

Questions des étudiants :

- 1- A propos de la NGS, je ne comprends pas pourquoi au début il est dit que les adaptateurs p1 se fixent en 5' et plus tard il est dit "hybridation de l'amorce verte sur p1 en 3' ".

Est-ce qu'il faut connaître les lieux où se fixent les adaptateurs p1 et A? Et si oui pourquoi ils sont-ils situés à des endroits différents?

Après la fragmentation de l'ADN génomique, les adaptateurs P1 sont hybridés en 5' et les adaptateurs A en 3' de ces fragments. Il ne vous est pas demandé de retenir cette précision (P1 en 5' et A en 3') **MAIS** ce que vous devez retenir et de **comprendre** c'est l'intérêt d'ajouter 2 types d'adaptateurs : un en 5' et un en 3' sur l'ADN génomique fragmenté. En effet, ceci permet d'obtenir des fragments d'ADN qui auront les mêmes séquences en 5' (correspondant à un type d'adaptateur) et les mêmes séquences en 3' (correspondant à l'autre type d'adaptateur). (Les adaptateurs 5' et 3' ont des séquences différentes entre eux bien évidemment). S'il n'y avait pas cette étape nous aurions des fragments d'ADN dont les extrémités seraient différentes. Pour pouvoir amplifier l'ensemble des fragments, l'ajout de ces adaptateurs permet donc d'amplifier **l'ensemble** des fragments en utilisant uniquement 2 amorces (1 complémentaire de l'adaptateur 5' et 1 autre complémentaire de l'adaptateur 3'), sans cette étape il serait impossible d'amplifier la totalité de l'ADN génomique fragmenté puisque les séquences de ces fragments sont tous différents.

Dans la suite du cours, au moment de l'amplification clonale, il est dit hybridation de l'amorce verte sur P1 en 3'. Il faut comprendre que le primer (rose et vert sur la diapo) va s'hybrider en complémentarité des bases sur la région P1 du fragment d'ADN. L'ADN double brin possède un brin orienté de 5' en 3' et l'autre brin orienté de 3' et 5'. A la 1ère étape de la PCR en émulsion c'est le brin 3'-5' qui est utilisé donc le primer (rose et vert sur la diapo) va s'hybrider à l'extrémité 3' de ce brin d'ADN.

2- Concernant le clonage moléculaire, il est dit : "Seules les bactéries ayant intégré l'ADN recombinant seront résistantes à l'antibiotique", mais si ADN recombinant = vecteur + insert et l'antibiotique permet de sélectionner les bactéries qui ont intégré le vecteur, une bactérie peut-elle résister en ayant intégré un vecteur qui lui n'a pas intégré l'insert? **OUI, du moment que le plasmide est intégré (plasmide avec ou sans insert), le gène de résistance à l'antibiotique pourra s'exprimer et donc conférer une résistance des bactéries à l'antibiotique.**

Est-ce que le mot "seules" ne rend pas la phrase fautive? **Sortie du contexte effectivement la phrase est fautive. Sur la diapo (si nous parlons bien de la même diapo) les vecteurs sans insert ne sont pas mentionnés. Si ce n'est pas cette diapo, alors c'est un abus de langage de ma part. Seules les bactéries sans plasmide ne seront pas capables de pousser à cause de l'antibiotique. Ce n'est pas l'ajout de l'insert qui confère la résistance à l'antibiotique.**

3- Concernant l'item " on va donc réaliser une ponction amniotique" à propos diagnostic d'achondroplasie:

Je ne savais comment l'interpréter car on a vu que maintenant on pouvait le diagnostiquer sans faire de ponction amniotique, qu'on le faisait uniquement si la PCR révélait une achondroplasie et qu'on devait donc le confirmer en faisant une amniocentèse.

Pouvez-vous réexpliquer cette partie du cours s'il-vous-plaît?

Suite à des signes échographiques particuliers (fémurs courts notamment) on **suspecte** la présence d'une achondroplasie. Le seul moyen d'en faire le diagnostic c'est de rechercher la mutation dans le gène *FGFR3* chez le fœtus. Pour cela, on réalise une ponction amniotique à partir de laquelle on extrait l'ADN génomique qui permettra de rechercher la mutation par PCR-RFLP. L'identification de la mutation confirmera alors le diagnostic d'achondroplasie.

Je pense qu'il y a une confusion avec le cours sur le DPNI où là on va **Dépister** une trisomie à partir d'une prise de sang chez la mère et si le DPNI est positif on confirmera l'anomalie chromosomique par caryotype à partir d'une ponction amniotique.

4- Dans la première partie du diapo, il est dit :

“précipitation à l'éthanol : 2,5 volumes d'éthanol à 95° froid (-20°) en présence de sel”

Mais ensuite sur l'image du diapo on peut lire :

“récupération de la méduse lavée en éthanol 70°”

Je ne comprends pas ce que veut dire à 95° froid (-20°), cela veut dire qu'on diminue la température jusqu'à 75° de l'éthanol ? Ou bien nous utilisons deux solutions d'éthanol de concentrations différentes ?

Il faut distinguer les degrés d'alcool et les degrés celsius

La précipitation de l'ADN nécessite de l'éthanol quasiment absolu à 95° (d'alcool), du froid (-20°C, les tubes sont placés au congélateur) et des sels. Après, la méduse d'ADN est lavée, on veut se débarrasser des sels ajoutés précédemment et pour cela on utilise **une autre solution** d'éthanol, plus diluée, à 75° (d'alcool). L'eau présente dans cette solution d'éthanol permettra de dissoudre les sels.

5- Quelle est la différence entre les sites donneurs et accepteurs d'épissage ?

Est-ce que la différence entre un site cryptique et un site donneur/accepteur est juste que le site cryptique est dans l'intron alors que les sites donneur/accepteur sont aux limites de l'intron ?

Le site donneur d'épissage est le site localisé à l'extrémité 5' de l'intron à épisser (début de l'intron), souvent une séquence GU

Le site accepteur d'épissage est le site localisé à l'extrémité 3' de l'intron à épisser (fin de l'intron) souvent une séquence AG

Un site cryptique d'épissage est un site qui habituellement n'est pas utilisé pour l'épissage.

Dans l'exemple du cours la mutation induit un nouveau site cryptique accepteur d'épissage.

6- A propos du clonage moléculaire, on dit qu'on va placer l'insert dans un plasmide double brin.

Pourtant, cet ARNm qu'on a récupéré puis qu'on a transcrit en ADNc est bien simple brin (c'est la définition de l'ARN non) ?

Comment obtient-on un insert double brin que l'on va mettre dans un plasmide double brin si on a qu'un brin d'ADN ?

Effectivement après synthèse d'un ADNc on a un ADN simple brin mais avant de cloner cet ADNc dans un plasmide il y a une étape de PCR qui permet d'amplifier l'ADNc pour l'avoir en quantité suffisante pour faire le clonage et du coup l'insert est un ADN double brin

7- Concernant la transformation bactérienne :

Est-ce possible que deux ADN recombinants entrent dans la cellule procaryote ?

Je ne pense pas que ce soit possible vu que le but est d'avoir un clonage pur mais du coup comment se fait-il que seul un ADN recombinant puisse entrer ?

Lors de la transformation bactérienne le but est qu'un seul ADN recombinant entre dans la bactérie. Ce sont les préparations des bactéries, les conditions expérimentales qui font qu'un seul ADN recombinant entre dans la bactérie. (il n'est pas totalement exclu que plusieurs ADN recombinants puissent entrer mais la probabilité que cela se fasse est tellement faible qu'elle est négligeable). Pour cette étape il faut retenir qu'après la transformation Bact on a soit

- un ADN recombinant (vecteur-insert) – 1 Bact.
- un vecteur vide (sans insert) – 1 Bact.
- 1 Bact sans vecteur vide ou ADN recombinant

8- Dans le cours il est dit que la NGS peut théoriquement être utilisée pour une mutation ciblée, est-ce qu'il faudrait compter juste un item "Vous souhaitez identifier une mutation ciblée, vous utiliserez le NGS" ou cela est vraiment restreint à la PCR séq/digestion ?

Le NGS est une technique de séquence ultra puissante puisqu'on peut séquencer la totalité du génome d'un individu donc par NGS on peut détecter une mutation ciblée (puisque on séquence tout !!!) cependant ce n'est pas du tout l'approche utilisée en laboratoire (c'est comme prendre un avion pour faire 50km, « c'est possible » mais ce n'est pas ce que l'on fait)

Donc l'item est considéré comme faux car pour rechercher une mutation ciblée on ne va pas utiliser le NGS

9- A propos de la PCR dans un réacteur, il est dit que la première étape est celle de la dénaturation de l'ADN. Or il me semblait que dès la première étape de la NGS (dénaturation puis sélection des gènes d'intérêt par une sonde d'ARN) on avait déjà des brins simples.

Je ne comprends pas à quoi sert l'étape de dénaturation?

Il y a une étape de dénaturation car entre la capture et l'amplification clonale il y a une étape de PCR avec très peu de cycles qui sert juste à amplifier le matériel génétique. Dans le cours, je ne vous présente pas toutes les étapes détaillées mais les principales étapes pour que vous reteniez les grandes lignes.

*Pour information (hors cours !!!!), vous pouvez trouver des étapes de dénaturation même lorsqu'on travaille sur un matériel simple brin ; cette étape permet alors d'avoir un ADN simple brin **linéaire** évitant ainsi les repliements du simple brin sur lui-même.*

10- Voici le QCM sur lequel je me pose une question:

QCM 3 : Vous suspectez la présence de la mutation c.323A>G du gène XYZ dans une famille. La séquence nucléotidique qui encadre cette mutation sur un allèle muté est la suivante (position 323 soulignée) :
ACGTTGGAGTTAAACG

Vous voulez réaliser une PCR qui encadre cette mutation, suivie d'une digestion enzymatique, pour la rechercher.

Vous disposez des enzymes de restriction suivantes :

EcoR I, site de restriction : GTTGGGA

BamH I, site de restriction : GGACTT

Hpa I, site de restriction : GGAATT

Sma I, site de restriction : GTTAAA

Quelle(s) enzyme(s) de restriction sera(ont) informative(s) pour détecter l'absence de la mutation ?

Indiquez-la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Sma I et Hpa I
- B) Hpa I uniquement
- C) Sma I uniquement
- D) BamH I uniquement
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

La correction est A. Or, si Sma1 et Hpa1 ensemble permettent de détecter l'absence de mutation, je n'arrive pas à comprendre pourquoi ils ne la détecteraient pas non plus séparément, et donc pourquoi les réponses B et C ne sont pas comptées comme justes ?

Je pense qu'il y a un souci sur ce sujet, pouvez-vous me renvoyer le sujet avec la position de la mutation 323 soulignée et en fonction il faut voir mais je ne pense pas que la proposition A soit la bonne réponse.

11- Pourquoi ne pouvons-nous pas utiliser la PCR en temps réel pour étudier les remaniements chromosomiques ?

En PCR en temps réel la taille des fragments PCR est d'environ 300pb alors que les remaniements chromosomiques concernent des régions très grandes de chromosomes. On est pas du tout sur la même échelle d'ordre de grandeur. La PCR en temps réel permet de quantifier et les remaniements chromosomiques n'induisent pas forcément un ajout une diminution de matériel génétique. Pour certains remaniements il s'agit d'une inversion d'un morceau de chromosome par un autre.

Par contre, mais nous n'avons pas le temps de l'aborder en détail dans ce cours (ce sera pour votre 3^{ème} année !!!!) des remaniements chromosomiques identifiés en CGH-Array (qui est une technique entre la biologie moléculaire et la cytogénétique justement) peuvent être confirmés en PCR en temps réel mais ceci n'est pas du tout au programme de PACES.

12- Dans la première partie du programme, il est dit que l'élongation se fait à 72°, cependant dans la deuxième partie, elle est dite à 60° car c'est la température optimale de la Taq, quelle est la température de l'élongation ?

Il existe plusieurs sortes de Taq Polymérase utilisables en PCR, selon l'enzyme la température optimale varie de 60 à 72°C. La température d'élongation doit donc correspondre à la température optimale de l'enzyme utilisée.

13- Voici le QCM qui me pose problème :

QCM 8 : Vous réalisez le clonage du gène codant pour la bêta-galactosidase dans le plasmide pBluescriptII qui contient un gène de résistance à l'ampicilline. Les ADN recombinants sont introduits dans les bactéries compétentes par choc thermique. On met ensuite les bactéries en culture sur boîte de pétri contenant de l'ampicilline. Concernant les bactéries qui vont se développer, indiquez-la ou les réponse(s) exacte(s) :

- A) Aucune bactérie ne se développe
- B) Les bactéries contenant un plasmide avec insert se développent
- C) Toutes les bactéries se développent
- D) Les bactéries contenant un plasmide vide se développent
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Je ne comprends pas pourquoi l'item D est compté vrai dans la correction.

Si ceux qui ont l'insert ET ceux qui sont vides se développent alors pourquoi l'item C est-il compté faux?

L'item D est vrai (cf. questions précédentes) car un plasmide sans insert apporte le gène de résistance à l'antibiotique donc les bactéries vont pousser.

L'item C est faux car dans « toutes les bactéries » cela comprend les bactéries sans plasmide, sans ADN recombinant qui elles ne pousseront pas

Quel est l'intérêt d'avoir fait cela ? ????