

I. Généralités

Question 1 : *Donnez la proposition contenant l'ensemble des réponses justes.*

1. La PCR utilise une polymérase stable à hautes températures car à chaque étape de l'amplification l'ADN double brin doit être dénaturé à la chaleur.
2. Un plasmide dépend de la machinerie moléculaire de la cellule hôte pour se répliquer.
3. Au cours du clonage, la méthode de sélection blanc-bleu permet d'éliminer les bactéries qui n'ont pas de plasmide.
4. La Taq Polymérase (*Thermophilus Aquaticus*) est une exonucléase.
5. Les protéines peuvent être séparés selon leur taille grâce à une technique appelée Western Blot.
6. Les protéines peuvent être séparés selon leur taille grâce à une technique appelée Southern Blot.
7. Au cours de l'électrophorèse, les fragments d'ADN les plus longs sont plus chargés que les courts et migrent ainsi plus vite vers l'électrode positive.
8. Les enzymes de restrictions sont des endonucléases qui reconnaissent toujours la même séquence d'acides nucléiques.
9. L'étude des ARNm permet un éclairage sur l'expression des gènes dans un tissu donné.
10. L'étude des ARN est plus délicate que celle de l'ADN car les ribonucléases (RNAses) sont très répandues, notamment dans le milieu extérieur.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A.	V	F	F	F	V	F	F	V	V	V
B.	V	F	F	F	F	F	F	V	V	V
C.	V	F	V	F	F	V	V	V	V	V
D.	V	V	F	V	V	F	V	F	F	F
E.	V	V	F	F	F	F	F	V	V	V

II. Applications

Les **amyotrophies spinales proximales** sont un groupe de maladies héréditaires **autosomiques récessives** qui se caractérisent par une faiblesse musculaire, et par une atrophie des muscles de la racine des membres et du tronc. Ces affections sont dues à la dégénérescence des motoneurones innervant ces muscles. Il existe diverses formes de la même maladie, présentant des différences considérables du point de vue de l'âge d'apparition, de la gravité des symptômes et du pronostic. Cependant elles sont toutes dues à une anomalie génétique d'un même gène :

SMN (*Survival Motor Neuron*) code pour une protéine impliquée dans le développement des axones et dendrites des motoneurones.

Dans les conditions physiologiques, le gène SMN est présent sous deux formes par chromosome :

→ **SMN1** : code pour la protéine SMN fonctionnelle.

→ **SMN2** : est très ressemblant à SMN1 mais il possède notamment une mutation dans l'exon 7 qui a pour conséquence d'interrompre la transcription de cet exon 7. Ceci aboutit donc à la formation d'une protéine instable, qui est rapidement dégradée. (*figure 1*)

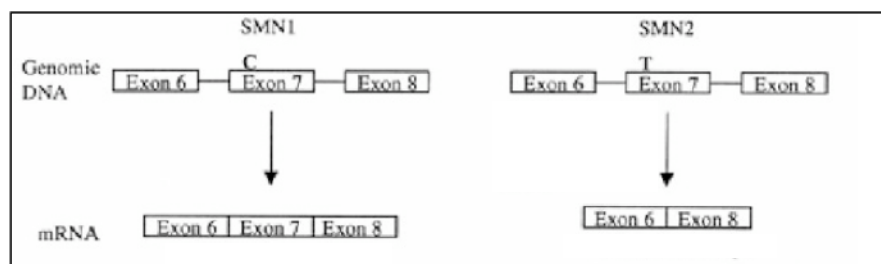
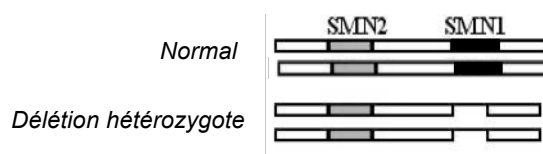


Figure 1

Un individu sauvage a donc deux copies de SMN1 et deux copies de SMN2.
On sait que 95% des ASP sont dues à une délétion homozygote de SMN1.

Figure 2 : Représentation des chromosomes 5 chez un individu sain et un individu atteint d'ASP.



Un jeune enfant présente un retard de développement (posture, tonus) et une insuffisance respiratoire. La biopsie musculaire est compatible avec une ASP, mais la confirmation doit se faire par diagnostic moléculaire.

Sur un prélèvement sanguin, on réalise une PCR avec une amorce dirigée contre une séquence commune aux gènes SMN1 et SMN2. Le fragment amplifié fait 200pb.

Ensuite, on réalise une digestion par une enzyme de restriction appelée Dde1. La séquence qu'elle reconnaît est : **C-T-X-A-G** (où X est n'importe quelle base)

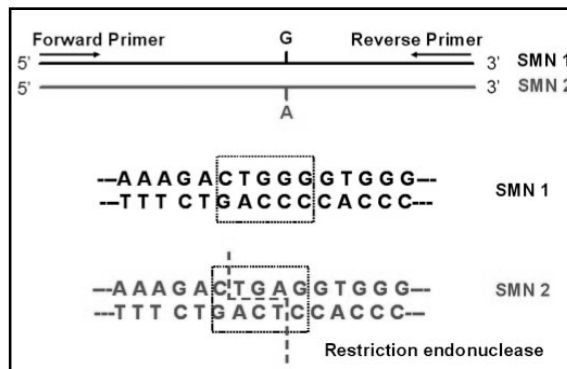


Figure 3 : Séquence d'un fragment de l'exon 8 des gènes SMN1 et SMN2.

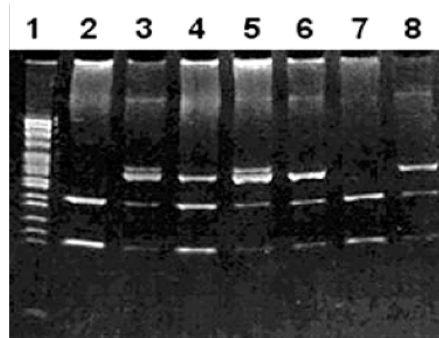
Question 2 : donnez la proposition contenant les réponses justes.

1. La PCR permet d'amplifier les deux formes du gène SMN.
2. La PCR ne peut amplifier qu'un seul gène à la fois dans un même échantillon.
3. Le but de la digestion enzymatique est d'empêcher l'amplification du gène SMN2.
4. La figure 3 montre que Dde1 ne va pouvoir cliver que SMN2.
5. L'ajout de Dde1 permet de dégrader l'ADN génomique après amplification.

A. 2, 3,	B. 2, 4	C. 1, 3	D. 1, 4	E. 1, 3, 4
----------	---------	---------	---------	------------

Après la digestion enzymatique, on procède à une électrophorèse sur gel. L'image obtenue après révélation à l'autoradiogramme est la suivante :

Figure 4 : Electrophorèse sur gel : Dans chaque puits, on a déposé l'ADN de patients différents, après digestion par Dde1.



Question 3 : donnez la proposition contenant les réponses justes.

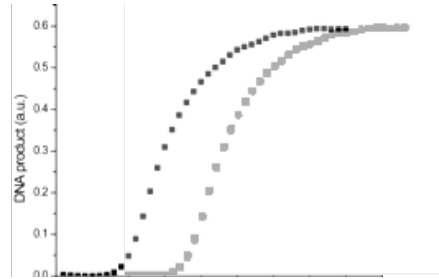
1. Le puits 1 correspond aux fragments issus de la digestion enzymatique de SMN2 par Dde1.
2. Dde1 a coupé SMN2 en deux fragments : un de 122pb, un de 78pb.
3. L'ADN du puits 2 appartient à un patient qui a une délétion hétérozygote de SMN1.
4. L'ADN du puits 2 appartient à un patient qui a une délétion homozygote de SMN1.
5. Le résultat du puits 6 est compatible avec une délétion hétérozygote de SMN1.

A. 1,3	B. 2,4,5	C. 2,3	D. 2	E. 2,4
--------	----------	--------	------	--------

La mère de ce jeune garçon veut un autre enfant et souhaite savoir si elle est porteuse d'anomalies transmissibles de ce gène, pour connaître le risque pour son deuxième enfant d'être atteint d'ASP.

On effectue une PCR quantitative avec une amorce qui vise une séquence spécifique du gène *SMN1*, voici le résultat :

*Figure 5 : Résultat de la PCR quantitative :
L'échantillon du témoin (individu sain) est en noir,
L'échantillon de la mère est en gris.*



Question 4 : donnez la proposition contenant les réponses justes.

1. La PCR quantitative nous aide ici à savoir si le gène *SMN2* est dupliqué.
2. Le résultat de la **figure 5** est compatible avec le fait que la mère ait une délétion hétérozygote de *SMN1*.
3. La PCR quantitative est une technique qui permet de doser la quantité de gène présent dans les 2 échantillons initiaux.
4. Dans la **figure 3**, le puits 4 aurait pu être celui de cette patiente.
5. La maman a 50% de chance de transmettre sa délétion à son prochain enfant.

A. 2,3,4,5	B. 1,2,3,4,5	C. 2,3,5	D. 3,5	E. 3,4,5
------------	--------------	----------	--------	----------

* **Fin** *