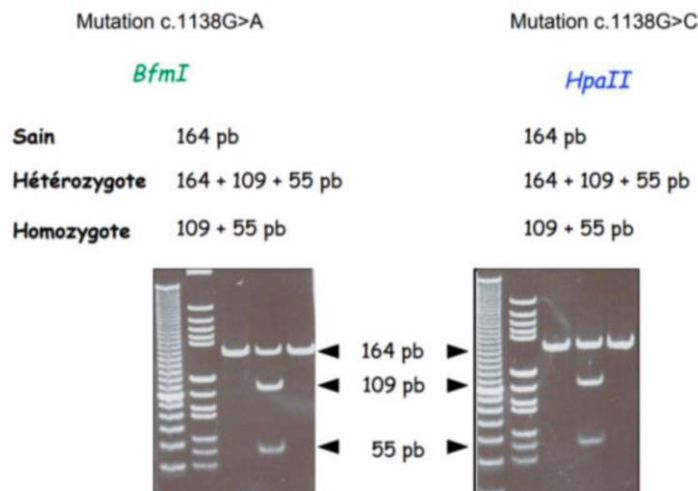


# Questions des étudiants

## Question 1 :



Sur un gel comme ci-dessus (extrait de la diapositive) pourrions-nous en tirer des conclusions malgré l'absence de témoins négatifs ?

Vous pouvez interpréter les résultats présentés sur ces gels en l'absence des témoins négatifs. Les témoins négatifs sont indispensables pour l'étape précédente de cette expérience c'est-à-dire pour l'étape de PCR pour vérifier qu'il n'y a pas de contamination au moment de l'amplification PCR. Sur les gels présentés ici, il s'agit du résultat de la PCR **après digestion enzymatique**, les témoins négatifs ne sont pas indispensables.

## Question 2 :

Considérez-vous que la soude dénature les protéines et que le SDS dénature la paroi bactérienne ou bien que les deux produits dénaturent indifféremment la paroi et les protéines.

Soude et SDS dénaturent la paroi bactérienne

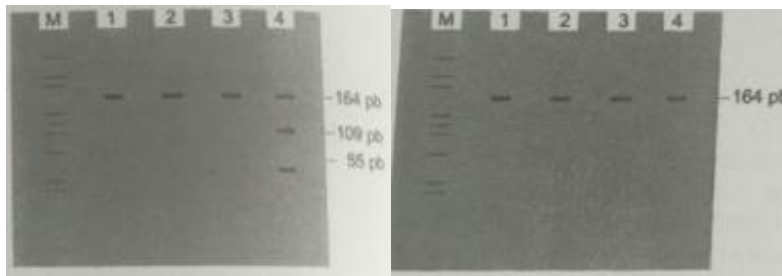
Pour les protéines le SDS dénature les protéines et la soude précipite les protéines

## Question 3 :

Pouvez vous revenir sur ce qcm tombé au concours en 2013 ?

Vous suspectez un diagnostic d'achondroplasie chez un petit garçon qui vient de naître. Pour confirmer ce diagnostic, vous avez amplifié un fragment du gène FGFR3 à partir de l'ADN des 2 parents et des 2 enfants de cette famille. Le fragment amplifié a une taille de 164 paires de bases (pb) et comporte le nucléotide qui s'avère être muté (en position c.1138) en cas d'achondroplasie. En l'absence de mutation, le fragment amplifié n'est pas digéré par les enzymes de restriction utilisées. A présence de la mutation c. 1138G>A entraîne la coupure de l'amplicon par BfmI en 2 fragments de 55 et 109 paires de bases. La présence de la mutation c. 1138G>C entraîne la coupure de l'amplicon par HpaII en 2 fragments de 55 et 109 paires de bases. Les gels ci-dessous sont obtenus après

digestion des produits d'amplification par Bfml (gel de gauche) ou HpaII (gel de droite) et migration électrophorétique.



M : marqueur de poids moléculaire

Piste 1 : mère

Piste 2 : père

Piste 3 : soeur aînée

Piste 4 : garçon nouveau-né

Concernant l'interprétation des gels, donnez la(les) proposition(s) exacte(s) :

- A) Les parents sont hétérozygotes pour la mutation c. 1138G>A
- B) Les parents sont hétérozygotes pour la mutation c. 1138G>C
- C) Le diagnostic d'achondroplasie n'est pas confirmé chez l'enfant atteint
- D) Le diagnostic d'achondroplasie est confirmé chez l'enfant atteint
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Gel de gauche = résultat après digestion Bfml / Gel de droite = résultat après digestion HpaII

Les 2 enzymes Bfml et HpaII permettent de faire la différence entre la mutation c. 1138G>A et c. 1138G>C

Gel de gauche : pas de digestion pour les PCR réalisées à partir des prélèvements des parents et de la sœur aînée, on retrouve le fragment PCR à 164pb donc pas de mutation c. 1138G>A. Piste 4 : on observe les produits de digestion à 55 et 109pb + fragment à 164pb (PCR non coupée), la mutation c. 1138G>A est présente à l'état hétérozygote,

Gel de droite : aucune digestion par HpaII donc absence de la mutation c. 1138G>C.

Le diagnostic d'achondroplasie est confirmé chez l'enfant atteint (Réponse D = Juste) puisqu'il est porteur de la mutation 1138G>A qui est responsable d'achondroplasie

#### **Question 4 :**

Une étudiante se demande pourquoi on peut dire que les extrémités cohésives ont une aide à l'insertion et à l'orientation.

Les extrémités 3' ou 5' sortantes correspondent à de courtes séquences simple brin donc grâce à la complémentarité des bases, les extrémités de l'insert et du vecteur vont se « reconnaître » ce qui va à la fois aider à l'insertion et à l'orientation

#### **Question 5 :**

Dans le Séquençage Haut Débit (NGS) lors de la capture des régions d'intérêt par des sondes ARN biotinylées, une étudiante se demande comment peut on utiliser les sondes ARN complémentaires

de l'ADN à séquencer sachant que l'on cherche justement à séquencer ces régions ADN. Comment peut-on connaître à l'avance son complémentaire ?

La séquence complète du génome humain est connue, la séquence des gènes également. Les sondes ARN sont donc synthétisées pour être complémentaire à ces séquences. Au moment de la capture, les conditions d'hybridation sont faites de telle sorte que la présence d'une mutation n'empêche pas l'hybridation et donc la capture.

#### **Question 6 :**

Un étudiant se demande comment le clonage moléculaire permet de séparer l'allèle maternel de l'allèle paternel.

C'est le principe même du clonage qui est d'isoler et d'amplifier séparément des fragments d'ADN. L'ensemble des fragments sont séparés individuellement donc forcément les fragments PCR provenant de l'allèle maternel et paternel. Rien n'oriente le choix de tel ou tel fragment à l'étape du clonage. C'est à la fin, lorsqu'on analyse les clones par séquençage par exemple que l'on peut savoir quel clone correspond à la PCR de l'allèle maternel ou paternel

#### **Question 7 :**

Un item pose problème aux étudiants, « Lors de la préparation des échantillons, la séquence des adaptateurs ajoutés aux fragments d'ADN doit être complémentaire à la région du gène à séquencer »

Cet item est faux, les étudiants se demandent pourquoi.

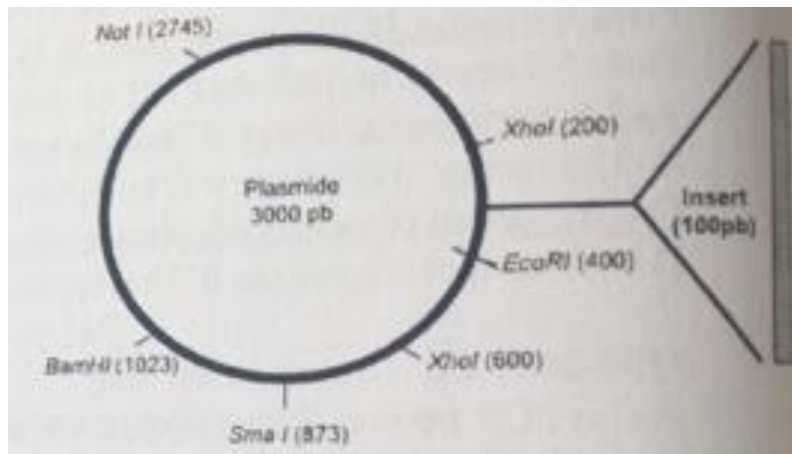
Les adaptateurs sont identiques pour l'ensemble des fragments d'ADN. Tous les adaptateurs qui s'hybrident à l'extrémité 5' des fragments d'ADN ont la même séquence et tous les adaptateurs qui s'hybrident à l'extrémité 3' des fragments d'ADN ont la même séquence (les 2 types d'adaptateurs 5' et 3' ayant des séquences différentes). C'est le principe même du NGS qui permet, grâce à l'utilisation de ces adaptateurs, d'amplifier l'ensemble des fragments d'ADN avec un seul couple de primer.

#### **Question 8 :**

**Pouvez vous revenir sur ce qcm tombé au concours en 2017 ?**

***OK mais ce QCM a été modifié .... Je corrige donc sur votre version***

Vous souhaitez isoler, par clonage moléculaire, les produits PCR provenant d'un patient porteur d'une mutation à l'état hétérozygote. La taille du produit PCR est de 100 pb et la présence de la mutation clive le produit PCR en 2 fragments de 50pb (pb : paires de bases). Le produit PCR est inséré en position 300 sur le plasmide. La carte de restriction est schématisée ci-dessous. Les positions des sites de coupures sur le plasmide pour les enzymes de restriction (EcoRI, SmaI, NotI, XhoI et BamHI) sont figurées. Hormis le site EcoRI, l'insert ne comporte aucun des sites présents sur le plasmide. Après digestion par différents enzymes de restriction, les produits de digestion sont analysés sur un gel d'agarose après migration électrophorétique. Donnez la(les) vraie(s) :



A) La digestion simultanée par XhoI et EcoRI libère des fragments à 200pb + 2600pb pour un ADN recombinant contenant un insert porteur de la mutation

Il faut faire le calcul en tenant compte de la coupure par EcoRI dans l'insert si celui-ci contient la mutation. (Attention il manque dans votre énoncé une information capitale : La taille du produit PCR est de 100pb et la présence de la mutation crée un site *EcoRI* qui clive le produit PCR en 2 fragments de 50pb (pb : paires de bases).)

Insert avec la mutation : EcoRI coupe l'insert

Digestion XhoI + EcoRI : on attend 2 fragments de **150pb** provenant de la digestion XhoI (200) et EcoRI dans l'insert => 300 étant la position d'insertion =>  $(300 - 200 = 100) + 50$  (provenant de l'insert) = 150pb

2ème fragment à 150pb provenant de 300 (site d'insertion) – 400 (site EcoRI (400) + 50 provenant de l'insert =  $(400 - 300) + 50 = 150$ pb

On attend également un fragment à 200 :  $(XhoI\ 600) - (EcoRI\ 400) = 200$ pb

On attend également le fragment restant cad **2600pb**  $(XhoI\ (600) - 3000\ \text{taille du vecteur} + 200\ (\text{Site XhoI}\ 200))$

⇒ Item Faux

B) La digestion simultanée par XhoI et EcoRI libère des fragments à 150pb + 200pb + 2600pb pour un ADN recombinant contenant un insert porteur de la mutation

⇒ Item **Juste voir calcul précédent**

C) La digestion simultanée par XhoI et EcoRI libère des fragments à 200pb + 300pb + 2600pb pour un ADN recombinant contenant un insert ne portant pas la mutation

Digestion XhoI + EcoRI : on attend 1 fragment de **300pb** provenant de la digestion XhoI (200) et EcoRI EcoRI (400) – pas de digestion dans l'insert puisque pas de mutation donc on ajoute 100pb correspondant à l'insert :  $400 - 200 + 100 = 300$

On attend également un fragment à 200 :  $(XhoI\ 600) - (EcoRI\ 400) = 200$ pb

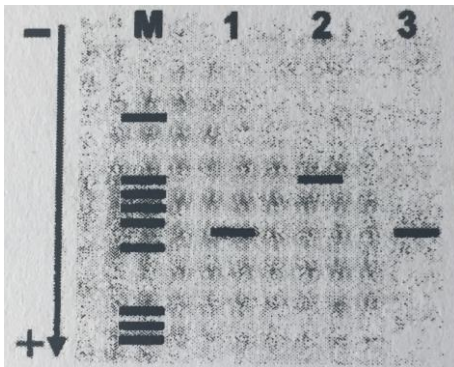
On attend également le fragment restant cad **2600pb**  $(XhoI\ (600) - 3000\ \text{taille du vecteur} + 200\ (\text{Site XhoI}\ 200))$

D) La digestion par XhoI permettra de différencier les ADN recombinants portant l'insert avec la mutation de ceux portant l'insert sans la mutation

Faux c'est la digestion EcoRI qui permet de faire la différence

E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

### Question 9 :



A propos de cette image, sachant que la piste 3 est le témoin négatif, les étudiants se demandent s'il est toujours possible de décrire la taille des fragments les uns par rapport aux autres malgré la présence d'une contamination

D'après le témoin négatif il y a une contamination, la PCR devra donc être refaite et ne peut pas être utilisée maintenant rien ne vous empêche d'interpréter la taille des fragments à savoir que le fragment dans la piste 2 par exemple est plus grand que celui des pistes 1 et 3 .....

### Question 10 :

Après un ancien qcm du Tutorat les étudiants se demandent si une enzyme qui permet de détecter une absence de mutation sont forcément des enzymes coupant l'allèle non muté ou alors une enzyme qui permet de détecter la présence d'une mutation en coupant l'allèle mutée permet aussi d'en détecter l'absence en ne coupant pas notre allèle non muté.

La formulation est compliquée .... Effectivement si l'enzyme coupe l'allèle non muté c'est qu'elle permet donc de détecter l'allèle WT (donc absence de mutation)

A l'inverse si l'enzyme reconnaît détecte l'allèle mutée, l'absence de coupure doit correspondre à une absence de mutation.

Commentaire : Il est tjs difficile de se baser sur des absences de digestion pour conclure car différents paramètres peuvent abolir la digestion enzymatique. C'est pourquoi dans ce cas on utilisera des témoins de digestion pour vérifier les conditions expérimentales.

### Question 11 :

**Pouvez vous revenir sur ce qcm tombé au concours en 2017 ?**

Vous recherchez la présence d'un variant d'épissage dans le gène WFS1 chez un patient suspect de syndrome de Wolfram. Vous effectuez une extraction d'ARN, suivie d'une étape de transcription inverse pour synthétiser l'ADNc (ADN complémentaire) correspondant. Vous réalisez ensuite deux PCR (PCR 1 et PCR 2) pour cibler les régions d'intérêt du gène. Le schéma A représente l'ADNc du gène WFS1, la stratégie PCR est représentée par des flèches, les 8 exons par des rectangles. Le résultat obtenu après migration électrophorétique sur gel d'agarose des produits PCR est représenté sur le schéma B. Donnez la(les) vraie(s) :

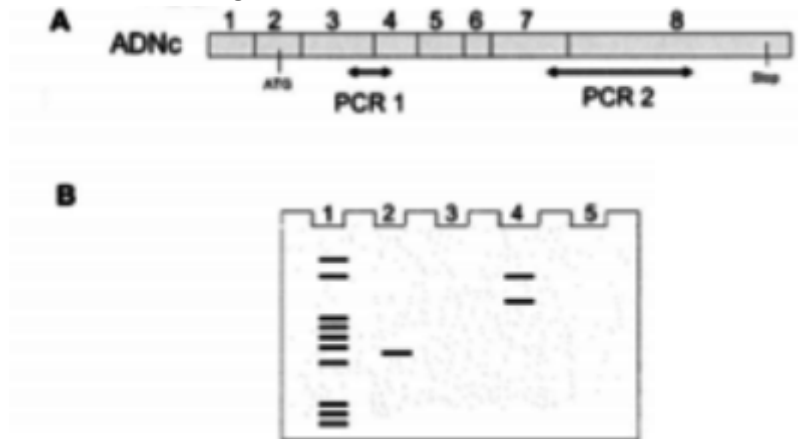
Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire

Piste 2 : Produit PCR obtenu avec la PCR 1

Piste 3 : témoin négatif de PCR obtenu avec la PCR 1

Piste 4 : Produit PCR obtenu avec la PCR 2

Piste 5 : témoin négatif de PCR obtenu avec la PCR 2



- A) Un variant d'épissage à l'état homozygote est suspecté entre l'exon 3 et l'exon 4
- B) Un variant d'épissage à l'état hétérozygote est suspecté entre l'exon 3 et l'exon 4
- C) Un variant d'épissage à l'état homozygote est suspecté entre l'exon 7 et l'exon 8
- D) Un variant d'épissage à l'état hétérozygote est suspecté entre l'exon 7 et l'exon 8
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Les propositions A et D sont justes, A car on voit qu'une seule bande dans la piste 2 et d'après les données de l'énoncé on peut suspecter un variant d'épissage homozygote car il n'est pas spécifier quelle est la taille de la PCR sans variant d'épissage. D : 2 bandes pouvant faire suspecter un variant hétérozygote.