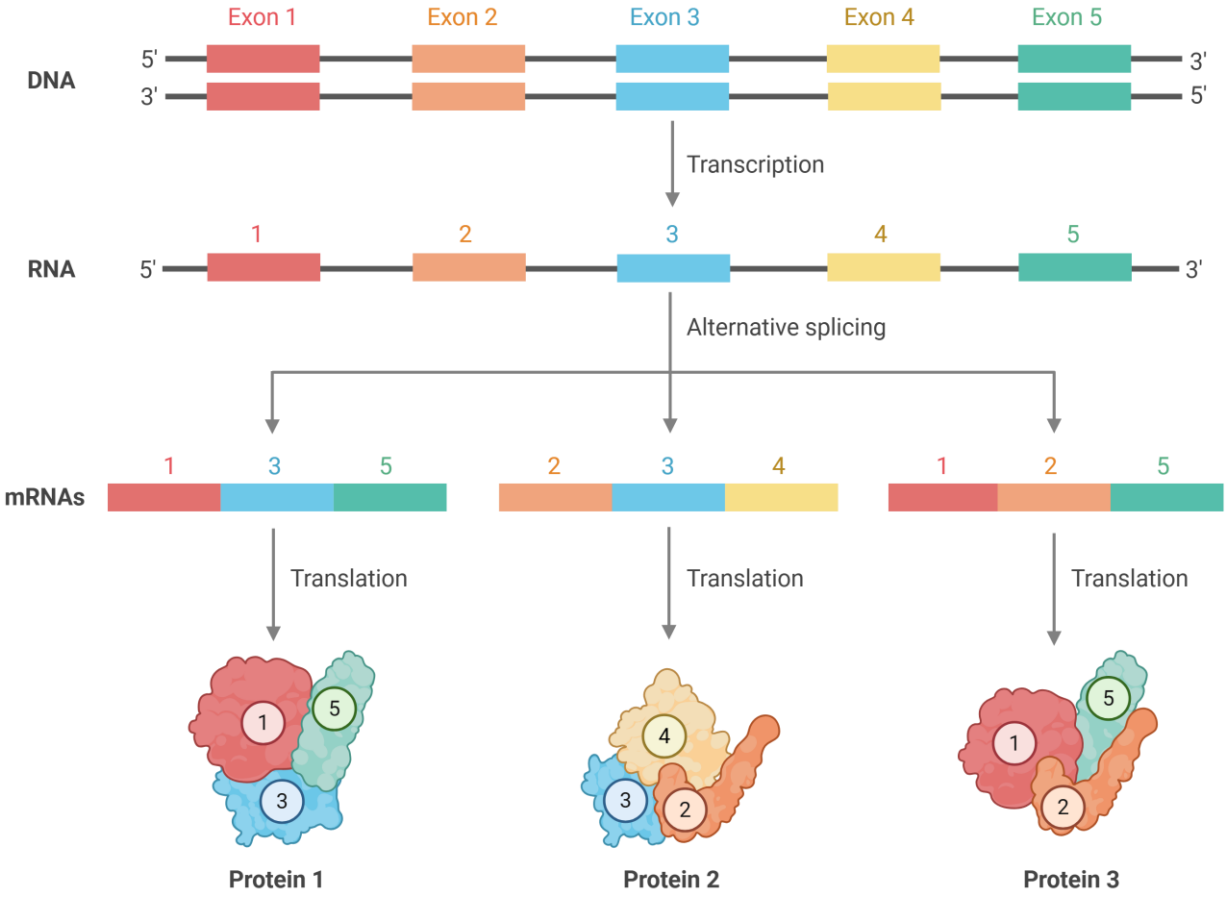
**ADN**

**ARN**

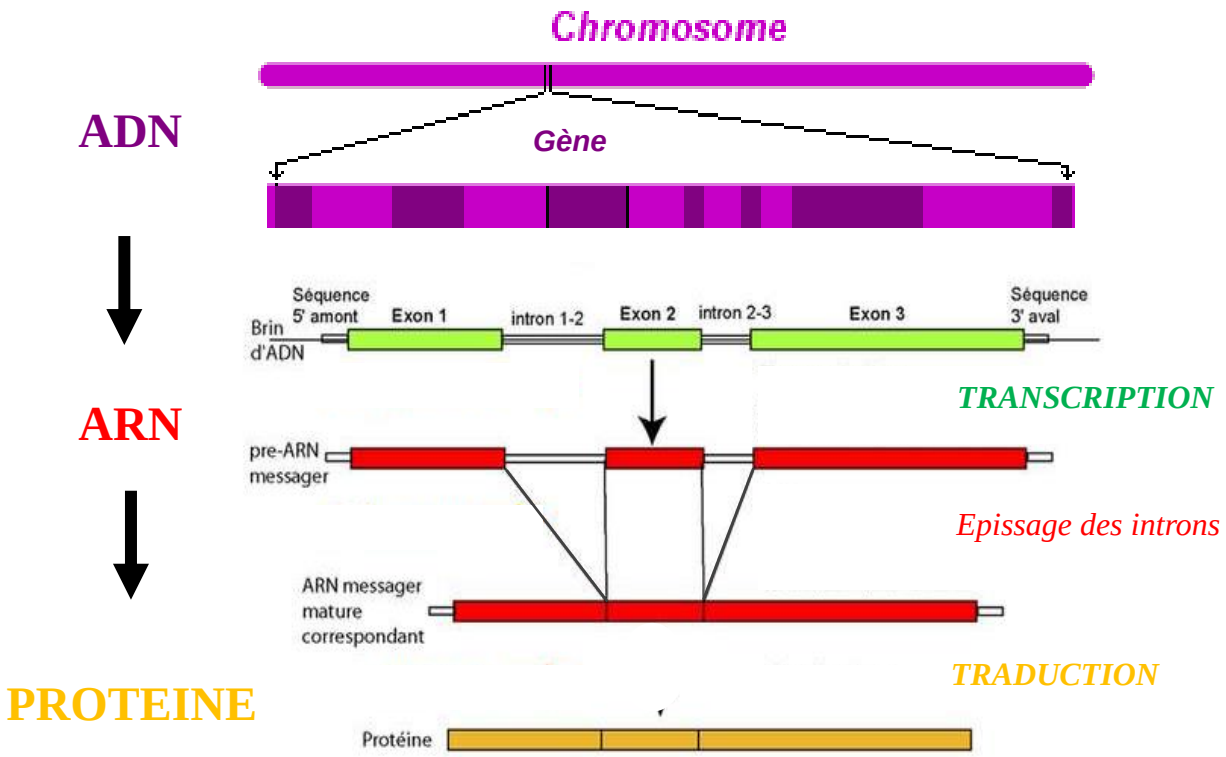



*Modifié à partir de http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/evolution/evol/traits_2.html*

# Epissage alternatif



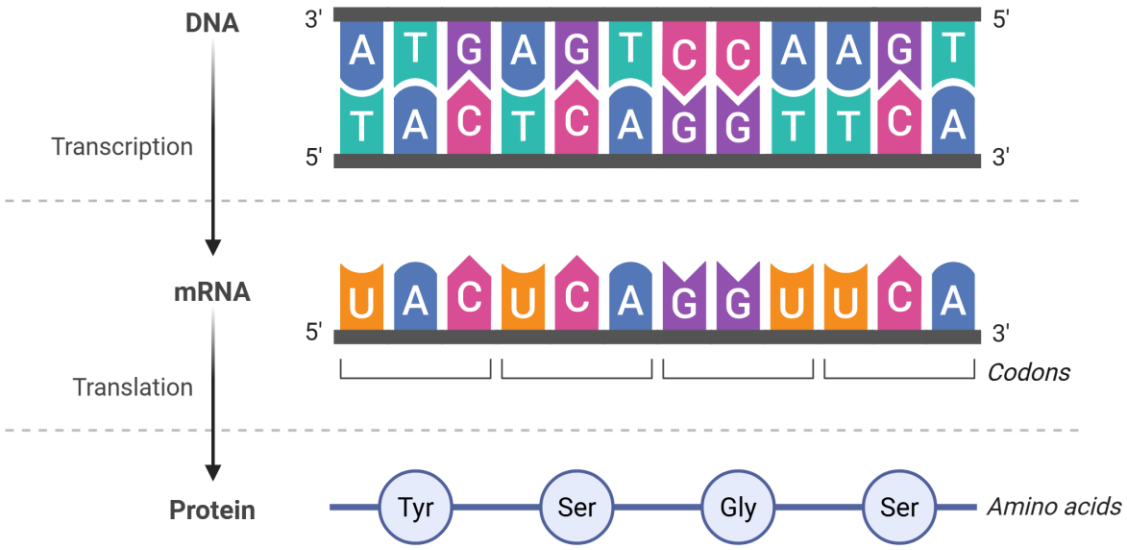
# De l'ADN à la protéine




*Modifié à partir de http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/evolution/evol/traits_2.html*

# Traduction

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

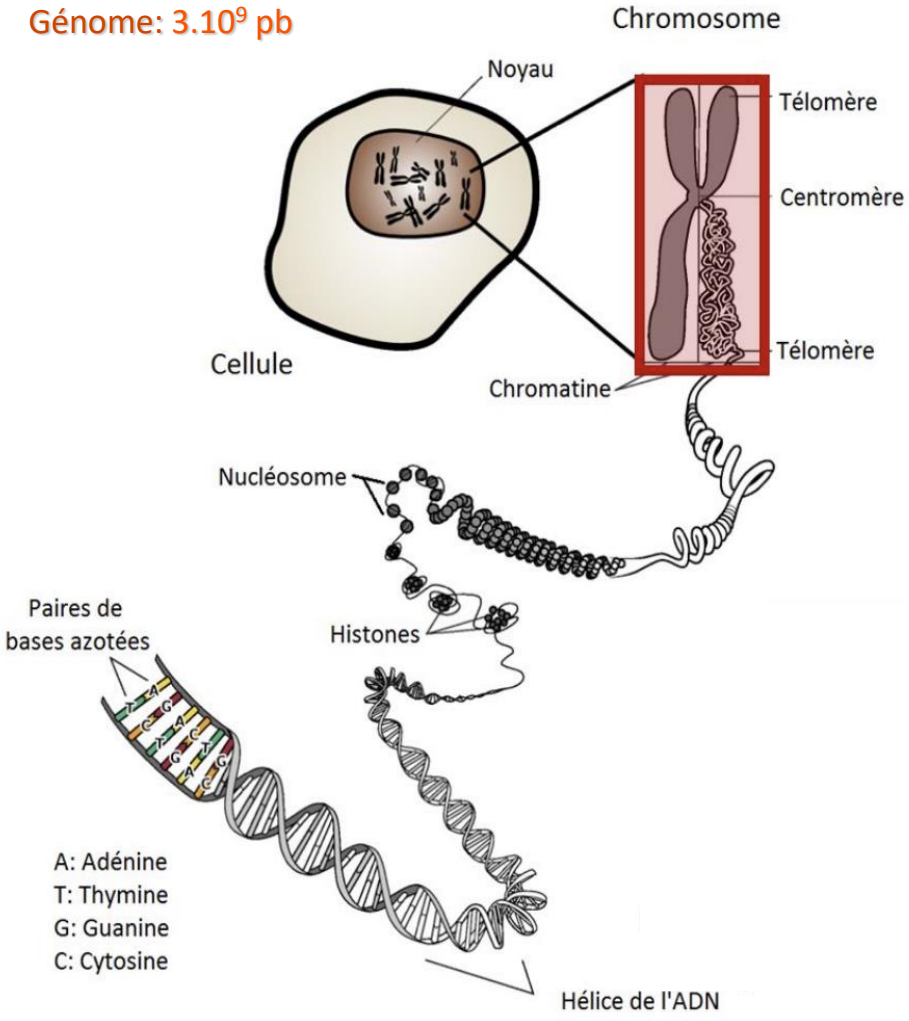



LE CODE GENETIQUE

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

# Niveaux d'études du génome

Génome: $3.10^9$ pb




Chromosome: $2.10^8$ pb

Sous-bande: $2.10^6$ pb

Gène moyen: $2.10^4$ pb

Exon: 50 à 1000 pb

**Cytogénétique conventionnelle**

« Etude à l'échelle du chromosome »

*Caryotype : résolution 10-15Mb*

**Cytogénétique moléculaire**

*CGH : résolution jusqu'à quelques kb*

**Biologie moléculaire**

« Etude à l'échelle du nucléotide »

# 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

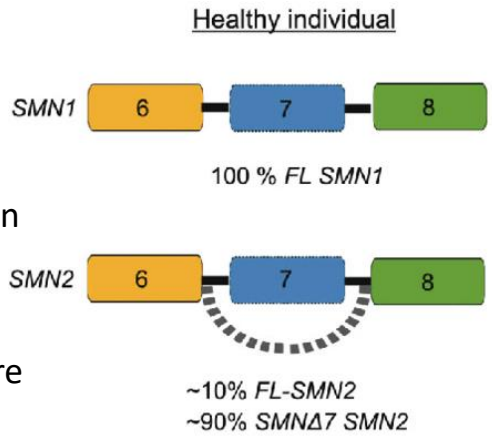
# *Les thérapies ciblées : ex de la SMA*

- 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



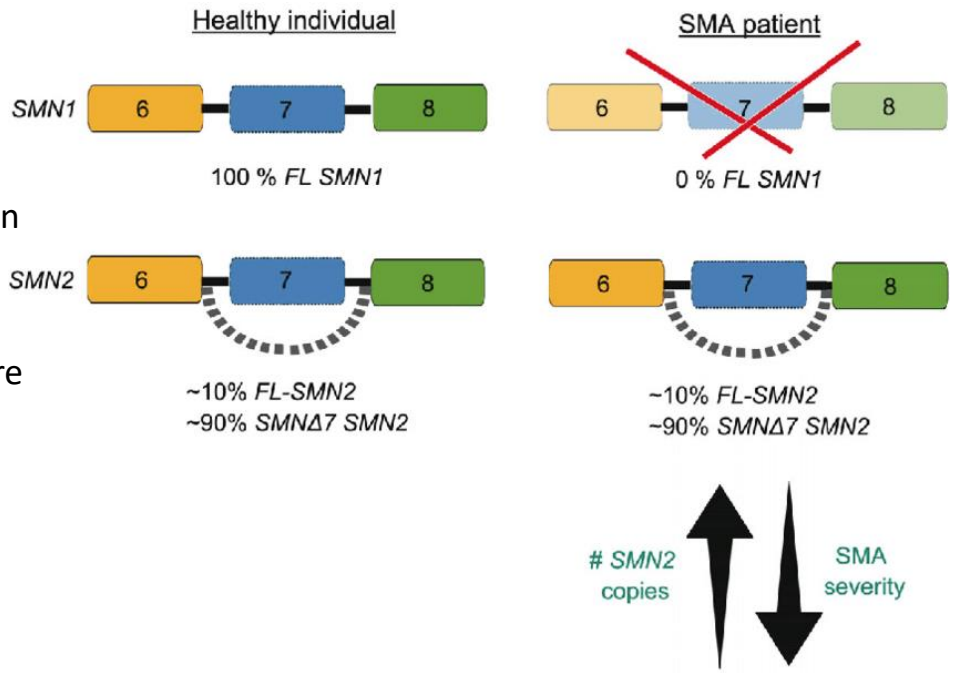
# *Les thérapies ciblées : ex de la SMA*

- 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 nécessaire à la survie des motoneurones

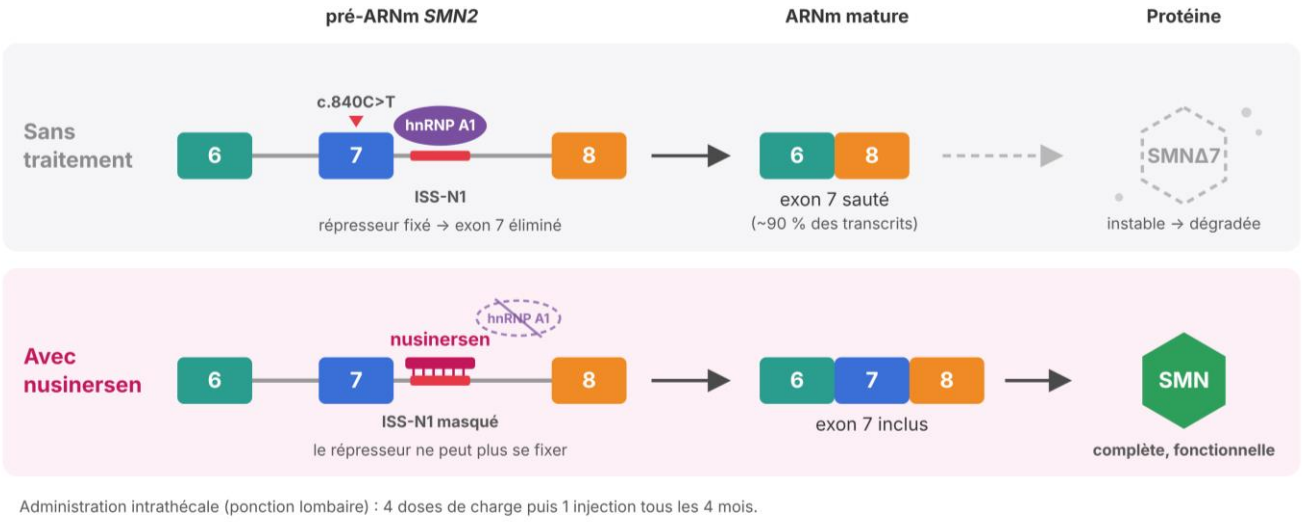



Bowerman et al. 2017

# *Les thérapies ciblées : ex de la SMA*

- Oligonucléotide antisens : Spinraza (nusinersen)

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

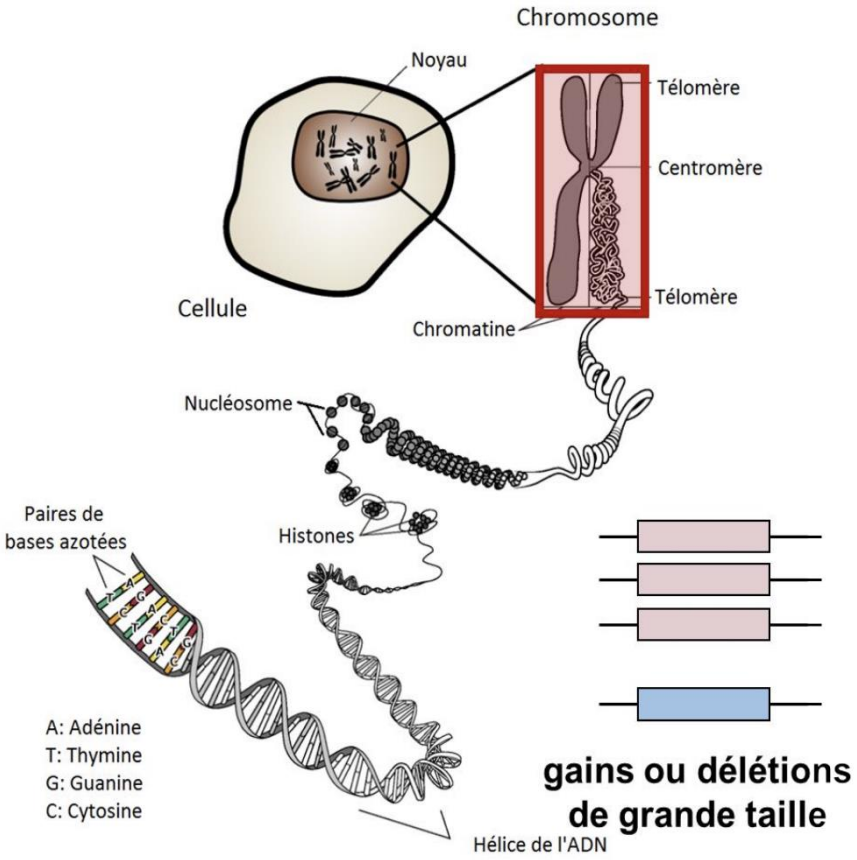
Vecteur adénovirus non réplicant AAV 9 apportant le gène SMN1

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

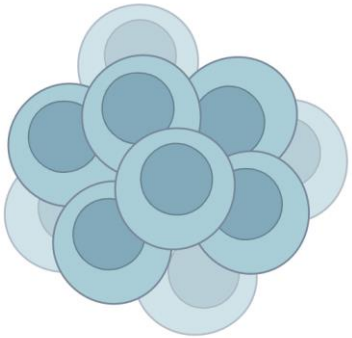
Echelle de résolution : 10-15 Mb

# 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



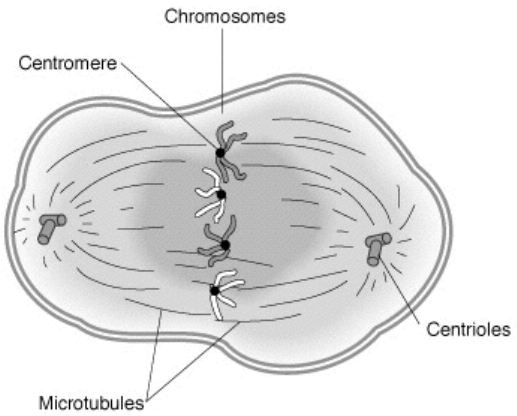
Ajout de PHA



Prolifération des lymphoyctes T

Ajout de colchicine




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

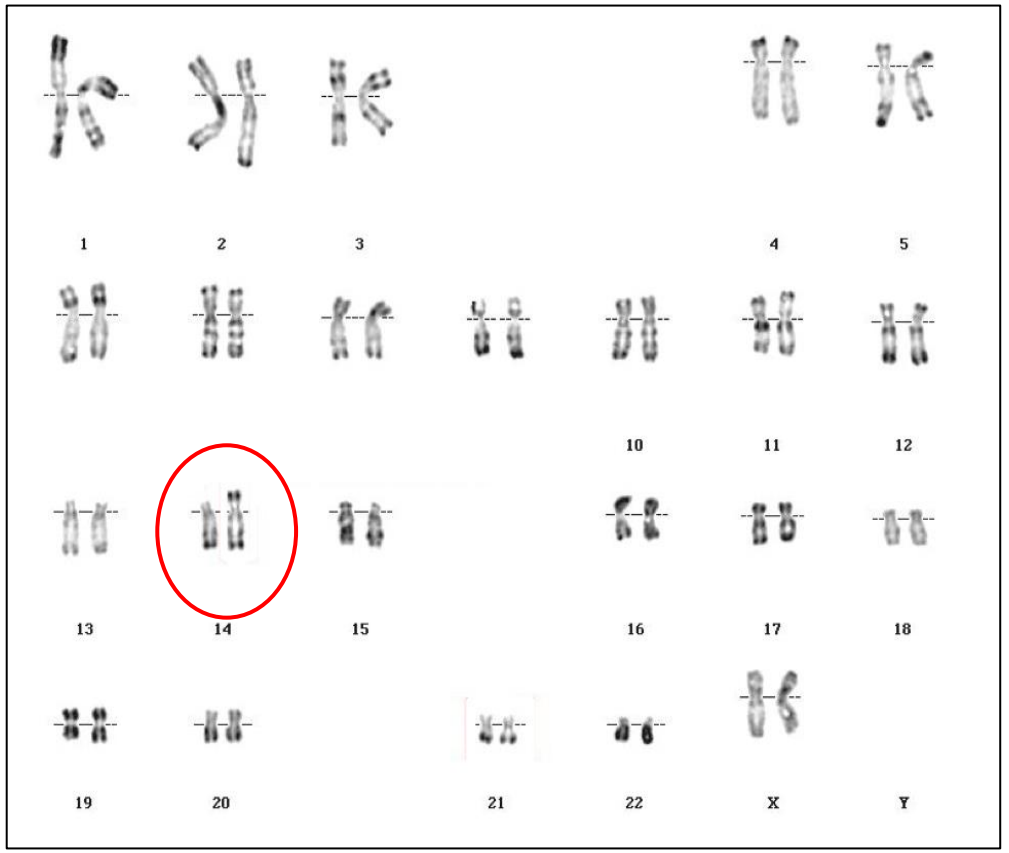
*Formule chromosomique : 47,XX,+21*
Caryotype montrant une trisomie 21 **libre (chromosomes 21 en trois exemplaires)**
Risque de recurrence : environ 1% selon âge maternel

# *Exemple 1 bis*



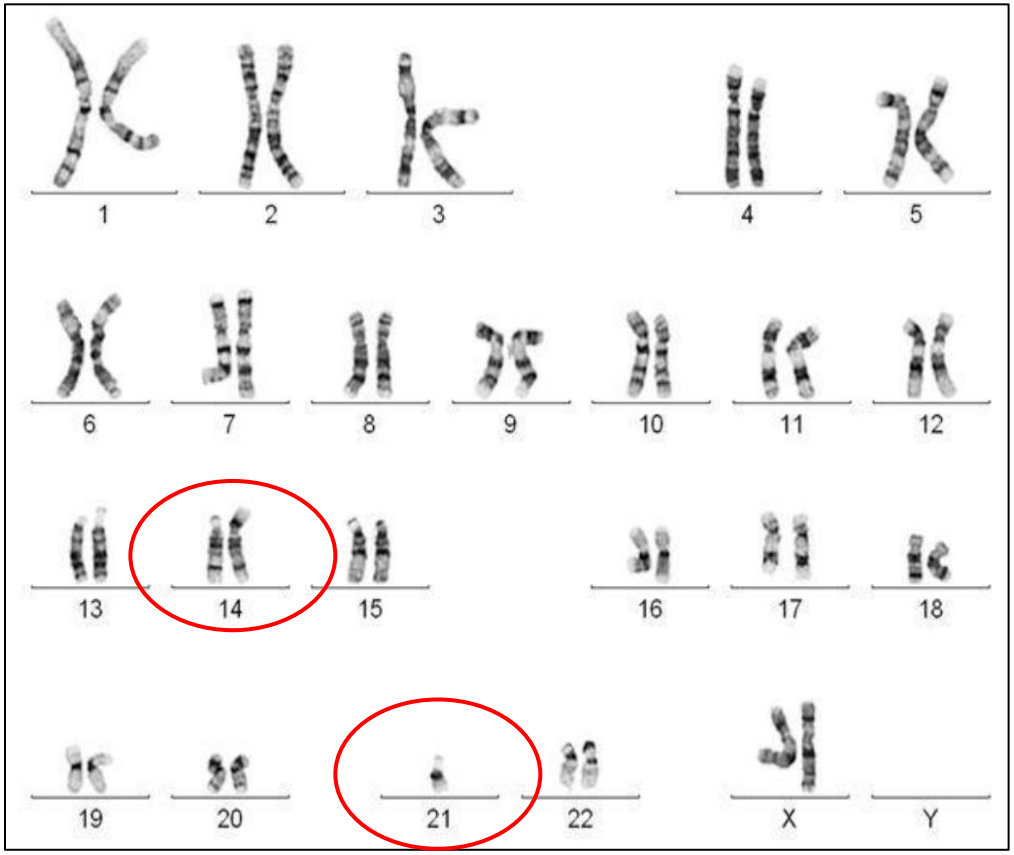
Patient porteur d'une trisomie 21
Particularités morphologiques

Même phénotype



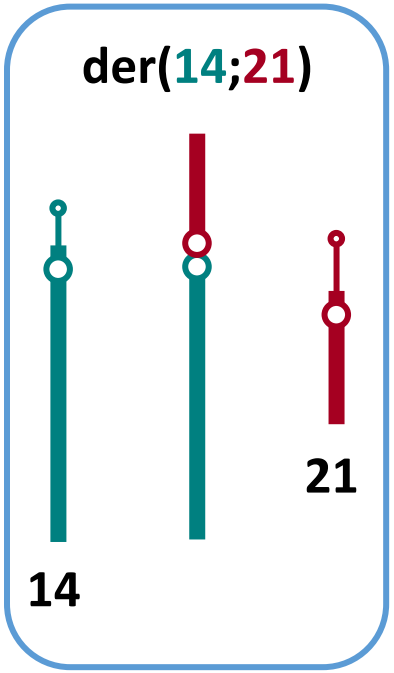

*Formule : 46,XX,der(14;21)*
Caryotype montrant une trisomie 21 par translocation 14;21
Dérivé issu de la fusion de deux chromosome acrocentriques
> Le patient possède trois bras longs de chromosomes 21

# *Exemple 1 bis*

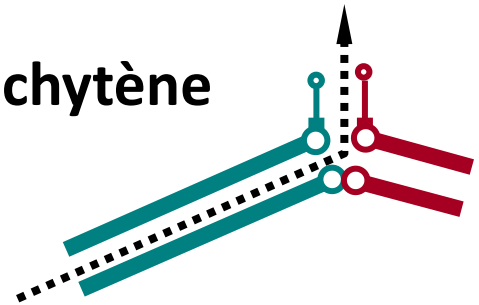



- Caryotype de la maman présentant une translocation robertsonienne 14, 21
- = anomalie de structure caractérisée par la fusion de deux chromosomes acrocentriques
  - Pas de symptomes chez la maman
  - Mauvaise division des chromosomes lors de la méiose
  - Risque élevé de recurrence d'une trisomie 21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

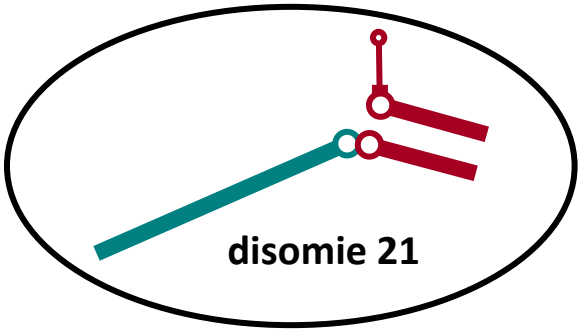
# *Exemple 1 bis*

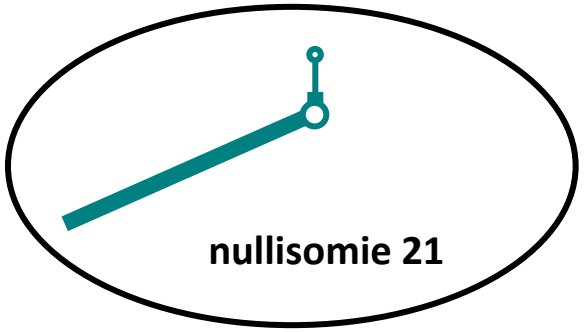



**Ségrégation adjacente**




**GAMETES**




**ZYGOTES**

**Trisomie 21**

**monosomie 21**

# 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

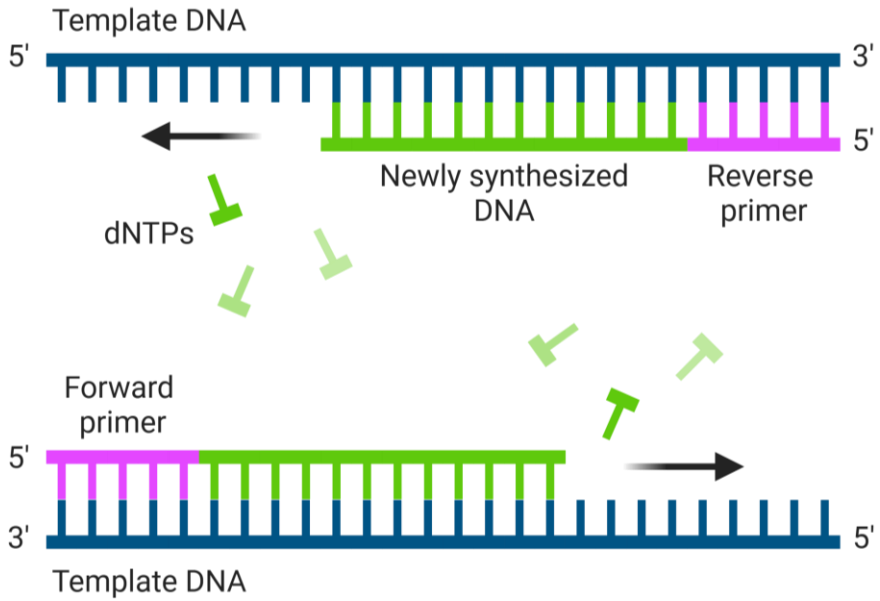
NGS



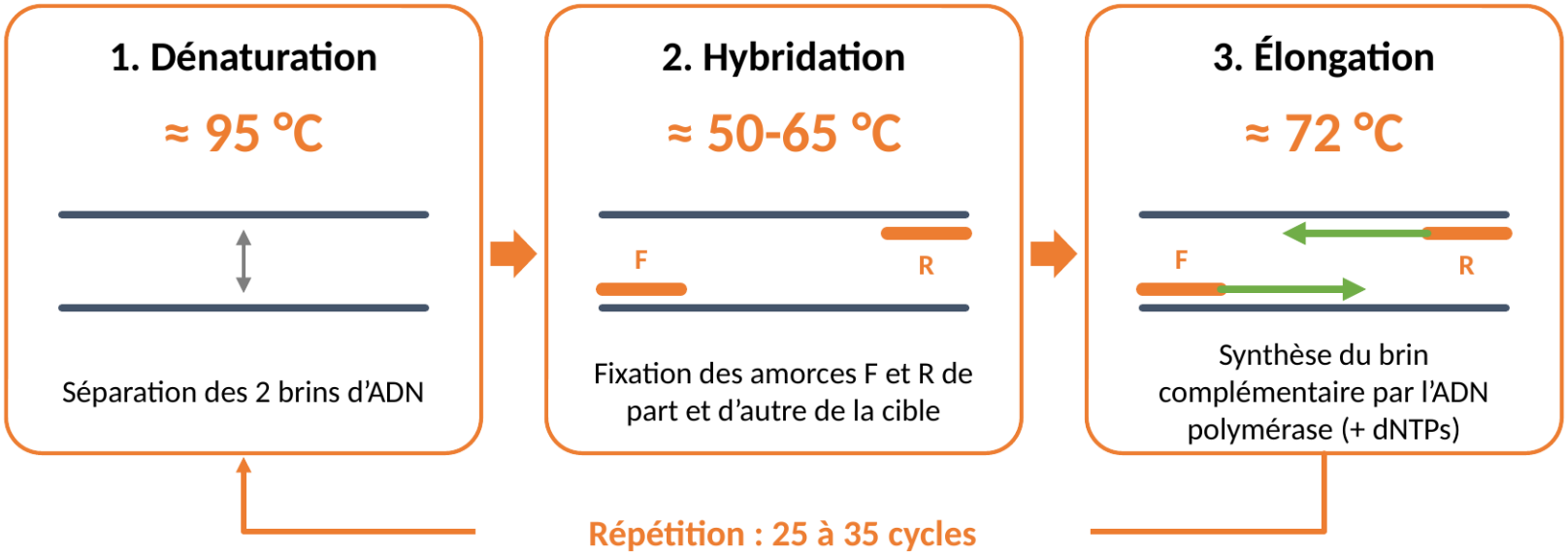
De plusieurs dizaines de gènes à l'ensemble du gènome soit 3.10^9 bases

# Pré-recquis : la PCR

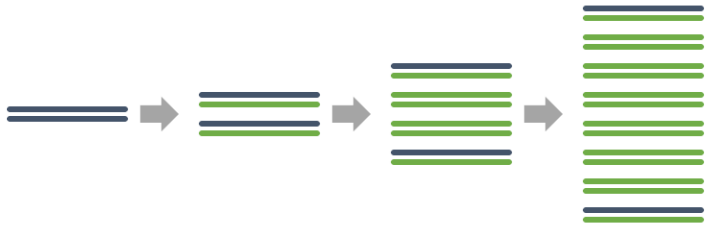
- *Polymérase Chain Reaction*, ou reaction de polymérisation en chaîne : technique de biologie moléculaire qui permet d'obtenir un grand nombre de segments d'ADN identiques (appelés amplicons), le plus souvent < 1000 pb



# Pré-recquis : la PCR




**Amplification exponentielle**
chaque cycle double le nombre de copies



Départ : 1 | Cycle 1 : 2 | Cycle 2 : 4 | **Cycle 3 : 8**

… **Cycle n : $2^n$ copies**
30 cycles ≈ $10^9$ copies

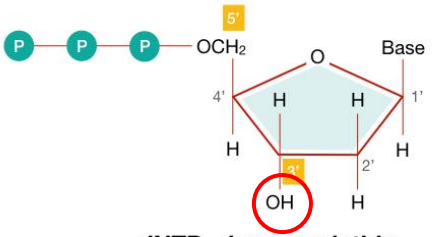
ADN matrice | Amorces | Brin néosynthétisé

**Amplicon** : le plus souvent < 1 000 pb ; il faut connaître les séquences qui encadrent la cible

# Le séquençage sanger

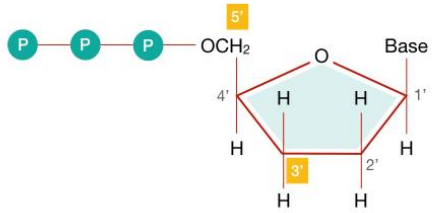
# Séquençage par la méthode Sanger

- 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'élongation > effet terminateur de chaîne

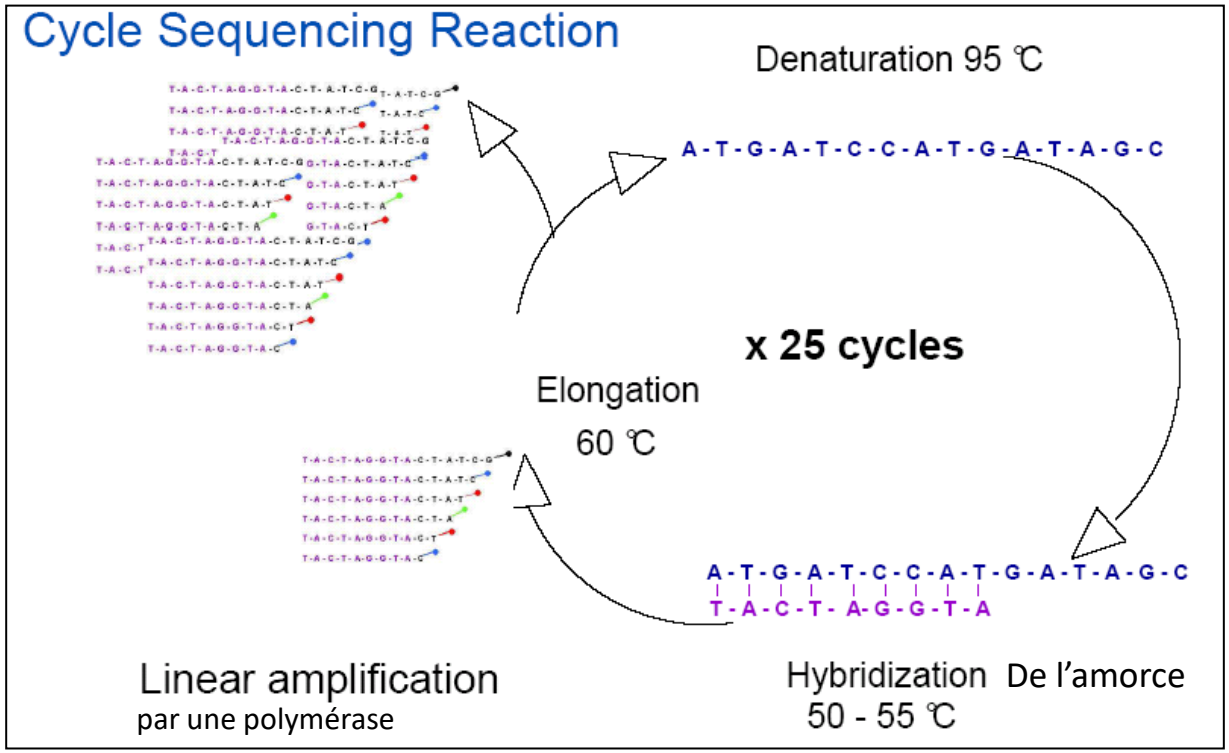



dNTP- deoxynucletide

© Genetic Education Inc.

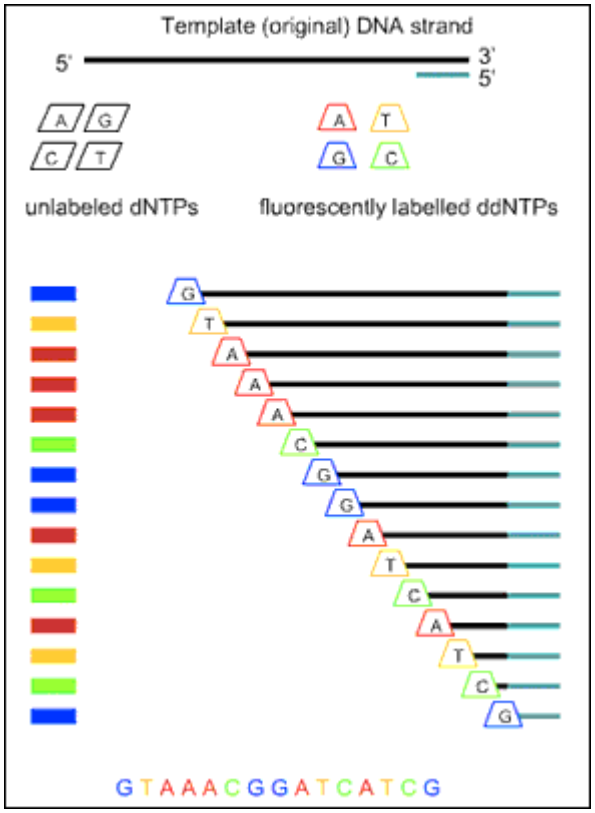


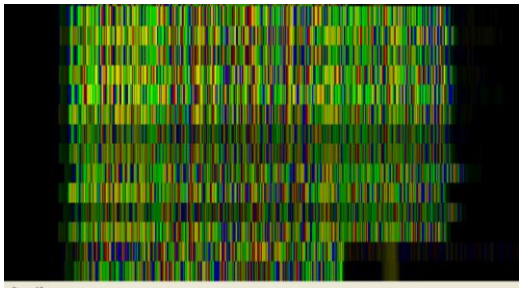

ddNTP- dideoxynucletide



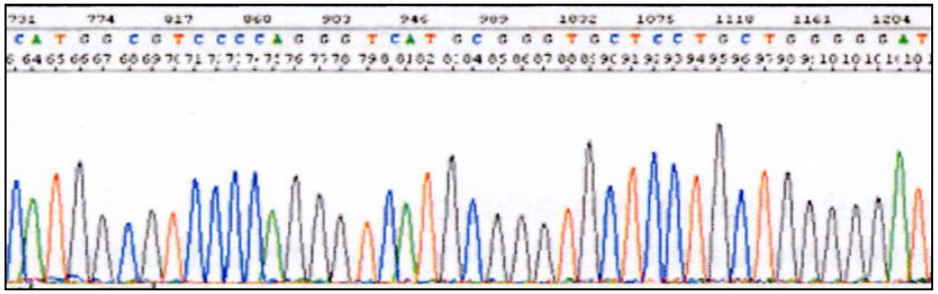
# Séquençage par la méthode Sanger

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.

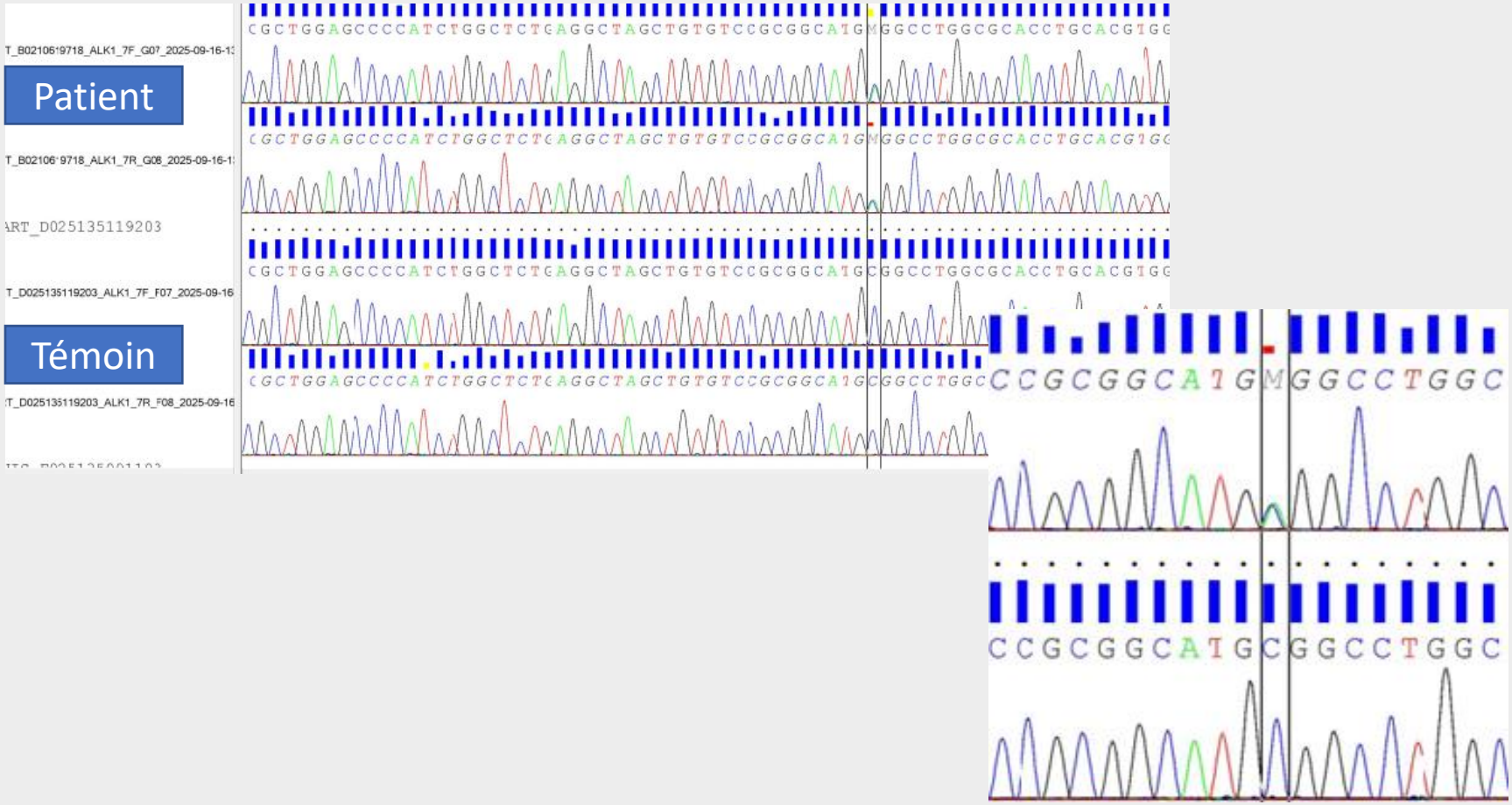
**Anomalies détectables** :

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

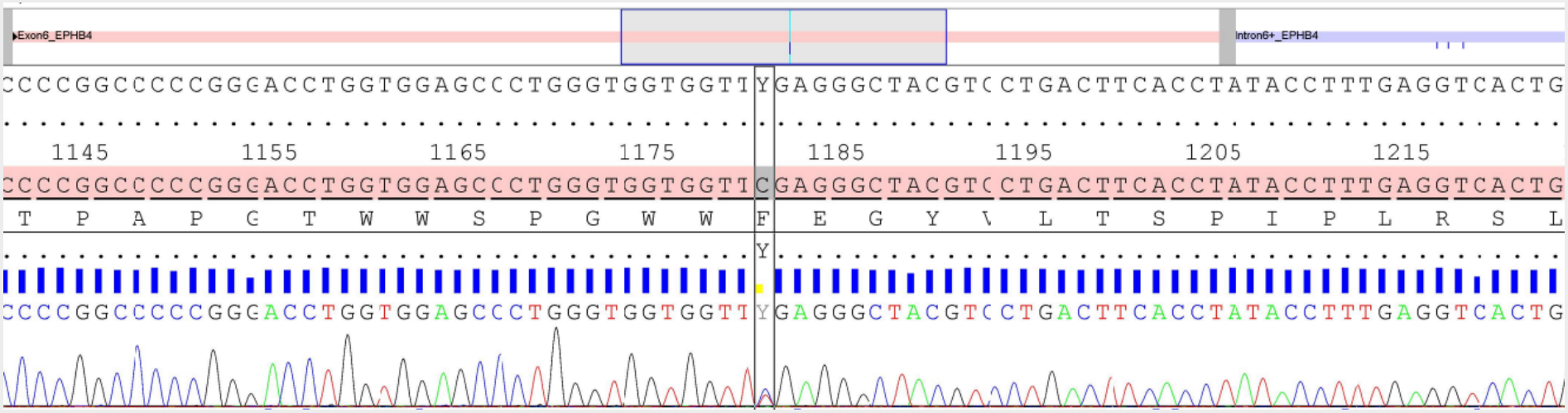
✅ Haute fidélité / précision sur de courtes séquences (≤ 1000 pb)
❌ Faible rendement, coûteux et lent pour de grands gènes ou panels → remplacé par le **NGS** pour les analyses à grande échelle

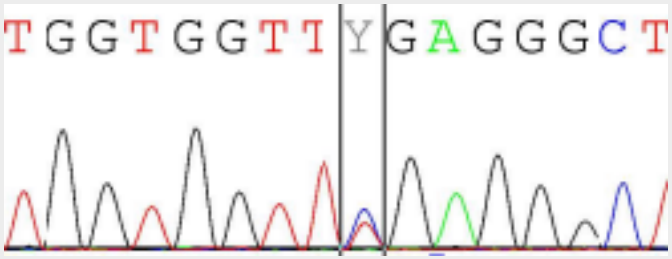
# Exemple 1 : substitution nucléotidique

*ACVRL1*:c.924C>A, hétérozygote



# Exemple 2 : substitution nucléotidique

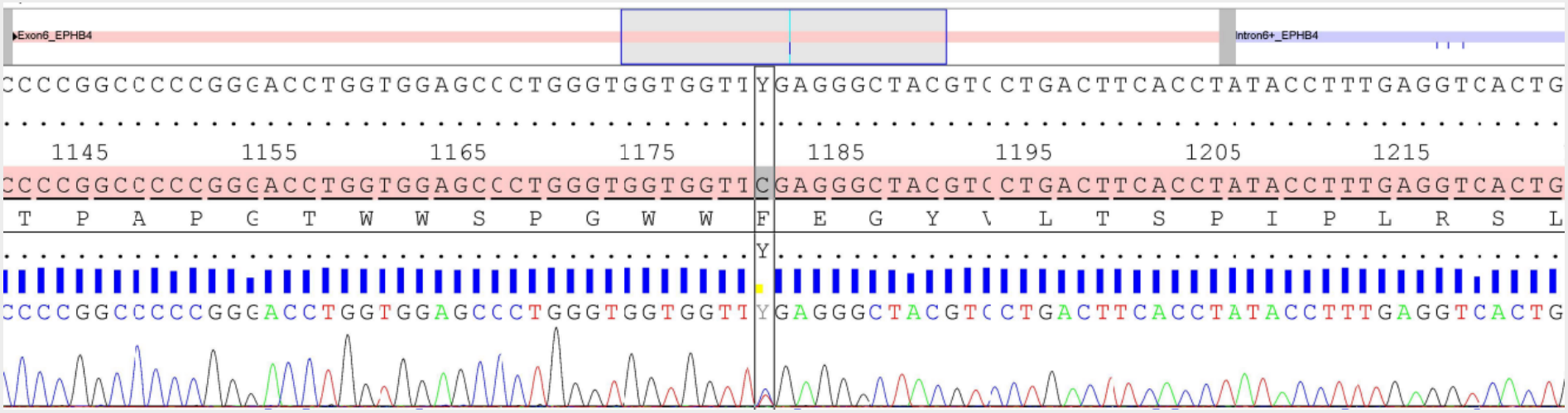



Que voyez-vous ?

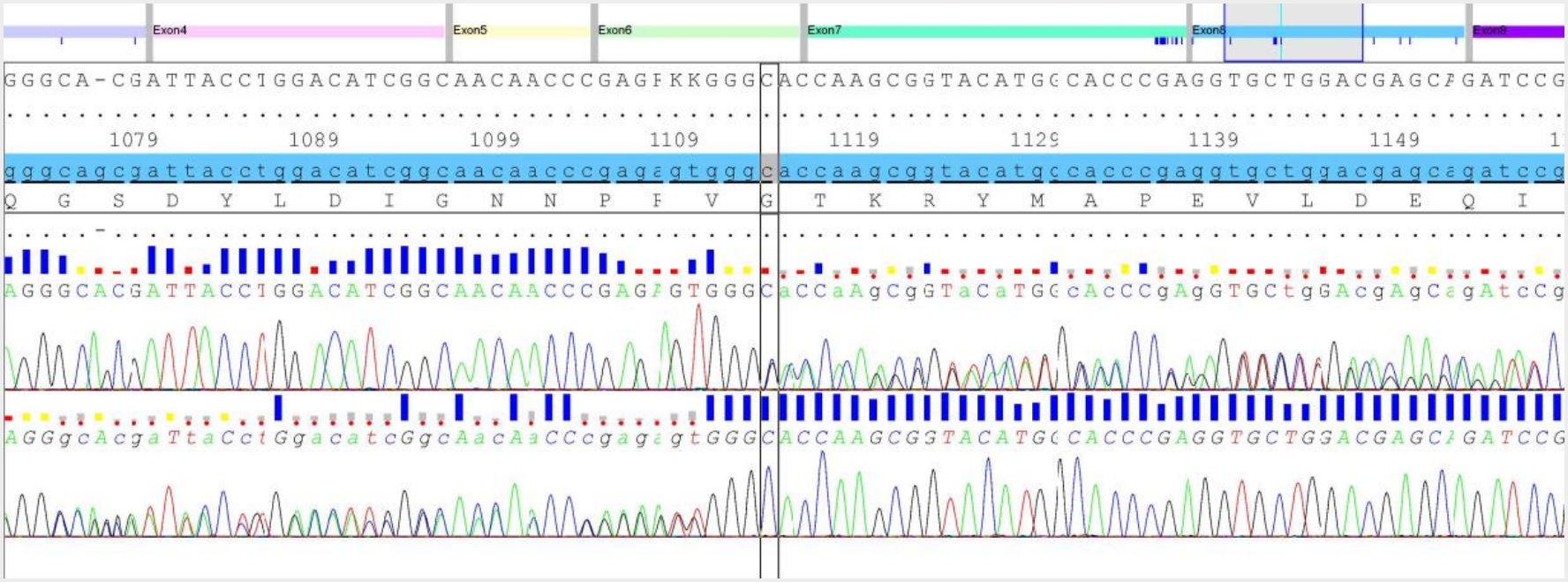
# Exemple 2 : substitution nucléotidique

*EPHB4*: c.1180C>T, hétérozygote



# Exemple 2 : duplication d'un nucléotide

- *ACVRL1*:c.1112dup, hétérozygote




Que voyez-vous ?

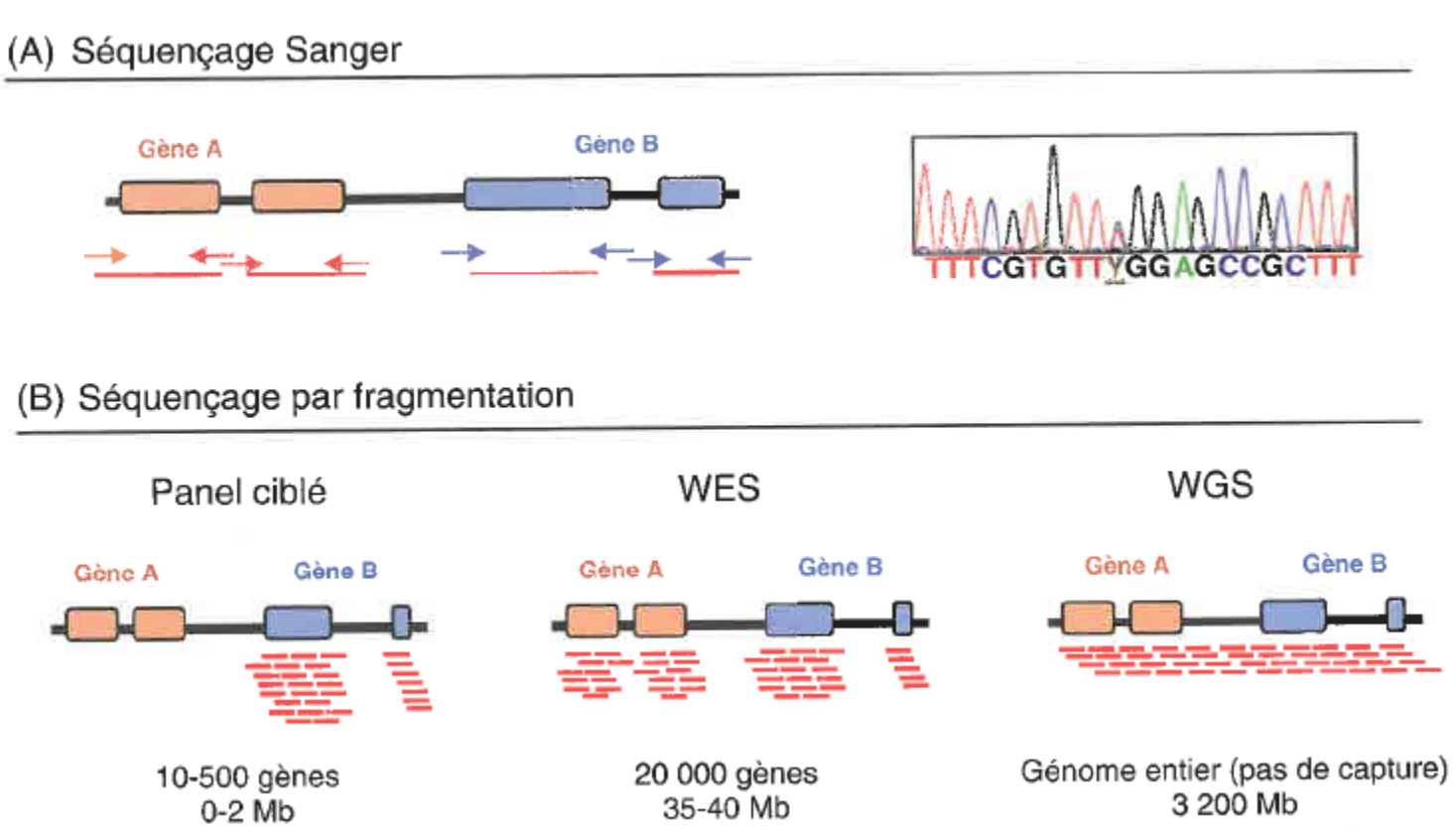
# Le NGS

Next generation sequencing

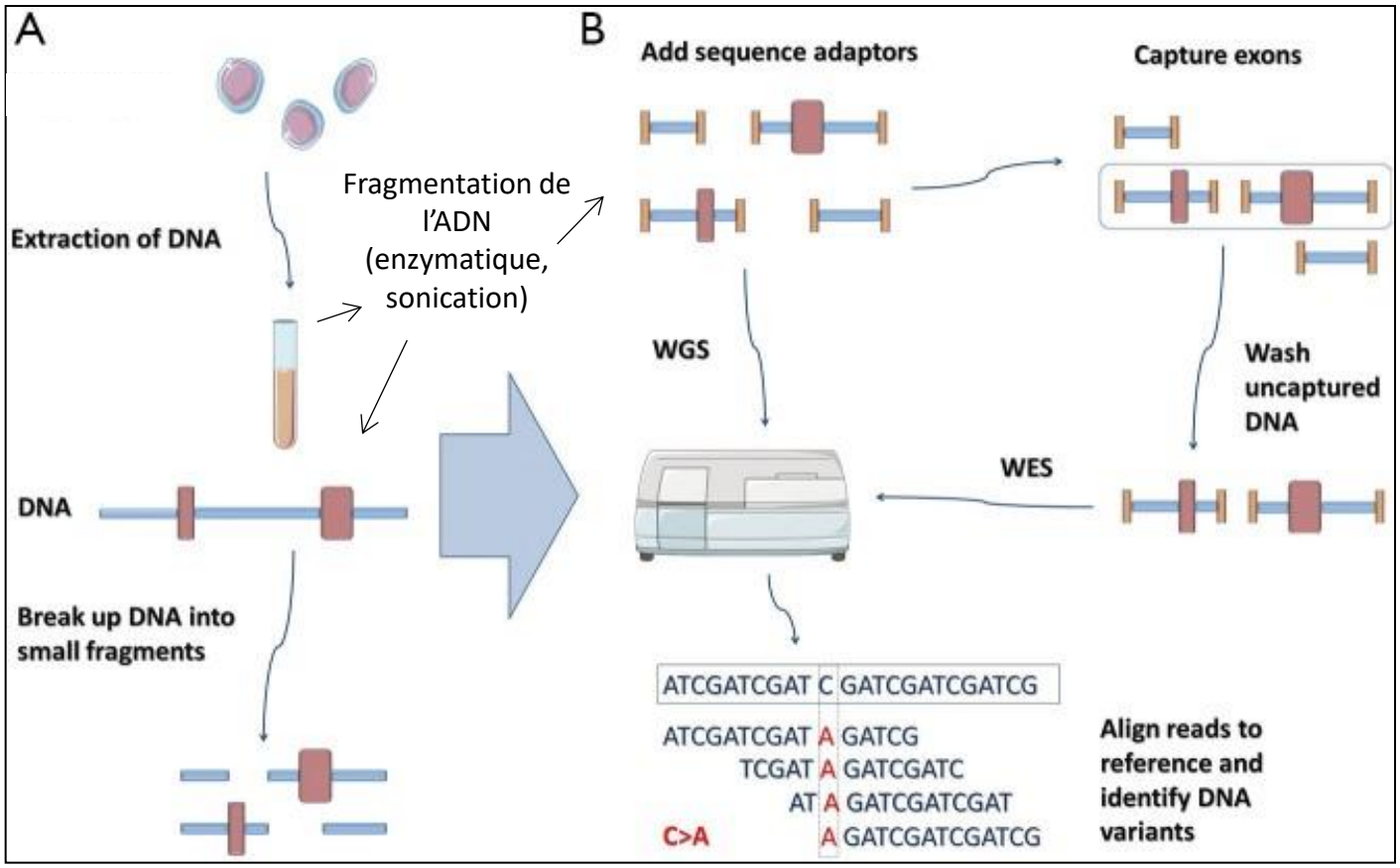
Ou séquençage à haut debit

Ou séquençage massif en parallèle

# Sanger vs NGS



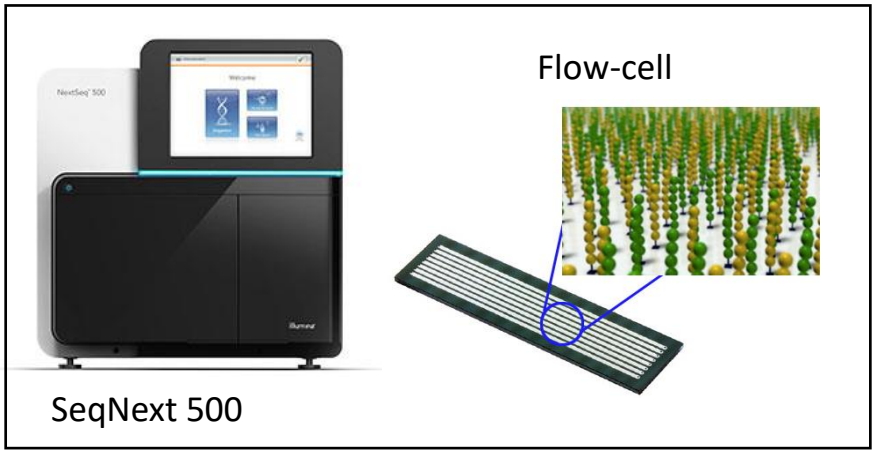
# Capture des régions d'interêt




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

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

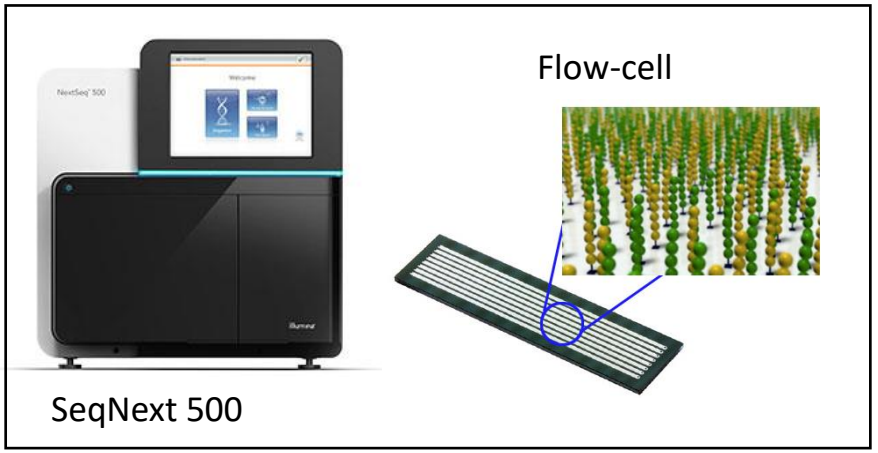
# Séquençage
## (exemple de la technique Illumina®)



# Séquençage
## (exemple de la technique Illumina®)

Hybridation de la librairie



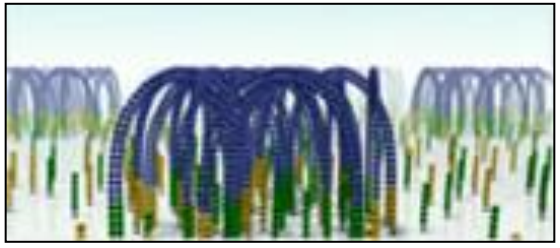


# Séquençage
## (exemple de la technique Illumina®)

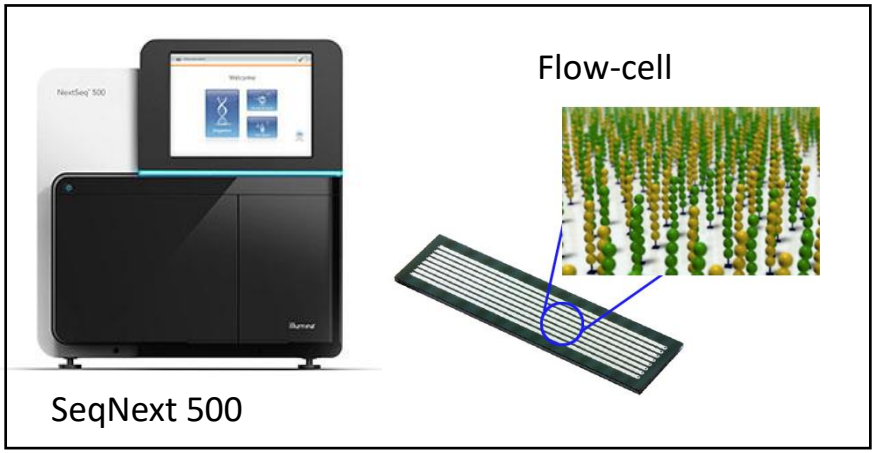
Hybridation de la librairie



Génération de clusters par PCR
(Bridge amplification)



Cluster

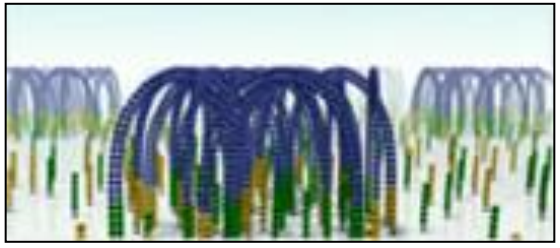


# Séquençage
## (exemple de la technique Illumina®)

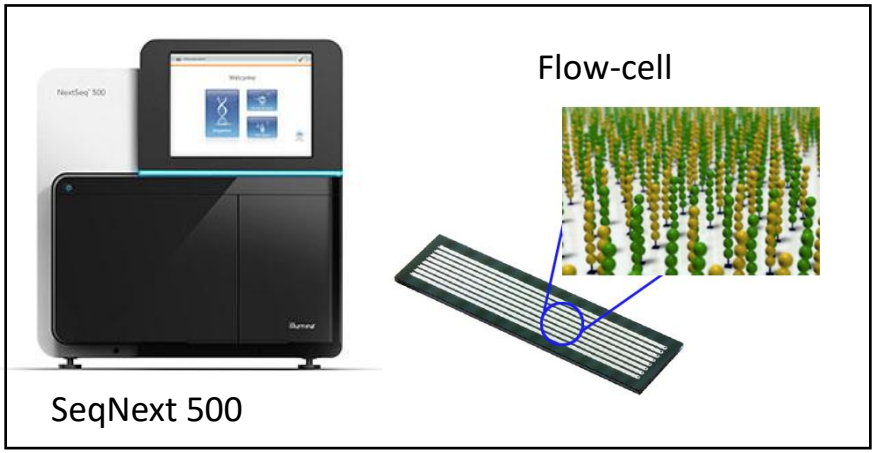
Hybridation de la librairie



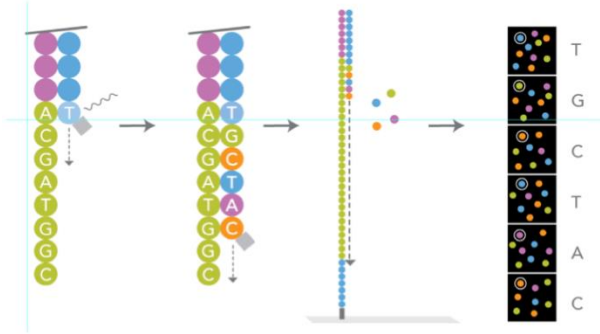
Génération de clusters par PCR
(Bridge amplification)



Cluster



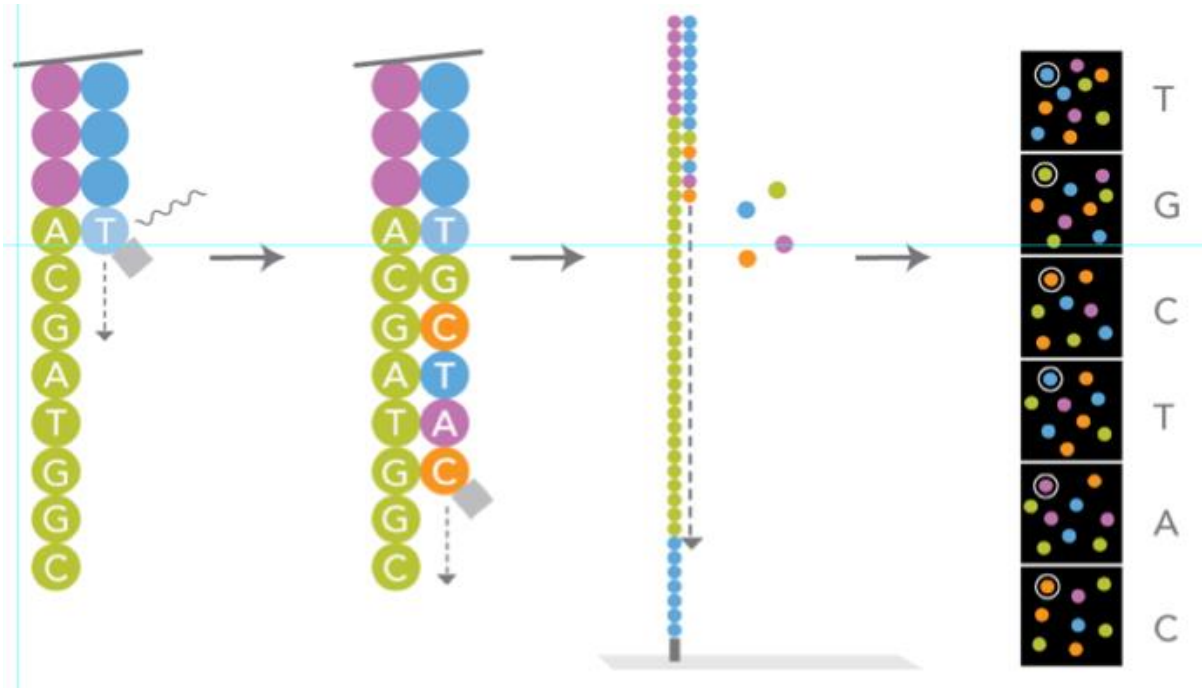

Lavage des brins reverse et séquençage



# 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), limité donc aux gènes déjà connus
  - ***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<br>Exon par exon | 5-500 gènes | Tous les gènes<br><br>Seulement régions codantes | Génome entier : gènes avec introns + régions intergéniques |
| Type de variants détectés | SNV | SNV<br>CNV | SNV<br>CNV (selon technique) | SNV<br>CNV<br>SV<br><br>Variants introniques |



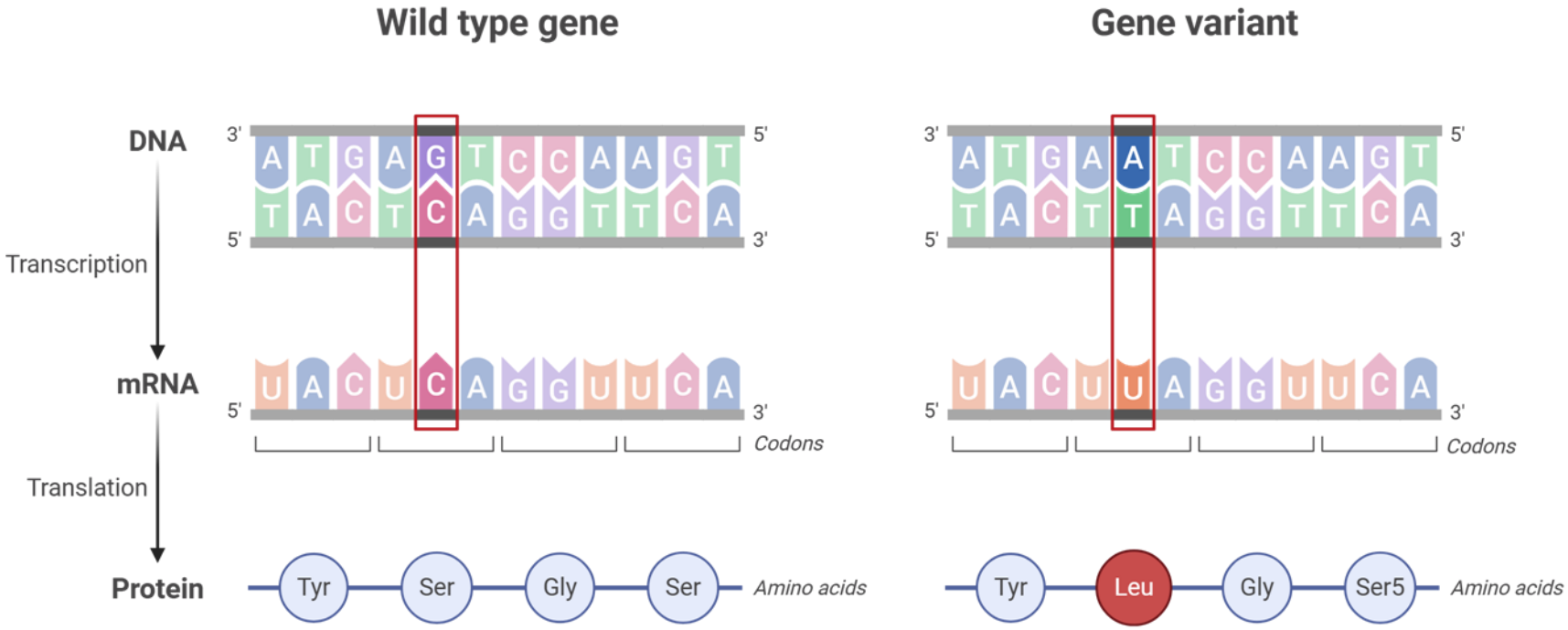







# Les types de variants

- **Les SNV** (*Single Nucleotide Variations)* : variants nucléotidiques (et indels)
  - Substitution nucléotidique : Iso-sémantique (=synonyme : même acide aminé), faux-sens (acide aminé différent), 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

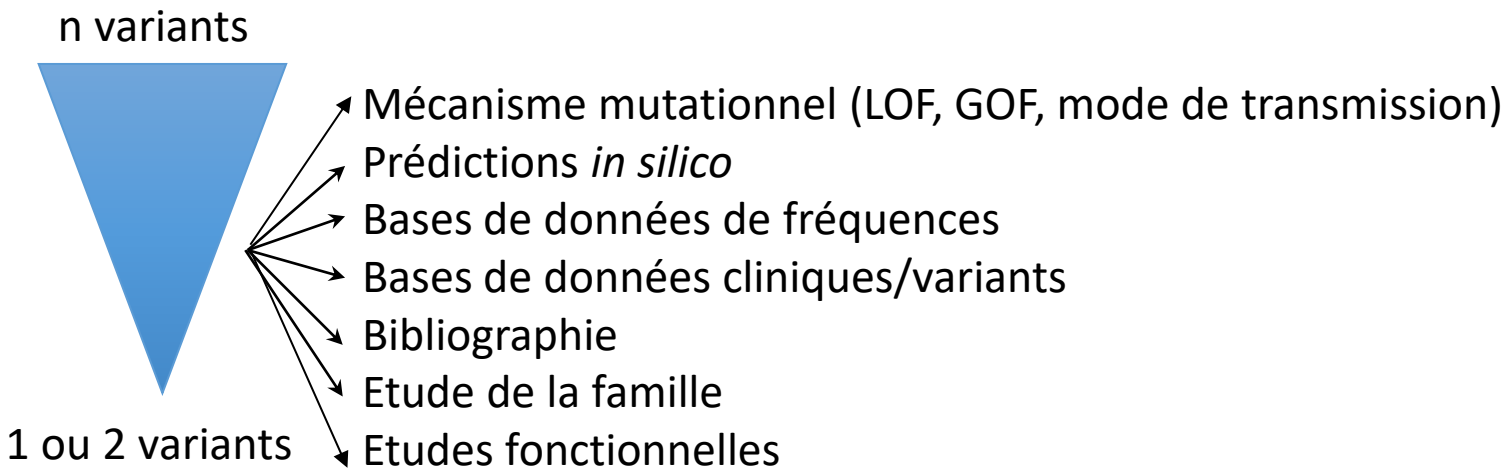
# Combien de variants nucléotidiques rares sur un exome ?

- 40
- 400
- 4000
- 40 000

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

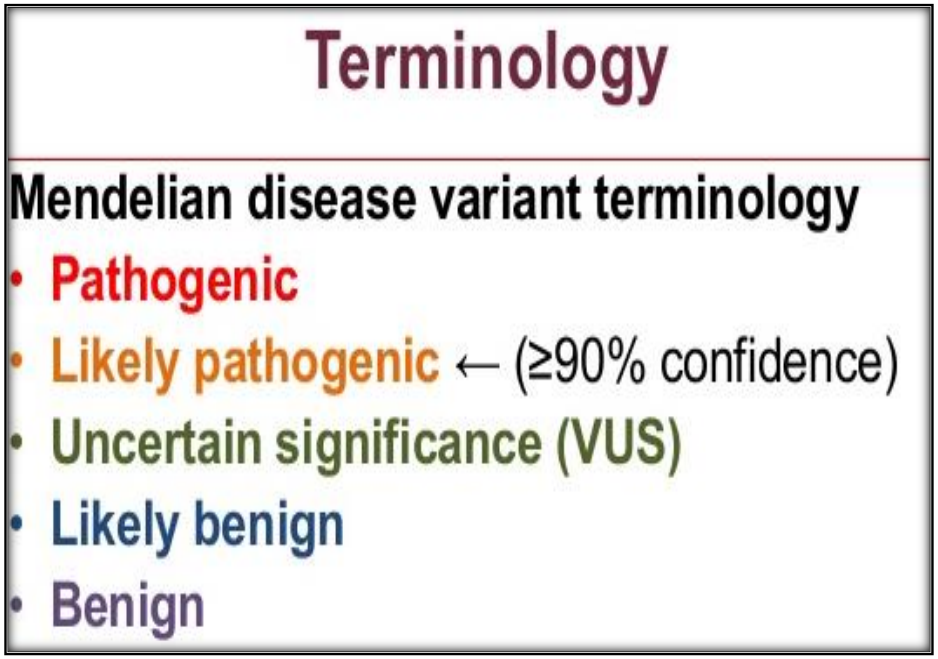
Dépend de : database, origine ethnique, qualité des données

# 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)

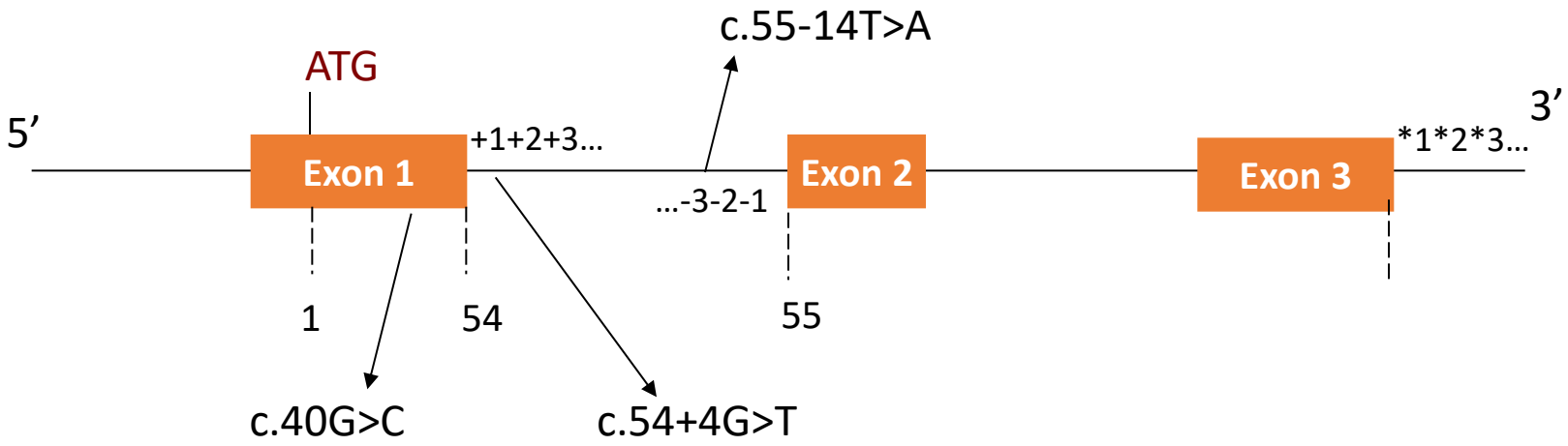


# Nomenclature des variants génétiques

**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.

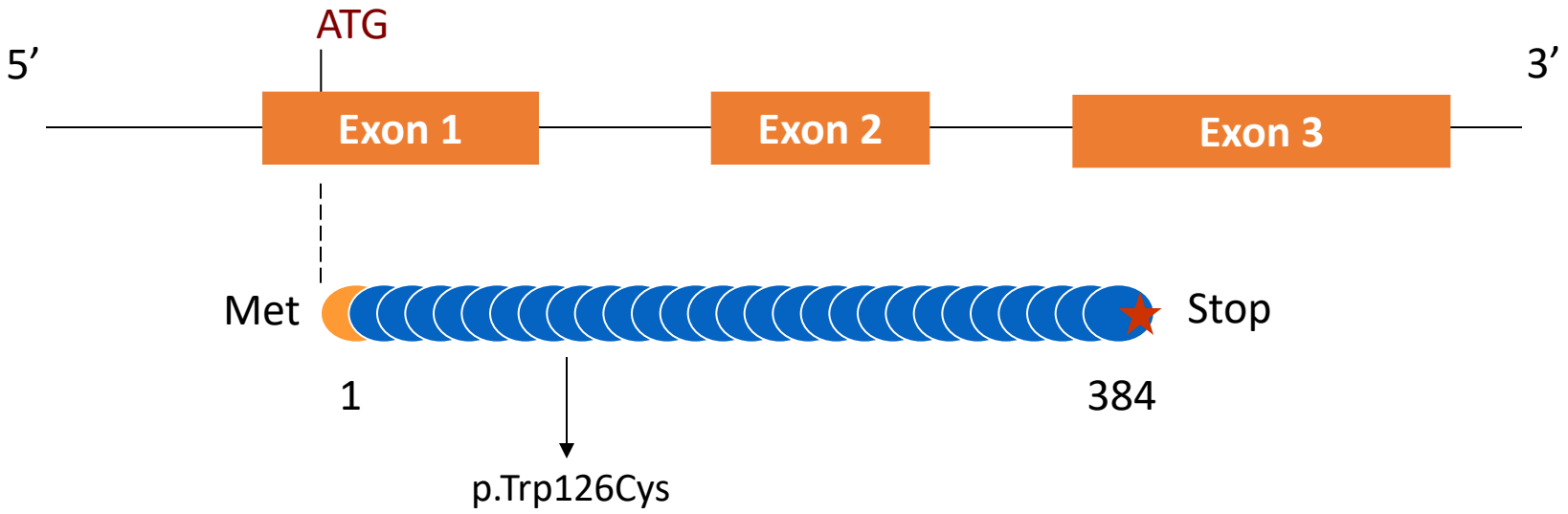
- le n°1 correspond au A du codon d'initiation de la traduction (ATG)
- Puis la numérotation dépend de la transcription et de la traduction



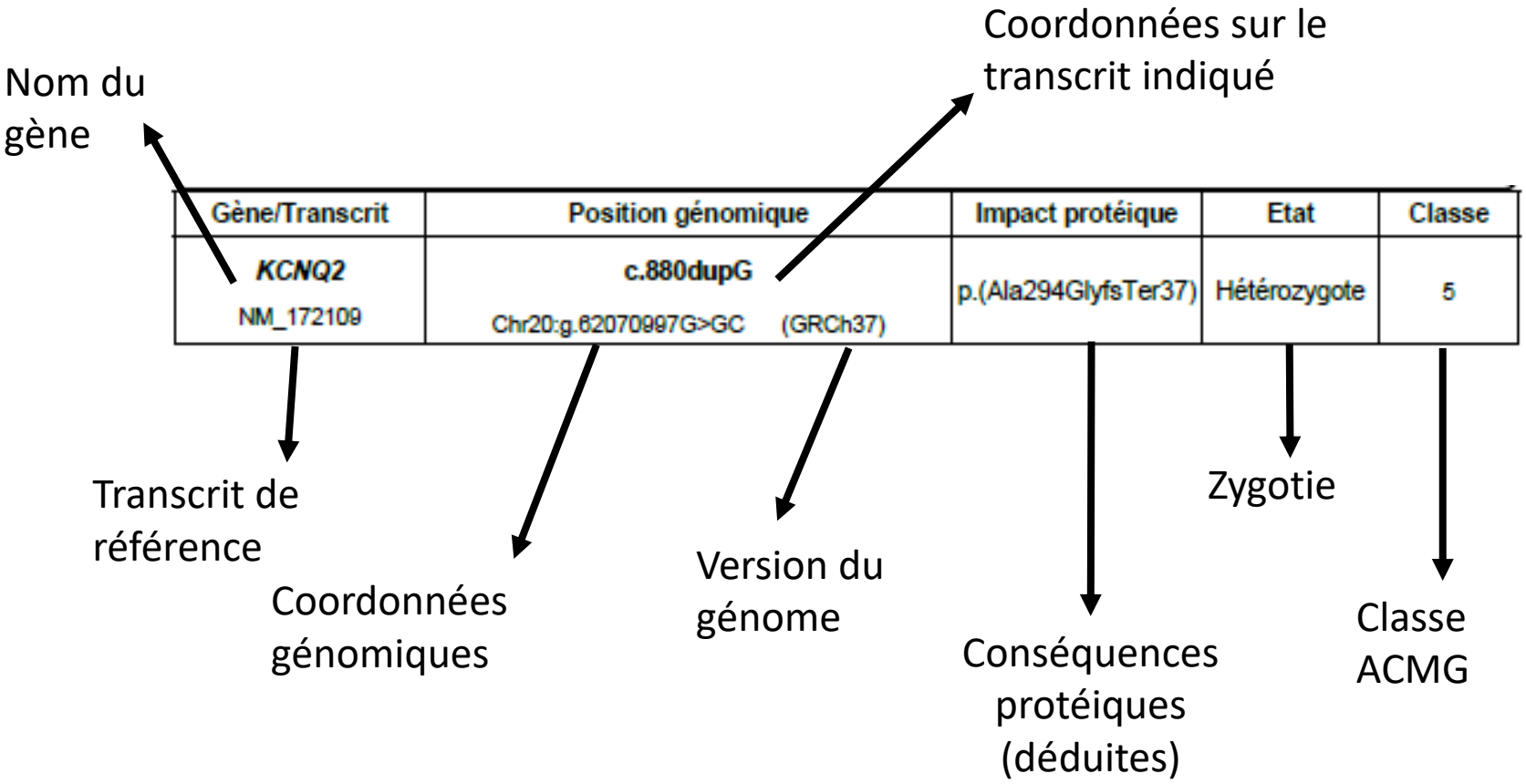
# Nomenclature des variants génétiques

**Protéine** :

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



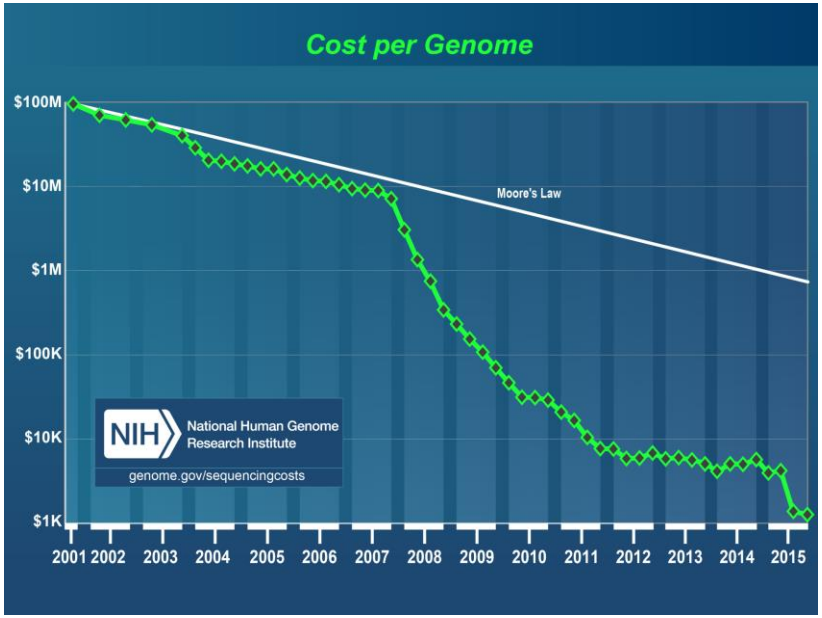
# Nomenclature des variants génétiques



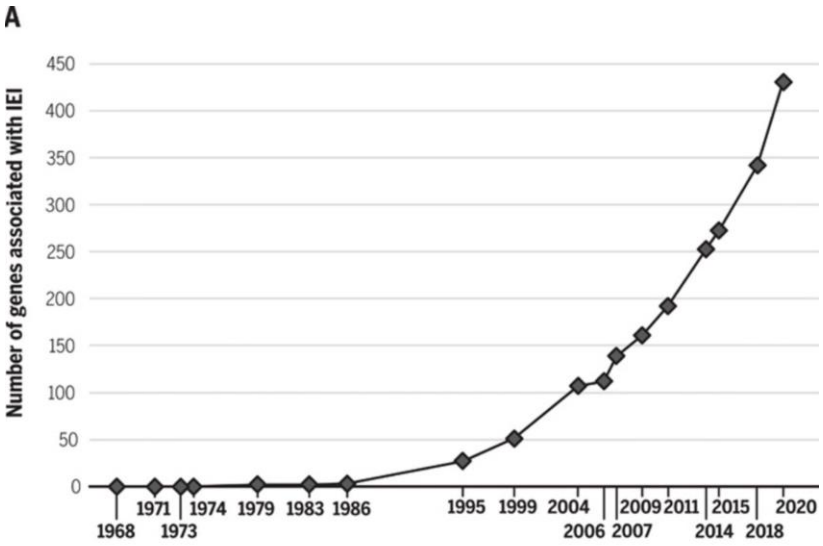
# Questions éthiques soulevées par les analyses pangénomiques

# Vers l’ère du génome

Prix d’un génome




Nombres de genes impliqués dans pathologies dysimmunitaires




Notarangelo et la, 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*

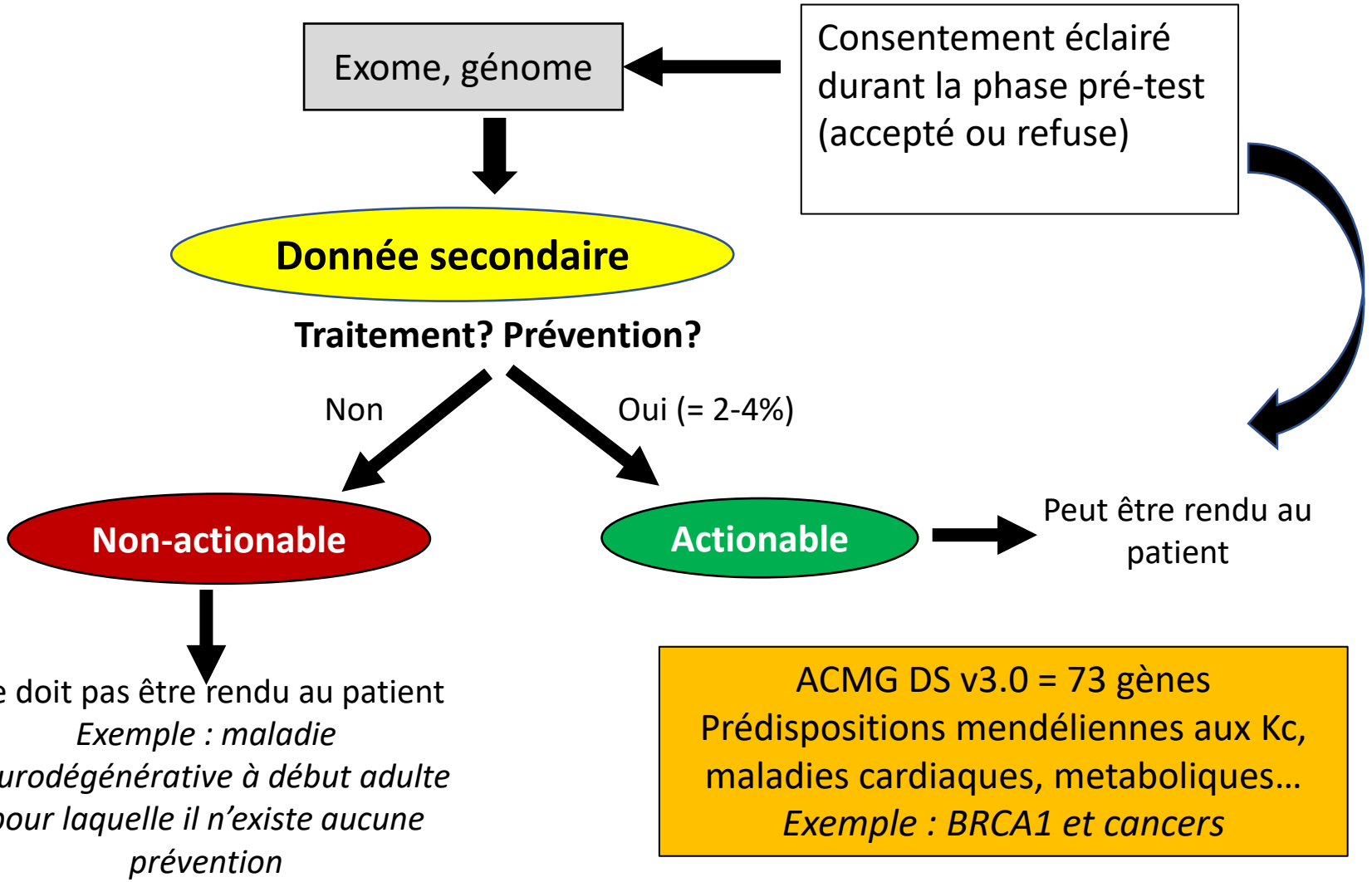
- Donnée incidente = non recherchée activement

*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**

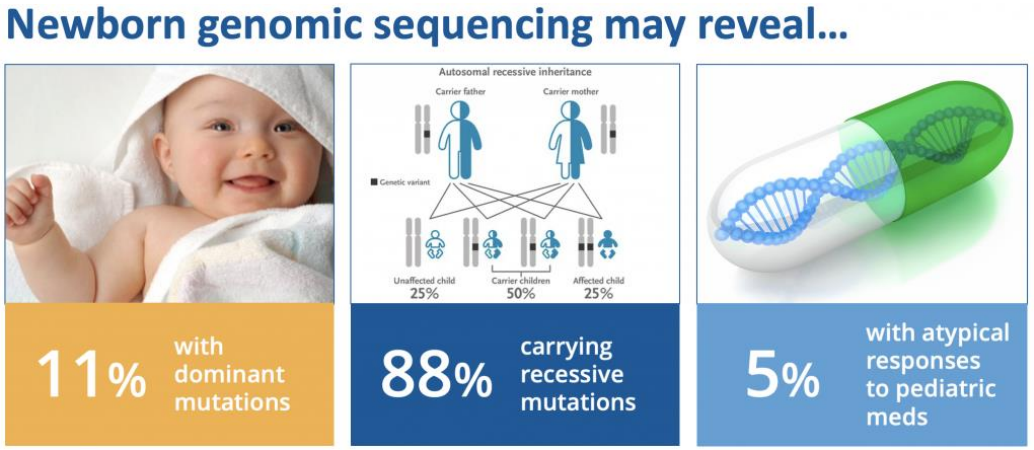
## Interpretation of Genomic Sequencing Results in Healthy and Ill Newborns: Results from the BabySeq Project

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




- 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 espiratory distress (F) | *MSH2*, 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) | *BRCA2*, 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) | *BRCA2*, 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 |

JAMA Network | Open

Original Investigation | Pediatrics

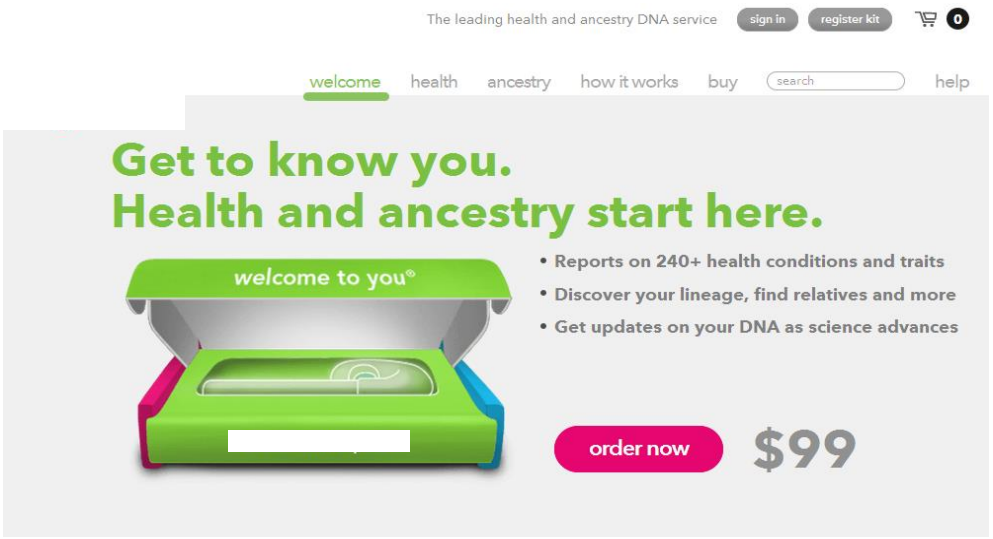
# Perspectives of Rare Disease Experts on Newborn Genome Sequencing

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

Enquete récente de plus de 200 experts de maladies rares

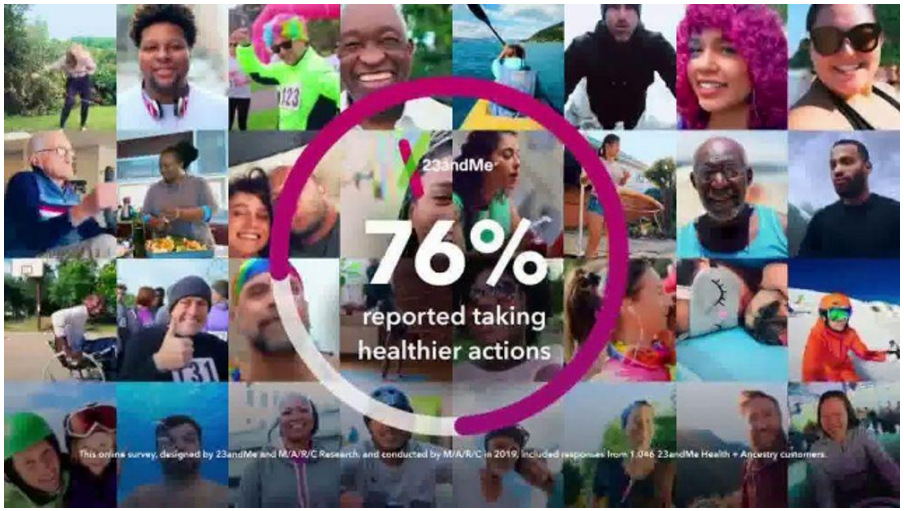
- 87.9% pensent que le NBSeq pour les maladies monogéniques qui se traitent devrait être proposé pour tous les NN
- 58.9% pensent que ce test devrait inclure les maladies avec penetrance faible
- 37,2% pensent que ce NBSeq devrait inclure un screening pour les maladies pour lesquelles il n'y a ni traitement ni prise en charge établie

# Génétique et business









# Génétique et business

CNIL. PROTÉGER les données personnelles ACCOMPAGNER l'innovation PRÉSERVER les libertés individuelles

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 passible de 3 750 € d'amende. De même, la réalisation d'un test génétique en dehors des domaines médical et scientifique est interdite et passible 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