

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Questions isolées

Question 1

Question à réponse ouverte et courte

Soit une maladie génétique récessive touchant 1/10000 dans la population générale. Quelle est la fréquence de l'allèle muté?

Réponse :

Question 2

Question à Réponse Ouverte et Longue

Expliquez le terme de « thérapie génique *in vivo* »

Réponse :

Question 3

Question à réponses multiples

Quelles pathologies sont systematiquement dépistées chez le nouveau né?

A - ☐ L'hyperplasie congénitale des surrénalesB - ☐ Hyperthyroïdie congénitaleC - ☐ mucoviscidoseD - ☐ La drépanocytoseE - ☐ hypothyroïdie congénitaleF - ☐ Diabète de type 1G - ☐ phénylcétonurieH - ☐ Asthme

Question 4

Question à réponse ouverte et courte

Quel est le risque pour la fille d'un papa hémophile d'avoir un enfant hémophile? (en considérant que son mari n'est pas hémophile)

Réponse :

Question 5

Question à réponse ouverte et courte

Expliquer ce qu'est une maladie génétique à pénétrance incomplète

Réponse :

Citez 2 techniques permettant d'inhiber ou de diminuer l'expression d'une protéine

Réponse :

UE PL2.18 Dossier 2

Soit une maladie génétique dont l'origine est une mutation en position 3876 de l'ADN génomique avec la transformation d'une Cytosine en Adénine

Il s'agit

A - ☐ D'une délétion

B - ☐ D'une mutation "frameshift"

C - ☐ D'une insertion

D - ☐ D'une mutation silencieuse

E - ☐ D'une substitution

Quelle est la formule nucléotidique de cette mutation

Réponse :

Cette mutation entraîne la transformation d'un codon UAC en un codon UAA. Quelle est l'implication de cette mutation au niveau de la protéine?

LE CODE GENETIQUE

		ARN messenger Codon : deuxième base azotée				
		U	C	A	G	
ARN messenger Codon : première 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
		ARN messenger Codon : troisième base azotée				

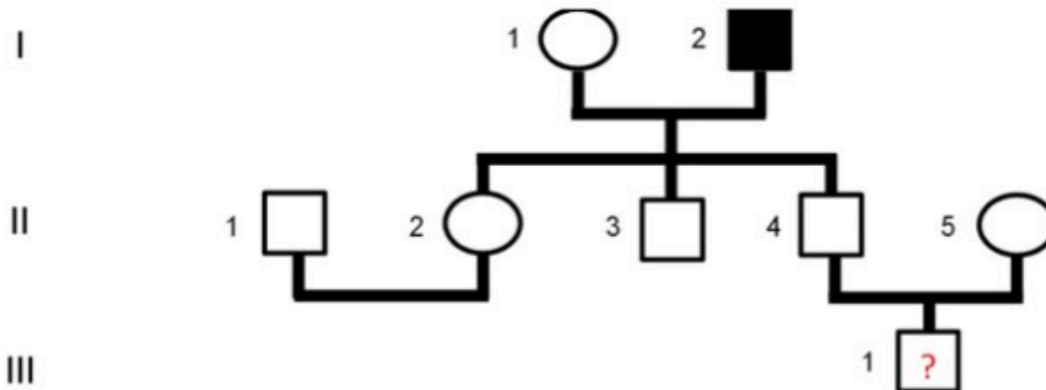
Réponse :

Comment appelle t'on ce type de mutation

- A - ☐ Mutation faux sens
- B - ☐ Mutation silencieuse
- C - ☐ Mutation non sens
- D - ☐ Mutation vraie

UE PL2.18 Dossier 1

Soit l'arbre généalogique suivant. I2 est atteint d'une maladie autosomique récessive et I1 est homozygote. La fréquence des hétérozygotes est de 1/200 dans la population générale



Question 1

Question à réponse ouverte et courte

Quelles sont les caractéristiques d'une maladie autosomique récessive?

Réponse :

Question 2

Question à réponses multiples

Quel est le génotype de II3

- A - ☐ Hétérozygote
- B - ☐ Homozygote sain
- C - ☐ Le même que II2
- D - ☐ Homozygote muté
- E - ☐ Le même que I2

Question 3

Question à réponse ouverte et courte

Quel est le risque pour le couple II4 et II5 d'avoir un enfant malade?

Réponse :

Quel est le risque pour un couple de la population générale, d'avoir un enfant malade?

A - ☐ 0

B - ☐ 1/160000

C - ☐ 1/40000

D - ☐ 1

E - ☐ 1/80000

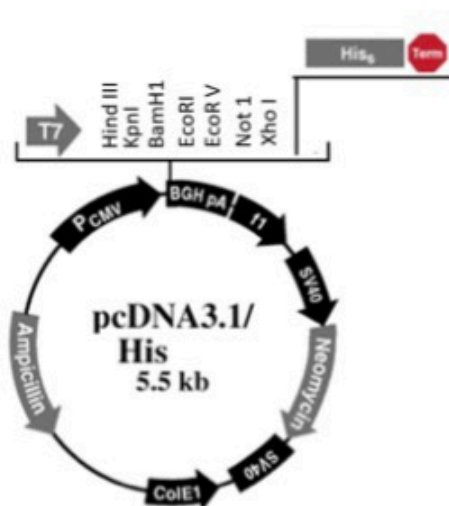
PL2.8 Biomol Ex clonage G-CSF

Le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), facteur de croissance hématopoïétique granulocytaire humain, est une glycoprotéine qui régule la production et la libération des polynucléaires neutrophiles fonctionnels à partir de la moelle osseuse. Chez certains patients une administration de ce facteur de croissance est indispensable. Le G-CSF est produit par génie génétique. Pour la bioproduction de ce biomédicament, le gène codant pour le G-CSF est cloné dans un plasmide.

Citez les 5 étapes pour réaliser le clonage du gène G-CSF dans un plasmide

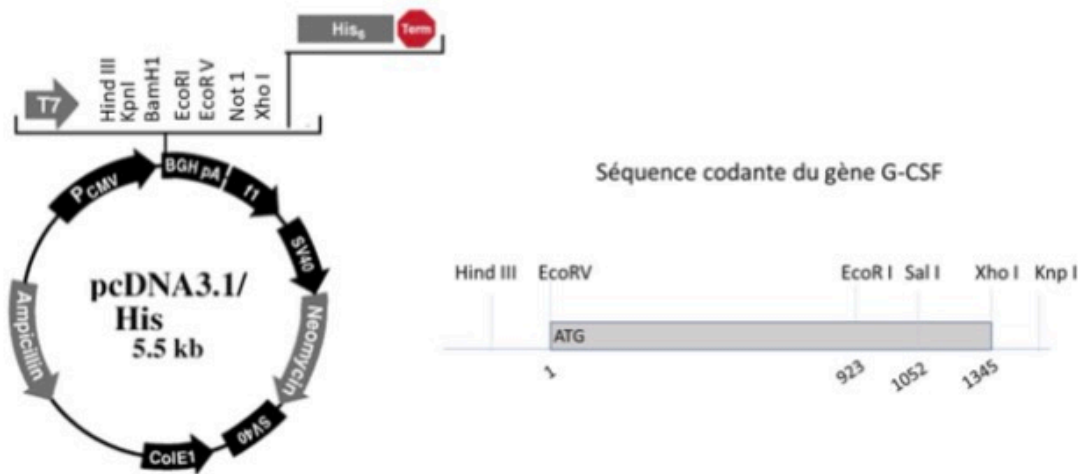
Réponse :

Le plasmide pcDNA 3.1 utilisé de 5 500 paires de bases est représenté dans la figure ci-dessous,



- A - ☐ Lors du clonage la séquence du gène G-CSF est intégré au niveau du site f1 (ou appelé ORI)
- B - ☐ La séquence "promoteur P_{CMV} " est indispensable pour la production de la protéine car active la transcription du gène
- C - ☐ Le site de clonage est constitué de séquences reconnues par des enzymes de restriction
- D - ☐ La séquence f1 (ou ORI) permet d'activer la transcription du gène G-CSF
- E - ☐ Ce plasmide est un plasmide d'expression

Les séquences du plasmide et du gène codant pour le G-CSF sont représentées dans la figure ci-dessous. Citez les couples d'enzymes qui peuvent être utilisées pour cloner le gène G-CSF dans le plasmide pcDNA? justifiez chaque réponse.



Réponse :

Question 4

Question à réponse ouverte et courte

Pour le clonage les enzymes EcoR V et Xho I ont été utilisés .
Quelle est la taille du plasmide recombinant?

Réponse :

Question 5

Question à réponses multiples

Suite à la ligation, un screening des bactéries est réalisé. Concernant ce screening :

- A - ☐ L' Ampicilline permet de sélectionner exclusivement les clones bactériens possédant le plasmide recombinant
- B - ☐ La néomycine permet d'obtenir exclusivement les clones bactériens possédant le plasmide recombinant
- C - ☐ L' Ampicilline permet de sélectionner exclusivement les clones bactériens possédant le plasmide non recombinant
- D - ☐ l'Ampicilline permet de sélectionner les clones bactériens possédant le plasmide recombinant et non recombinant
- E - ☐ La néomycine permet d'obtenir les clones bactériens possédant le plasmide recombinant et non recombinant

Question 6

Question à Réponse Ouverte et Longue

Pour le clonage les enzymes EcoR V et Xho I sont utilisées et différents clones bactériens ont été sélectionnés suite à la transformation. Les ADN des différents clones bactériens ont été purifiés et une digestion enzymatique avec les 3 enzymes EcoR V, EcoR I et Sal I a été réalisée. L'ADN digéré est analysé sur un gel d'agarose. Quels sont les tailles attendus des fragments d'ADN si la bactérie a intégré le plasmide recombinant et la taille attendu des fragments pour une bactérie ayant intégré le plasmide non recombinant?

Réponse :

Question 7

Question à réponse ouverte et courte

Afin de produire la protéine les cellules CHO sont utilisées. Pourquoi?

Réponse :

Question 8

Question à Réponse Ouverte et Longue

Après la transfection des cellules CHO avec le plasmide recombinant une sélection avec la Néomycine est réalisée. Expliquer pourquoi.

Réponse :

Question 9

Question à réponses multiples

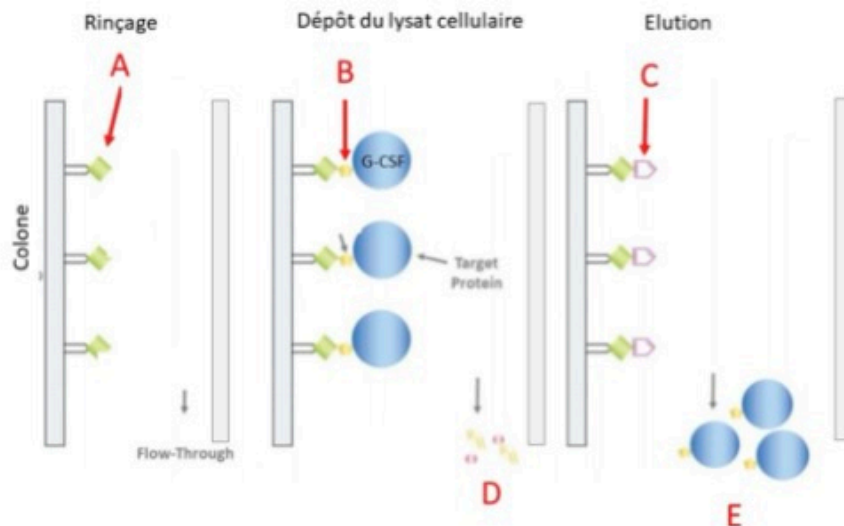
Une protéine de fusion du G-CSF avec une étiquette contenant 6 histidine (His) est réalisée.
A quoi peut servir cette étiquette?

- A - ☐ la production du G-CSF
- B - ☐ le screening des cellules
- C - ☐ La purification du G-CSF
- D - ☐ Identification du G-CSF
- E - ☐ la solubilisation de la protéine

Question 10

Question d'association

Une chromatographie d'affinité est réalisée afin de purifier la protéine G-CSF-His. Le schéma ci-dessous correspond aux différentes étapes de cette chromatographie.
A quoi correspondent les différents éléments de la colonne de chromatographie



A

- ☐ Nickel
- ☐ histidine
- ☐ imidazole
- ☐ tout sauf la protéine G-CSF His
- ☐ la protéine G-CSF-His

B

- ☐ Nickel
- ☐ histidine
- ☐ imidazole
- ☐ tout sauf la protéine G-CSF His
- ☐ la protéine G-CSF-His

C

- ☐ Nickel
- ☐ histidine
- ☐ imidazole
- ☐ tout sauf la protéine G-CSF His
- ☐ la protéine G-CSF-His

D

- ☐ Nickel

- ☐ histidine
- ☐ imidazole
- ☐ tout sauf la protéine G-CSF His
- ☐ la protéine G-CSF-His

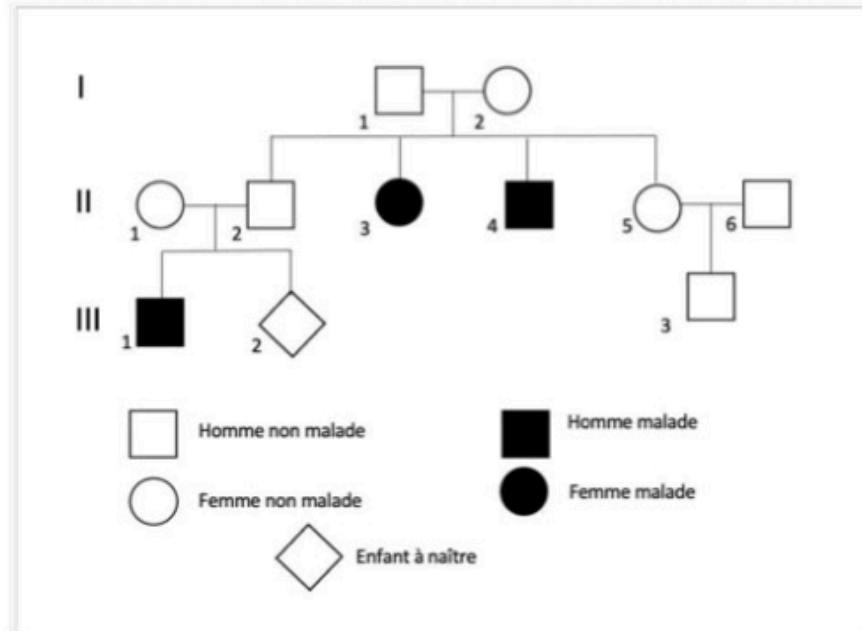
E

- ☐ Nickel
- ☐ histidine
- ☐ imidazole
- ☐ tout sauf la protéine G-CSF His
- ☐ la protéine G-CSF-His

DL NSE session 1 BM 23-24

L'hémochromatose de type 1 est une maladie liée à une mutation située dans un des exons du gène *HFE*. Ce gène code une protéine intervenant dans la régulation de l'absorption intestinale du fer. Cette maladie est caractérisée par une accumulation progressive de fer dans l'organisme au-delà de la valeur physiologique seuil. Les signes cliniques surviennent habituellement vers l'âge de 40 ans : fatigue générale, foie hypertrophié avec risque de cirrhose, diabète et cancer. Ces troubles sont liés à un dysfonctionnement des organes surchargés en fer.

Ci-dessous un arbre généalogique d'une famille atteinte d'hémochromatose de type 1



Question 1

Question à réponse ouverte et courte

D'après l'arbre généalogique, argumentez en quelques mots le caractère récessif :

Réponse :

Question 2

Question à réponse ouverte et courte

D'après l'arbre généalogique, argumentez en quelques mots le caractère autosomique

Réponse :

Question 3

Question à réponse unique

Sachant qu'en France, 1 personne sur 15 est hétérozygote pour la mutation C282Y du gène *HFE*, quelle est la probabilité que l'individu III.2 soit atteint ?

A - c 1/2

B - c 1/4

C - c 1/30

D - c 1/225

E - c 1/15

Question 4

Question à réponse unique

Sachant qu'en France, 1 personne sur 15 est hétérozygote pour la mutation C282Y du gène *HFE*, quelle est la probabilité que l'individu III.2 soit hétérozygote ?

A - c 1/15

B - c 1/4

C - c 1/225

D - c 1/30

E - c 1/2

Question 5

Question à Réponse Ouverte et Longue

Afin de pouvoir réaliser le diagnostic moléculaire de l'hémochromatose de type 1, le laboratoire de biologie médicale ainsi que les biologistes doivent répondre à 3 exigences réglementaires : les citer et les décrire en 1 phrase chaque.

Réponse :

Question 6

Question à réponse ouverte et courte

Citer la combinaison classique des 2 techniques de biologie moléculaire nécessaires à la détection de ce variant :

Réponse :

Le séquençage de l'ADN selon la méthode de Sanger pourrait-il constituer une technique de choix ? Argumenter en 5 à 8 mots (le nombre de mots utilisés est indicatif uniquement)

Réponse :

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année
UE PL2 Biologie Moléculaire et Génétique humaine

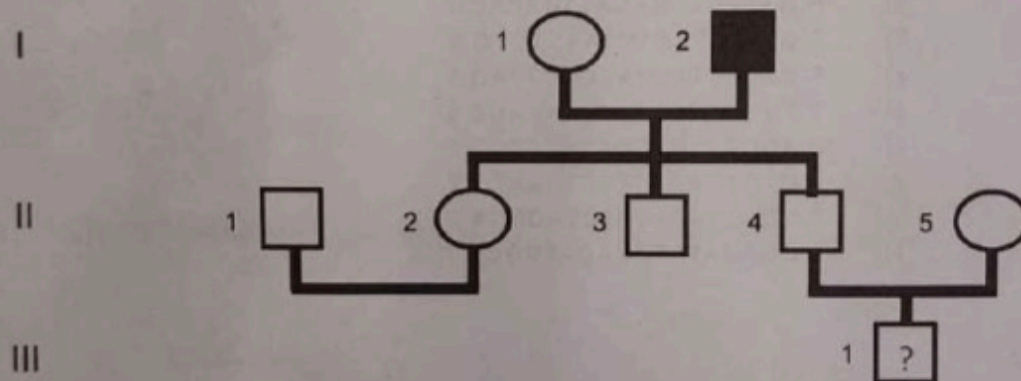
1^{ère} session, 3 Janvier 2023

5 exercices, 7 QROC

40 points

Exercice 1

Soit l'arbre généalogique suivant. I2 est atteint d'une maladie autosomique récessive dont la fréquence des hétérozygotes est de $1/100$ dans la population générale.



- Quelle est la probabilité que III1 soit malade ? (On considère que I1 est homozygote)
- Quelle est la fréquence de cette maladie génétique dans la population générale ?

Exercice 2

1- Compléter la séquence d'ADN double brin palindromique suivante :

5'- AGTC ____ -3'
3'- _____ -5'

2- Expliquer l'importance de ces séquences dans l'ADN.

Exercice 3

Quels sont les éléments non invasifs permettant de définir le risque d'une grossesse avec un fœtus présentant une trisomie 21 ?

Exercice 4

Vous voulez étudier un fragment d'ADN de 536 paires de base correspondant à la région régulatrice située en amont du gène d'une protéine d'intérêt. Cette séquence est la suivante et ne sont représentés que les extrémités 5' et 3'.

Brin sens :

5' GATTCAGGAGATTACAC - 500 nucléotides - TCGGTACAGCTATACAGG 3'

Brin antisens:

3' CTAAGTCCTCTAAGTGTG - 500 nucléotides - AGCCATGTCGATATGTCC 5'

Parmi les 8 amorces suivantes à votre disposition, quelles sont les 2 amorces qui permettront l'amplification par PCR de ce fragment ?

- a) 5' GATTCAGGAGATTACAC 3'
- b) 5' CTAAGTCCTCTAAGTGTG 3'
- c) 5' CACACTTAGAGGACTTAG 3'
- d) 5' TCGGTACAGCTATACAGG 3'
- e) 5' AGCCATGTCGATATGTCC 3'
- f) 5' GTGTGAATCTCCTGAATC 3'
- g) 5' CCTGTATAGCTGTACCGA 3'
- h) 5' GGACATATCGACATGGCT 3'

Exercice 5 :

Le gène « *BALLONDOR* » doit être cloné dans le vecteur pcDNA-3 afin de produire une protéine recombinante pour soigner un déficit impliqué dans la maladie du « FOOT ».

La séquence du gène de *BALLONDOR* est de 1653 pb et les sites des enzymes de restriction sont indiqués dans la figure 1A. Est noté les noms et positions des enzymes de restriction qui coupent le gène.

Questions :

1. Citez les 5 étapes permettant le clonage du gène *BALLONDOR* dans le plasmide pcDNA-3. Précisez le but de chaque étape.
2. D'après la carte du plasmide (5 500pb) présentée dans la figure 1B, quelles sont les enzymes de restriction que vous pouvez utiliser pour cloner le gène *BALLONDOR* dans le plasmide pcDNA-3 ? Justifiez votre réponse

Question à réponse ouverte courte : QROC

QROC 1 : Expliquez les modes d'actions des siRNA et des oligonucléotides antisens

QROC 2 : Expliquez le terme de « thérapie génique *in vivo* »

QROC 3 : Citez les vecteurs qui peuvent être utilisés en thérapie génique *ex vivo*.

QROC 4 : Principe du séquençage de nouvelle génération (en 8 phrases maximum). Par quel critère détecte-t-on une mutation ponctuelle à l'état hétérozygote ?

QROC 5 : Quantification et qualification de l'ADN génomique humain : décrire le principe de la (des) méthode(s) employée(s)

QROC 6 : Comment peut-on visualiser le résultat d'une réaction de PCR ?

QROC 7 : Citer les 4 principales caractéristiques des amorces de PCR lors de leur design

2^{ème} année

UE PL2 Biologie Moléculaire et Génétique humaine

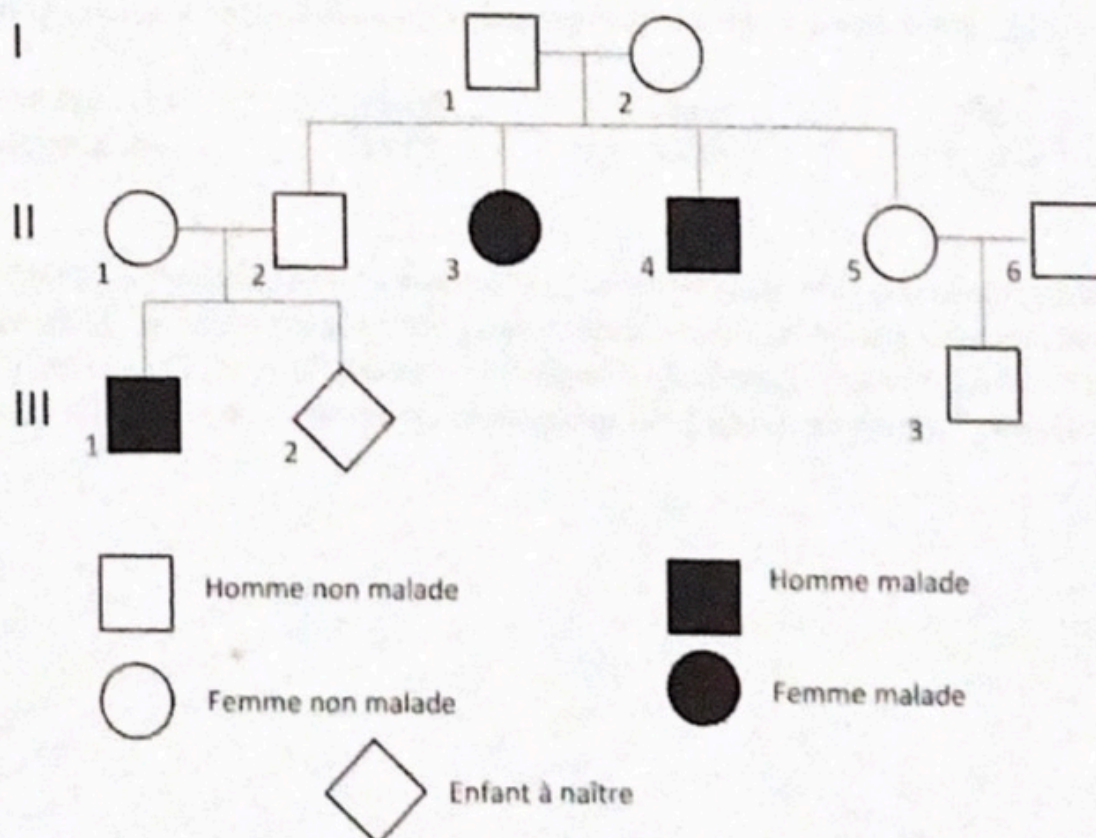
2^{ème} session, Mai 2023

40 points

Exercice 1 : Diagnostic moléculaire de l'hémochromatose de type 1 (17 points)

L'hémochromatose de type 1 est une maladie liée à une mutation située dans un des exons gène *HFE*. Ce gène code une protéine intervenant dans la régulation de l'absorption intestinale du fer. Cette maladie est caractérisée par une accumulation progressive de fer dans l'organisme au-delà de la valeur physiologique seuil. Les signes cliniques surviennent habituellement vers l'âge de 40 ans : fatigue générale, foie hypertrophié avec risque de cirrhose, diabète et cancer. Ces troubles sont liés à un dysfonctionnement des organes surchargés en fer.

Ci-dessous un arbre généalogique d'une famille atteinte d'hémochromatose de type 1



Question 1 : argumenter le caractère récessif et autosomique de l'hémochromatose de type 1 (2 points)

Question 2 : Sachant qu'en France, 1 personne sur 15 est hétérozygote pour la mutation C282Y du gène *HFE*, calculer la probabilité :

- Que l'individu III.2 soit atteint (1 point)
- Que l'individu III.2 soit hétérozygote (1 point)

Question 3 : afin de pouvoir réaliser le diagnostic moléculaire de l'hémochromatose de type 1, le laboratoire de biologie médicale ainsi que les biologistes doivent répondre à 3 exigences réglementaires : les citer et les décrire en 1 phrase (3 points).

Question 4 : citer et décrire en deux phrases la combinaison classique des 2 techniques de biologie moléculaire nécessaires à la détection de ce variant (2 points). Le séquençage de l'ADN selon la méthode de Sanger pourrait-il constituer une technique de choix également ? Argumenter (2 points)

Question 5 : Ci-dessous la séquence nucléotidique des deux allèles du gène *HFE* au niveau de la mutation précédemment décrite (ce sont les brins sens qui sont présentés (orientés 5'-3')) :

N° de nucléotide	832	852
	↓	↓
Allèle H non porteur du variant	CAG AGA TAT ACG TGC CAG GTG	
Allèle h porteur du variant	CAG AGA TAT ACG TAC CAG GTG	

5a/ donner la formule nucléotidique (1 point) et la formule protéique (1 point)

5b/ au vu des sites palindromiques de digestion, parmi les enzymes de restriction suivantes, laquelle est utilisée pour le diagnostic moléculaire d'hémochromatose ? (1 point)

Nom de l'enzyme	HindIII	HpaII	RsaI
Site de coupure	GG CC	CCGG	GTAC

Question 6 : Si l'individu III.3 était considéré comme malade et que le dépistage ne rapportait qu'un seul variant à l'état hétérozygote, quelle technique large de choix pourrait être utilisée ? La citer et brièvement l'expliquer ? (2 points) Si cet individu est malade, ces variants sont-ils situés sur le même allèle ou sur deux allèles différents ? (1 point)

		Deuxième lettre								
		U		C		A		G		
Première lettre	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U C A G
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U C A G
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U C A G
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U C A G
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	

Exercice 2 : 17 points

L'altéplase (Actilyse®) est une forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) utilisé comme médicament thrombolytique lors d'embolie pulmonaire, d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral ischémique. Il est obtenu par génie génétique. Le t-PA est une protéase de 527 acides aminés qui possède plusieurs ponts disulfures et qui a besoin d'une structure tertiaire pour être active.

QCM 1: Concernant le plasmide utilisé (1 point)

- A. C'est un plasmide d'expression
- B. La séquence « Ampicilline » permet de sélectionner les clones bactériens possédant le plasmide recombinant
- C. La séquence « Ampicilline » permet de sélectionner les clones bactériens possédant le plasmide non recombinant
- D. La séquence « promoteur » sert à promouvoir l'action des enzymes de restrictions
- E. La séquence « promoteur » permet à la protéine t-PA d'être exprimée dans la cellule hôte

Question 1 : Citez les 5 étapes pour réaliser le clonage du gène t-PA dans un plasmide (3 points)

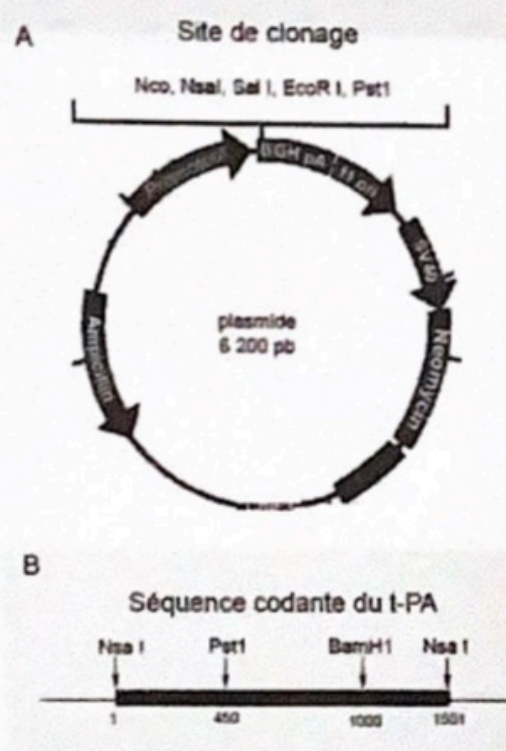
Question 2 : Le clonage du gène t-PA est réalisé dans un plasmide de 6200 paires de bases dont la carte est représentée dans la figure 1A. La séquence du gène codant pour le t-PA, de 1551 pb, est présentée dans la figure 1B avec les sites de reconnaissance pour différentes enzymes de restrictions. D'après les données de la figure 1A et 1B, quelle(s) enzyme(s) de restriction peut-on utiliser pour le clonage du gène t-PA dans le plasmide proposé ? Justifier votre réponse. (2 points)

Question 3 : Quels sont les tailles attendues pour le plasmide recombinant et non recombinant ? (2 points)

Question 4 : Quatre clones (Cl.) de bactéries ont été sélectionnés. Après extraction de l'ADN de chaque clone et une digestion enzymatique par les 2 enzymes de restriction : Nsa I et BamH1, les fragments obtenus ont été analysés sur un gel d'agarose. D'après le profil de migration présenté dans la figure 2, quel est le clone bactérien qui possède le plasmide recombinant ? Justifiez votre réponse. (4 points)

Question 5 : Pour produire le t-PA recombinant quel(s) organisme(s) hôte pouvez-vous utiliser ? Justifier votre réponse (2 points)

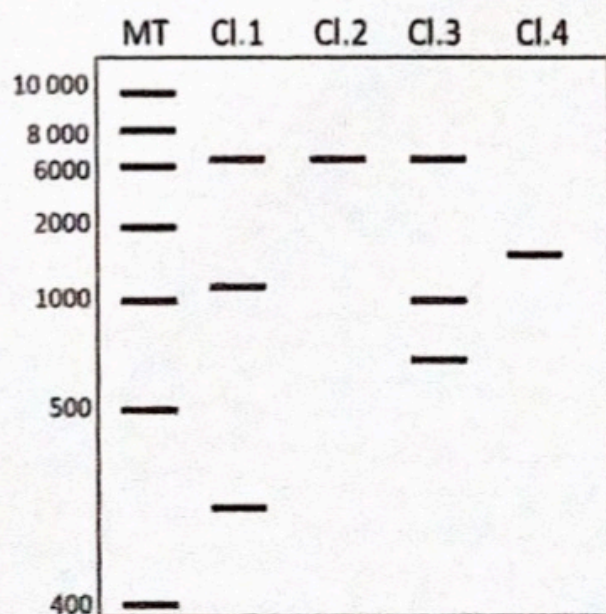
Figure 1



A : carte du plasmide permettant le clonage. Nco, Nsal, Sal I, EcoR I, Pst I sont des sites de coupure dans le site de clonage du plasmide.

B : séquence du gène t-PA de 1551 pb. Nsa I coupe en position 1, Pst I en 450 pb, BamH1 en 1000 et Nsa I en 1551 pb de la séquence t-PA.

Figure 2



Profil de migration après digestion avec Nsa I et BamH1 des ADN issus des différents clones. MT : marqueur de taille en paire de bases (pb), Cl. = numéro de clone bactérien

QROC 1 : A propos de la mucoviscidose (3 points)

- Quel est le gène muté dans la maladie ?
- Quel est le rôle physiologique de la protéine codée par ce gène ?
- Quel est la mutation la plus souvent retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose ?

QROC 2 : Lors de quelle étape de la gamétogénèse se situe la principale cause de trisomie 21 ? (1 point)

QROC 3 : A propos des siRNA, expliquer en 2 phrases leurs rôles et mode d'action dans une cellule. (2 points)

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

UE PL2 Biologie Moléculaire et Génétique humaine

1ere session, Janvier 2021

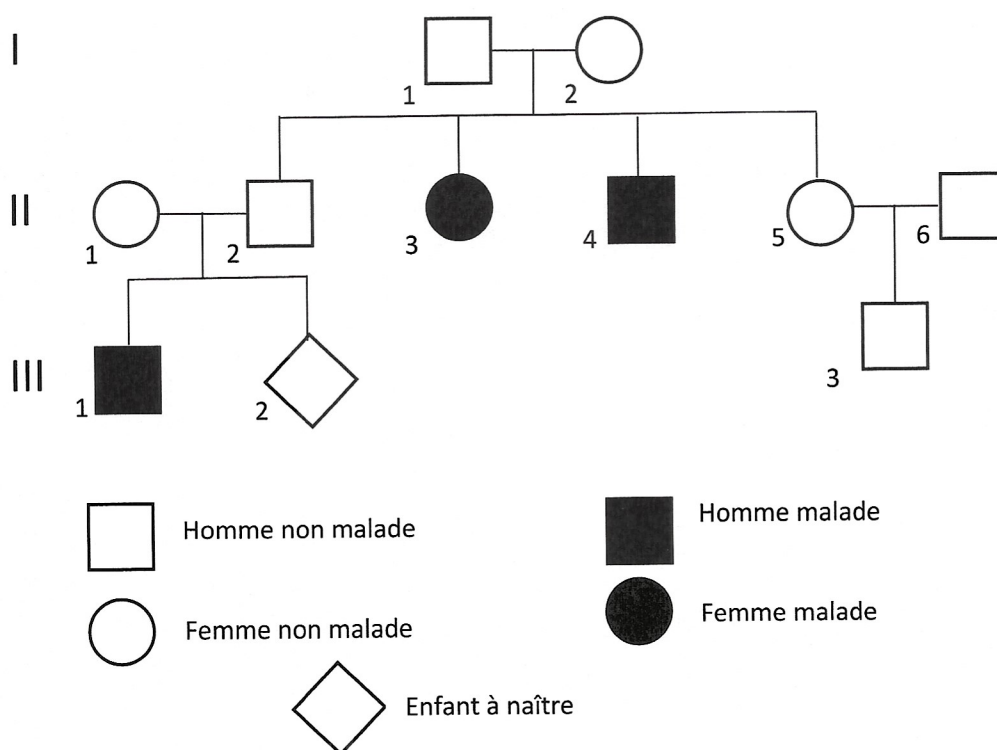
40 points

Page 1 à 5

Exercice 1 : Diagnostic moléculaire de l'hémochromatose de type 1 (20 points)

L'hémochromatose de type 1 est une maladie liée à une mutation située dans un des exons du gène *HFE*. Ce gène code une protéine intervenant dans la régulation de l'absorption intestinale du fer. Cette maladie est caractérisée par une accumulation progressive de fer dans l'organisme au-delà de la valeur physiologique seuil. Les signes cliniques surviennent habituellement vers l'âge de 40 ans : fatigue générale, foie hypertrophié avec risque de cirrhose, diabète et cancer. Ces troubles sont liés à un dysfonctionnement des organes surchargés en fer.

Ci-dessous un arbre généalogique d'une famille atteinte d'hémochromatose de type 1



Question 1 : argumenter le caractère récessif et autosomique de l'hémochromatose de type 1 (2 points)

Question 2 : Sachant qu'en France, 1 personne sur 15 est hétérozygote pour la mutation C282Y du gène *HFE*, calculer la probabilité :

- Que l'individu III.2 soit atteint (1 point)
- Que l'individu III.2 soit hétérozygote (1 point)

Question 3 : afin de pouvoir réaliser le diagnostic moléculaire de l'hémochromatose de type 1, le laboratoire de biologie médicale ainsi que les biologistes doivent répondre à 3 exigences réglementaires : les citer et les décrire en 1 phrase (3 points).

Question 4 : citer et décrire en deux phrases la combinaison classique des 2 techniques de biologie moléculaire nécessaires à la détection de ce variant (2 points). Le séquençage de

l'ADN selon la méthode de Sanger pourrait-il constituer une technique de choix également ? Argumenter (2 points)

Question 5 : Ci-dessous la séquence nucléotidique des deux allèles du gène *HFE* au niveau de la mutation précédemment décrite (ce sont les brins sens qui sont présentés (orientés 5'-3')) :

N° de nucléotide	832	852
	↓	↓
Allèle H non porteur du variant	CAG AGA TAT ACG TGC CAG GTG	
Allèle h porteur du variant	CAG AGA TAT ACG TAC CAG GTG	

5a/ donner la formule nucléotidique (1 point) et la formule protéique (1 point)

5b/ au vu des sites palindromiques de digestion, parmi les enzymes de restriction suivantes, laquelle est utilisée pour le diagnostic moléculaire d'hémochromatose ? (1 point)

Nom de l'enzyme	HindIII	HpaII	RsaI
Site de coupure	GG CC	CCGG	GTAC

Question 6 : Si l'individu III.3 était considéré comme malade et que le dépistage ne rapportait qu'un seul variant à l'état hétérozygote, quelle technique large de choix pourrait être utilisée ? La citer et brièvement l'expliquer ? (2 points) Si cet individu est malade, ces variants sont-ils situés sur le même allèle ou sur deux allèles différents ? (1 point)

		Deuxième lettre									
		U		C		A		G			
Première lettre	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U C A G	
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys		
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop		
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp		
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U C A G	
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg		
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg		
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg		
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U C A G	
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser		
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg		
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg		
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U C A G	
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly		
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly		
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly		

QROC : (10 points)

QROC 1 : Au sujet de l'hémophilie A, répondez aux questions suivantes en expliquant vos réponses :

- 1- Quel est le mode de transmission de cette maladie ?
- 2- Quelle est la probabilité pour la fille d'un père hémophile d'avoir un sujet atteint parmi ses enfants ?
- 3- Quel est le risque d'avoir un enfant hémophile pour un couple formé d'un hémophile et d'une femme non conductrice ?

QROC 2 : Expliquer ce qu'est une maladie génétique à pénétrance incomplète

QROC 3 : A propos de la mucoviscidose :

- Quel est le gène muté dans la maladie ?
- Quel est le rôle physiologique de la protéine codée par ce gène ?
- Quel est la mutation la plus souvent retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose ?

QROC 4 : (4 lignes maximum) : Expliquer le principe du dépistage non invasif de l'ADN fœtal.

Exercice 2 : (10 points)

Nous souhaitons cloner le gène « *bonne année* » pour synthétiser une protéine recombinante en vue d'une production d'un biomédicament. La protéine codée par le gène « *Bonne année* » est glycosylée. La séquence du gène « *bonne année* » de 960pb et présente un site de reconnaissance pour l'enzyme Pst1 en position 1 pb, une pour Nco en position 255pb, une pour Sal1 en position 600, et Nsal en 960 pb. Le gène « *Bonne année* » est représenté dans la **figure 1**. Pour réaliser le clonage nous souhaitons utiliser un plasmide de 5900pb qui possède dans son site de clonage des sites de reconnaissance pour les enzymes Pst1, BamH1, EcoRI, Nsal, EcoRV (voir **figure 1**).

Question 1 : Quels sont les différences entre un plasmide d'expression et de clonage ?

Question 2 : Quelle(s) enzyme(s) pouvez-vous utiliser pour cloner le gène *bonne année* dans le plasmide ? pourquoi ?

Question 3 : Quelles sont les tailles du plasmide non recombinant et recombinant

Question 4 : L'ampicilline est utilisée pour sélectionner : (répondre sur votre copie)

- A. les bactéries qui possèdent uniquement le plasmide non recombinant
- B. les bactéries qui possèdent uniquement le plasmide recombinant
- C. les bactéries qui possèdent le plasmide non recombinant et recombinant
- D. Un deuxième screening par la néomycine sera utilisé pour sélectionner les bactéries possédant le plasmide recombinant
- E. Un deuxième screening par la néomycine sera utilisé pour sélectionner les bactéries possédant le plasmide recombinant

Au cours du clonage, le *screening* des bactéries ayant intégrées le plasmide recombinant est réalisé par une analyse des fragments de restriction. Pour cela l'ADN des différents clones bactériens (clone de 1 à 4) a été purifié et digéré par 2 enzymes de restriction Pst1 et Sal1. Le profil de migration des fragments obtenus est représenté dans la **figure 2** après électrophorèse sur un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium.

Question 5 : Quel est le clone que vous allez choisir pour purifier le plasmide recombinant ? (justifiez votre réponse).

Question 6 : Expliquez le principe de purification d'une protéine par chromatographie d'affinité utilisant le système Histidine.

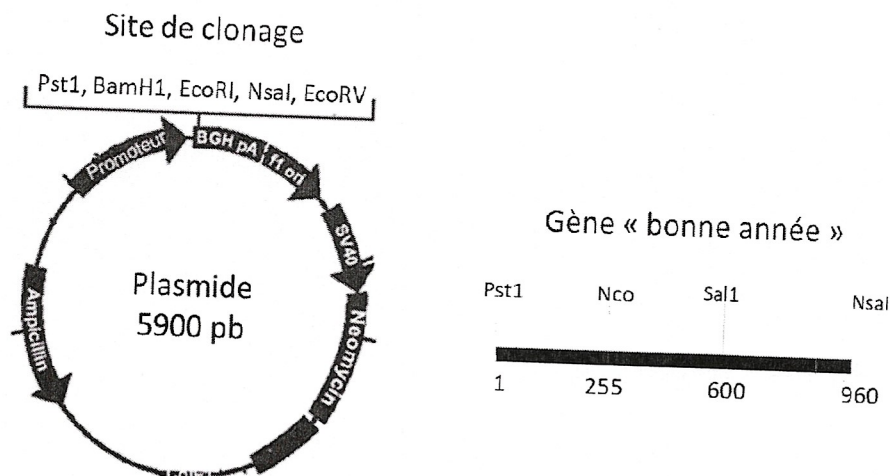


Figure 1 : Carte du plasmide utilisé, gène « Bonne année », sites de coupure pour les enzymes de restriction

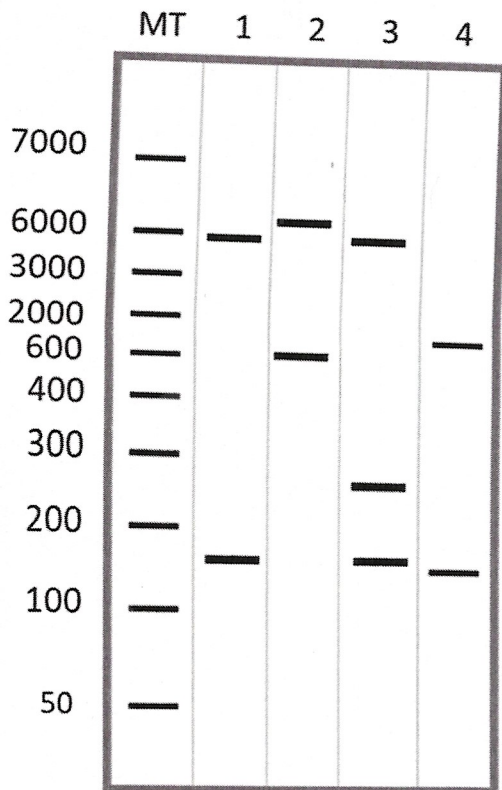


Figure 2 : Le profil de migration des fragments obtenu après électrophorèse sur un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Migration du marqueur de taille (MT, taille des fragments en pb). Les pistes 1, 2, 3, 4 correspondent au profil migration des ADN des clones 1, 2, 3, 4 digérés par les 2 enzyme Pst1 et Sal1.

12h05

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

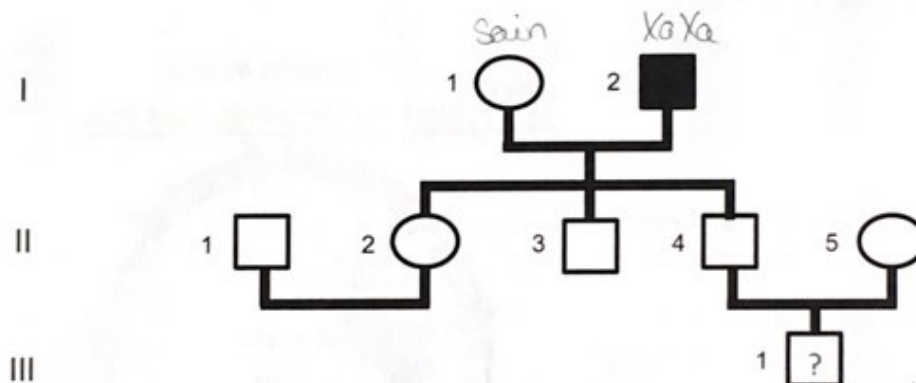
2^{ème} année
UE PL2 Biologie Moléculaire et Génétique humaine

1^{er} session, Janvier 2020

40 points

Exercice 1 (3 points)

Soit l'arbre généalogique suivant. I2 est atteint d'une maladie autosomique **récessive**. Quelle est la probabilité que III1 soit malade sachant que la **fréquence des hétérozygotes** est de **1/50** dans la population générale ? (On considère que I1 est homozygote)



Exercice 2 (3 points)

Au sujet de l'hémophilie A, répondez aux questions suivantes en expliquant vos réponses :

- 1- Quelle est la probabilité pour une fille d'hémophile d'avoir un sujet atteint parmi ses enfants ?
- 2- Quel est le risque d'avoir un enfant hémophile pour un couple formé d'un hémophile et d'une femme non conductrice ?

Exercice 3 (3 points)

Soit un couple composé d'un homme de groupe sanguin B et d'une femme de groupe sanguin O. Quels groupes sanguins sont possibles pour un enfant de ce couple ?

Exercice 4 (3 points)

1- Compléter la séquence d'ADN double brin palindromique suivante :

5'- AGTC ____ -3'
3'- _____ -5'

2- Expliquer l'importance de ces séquences dans l'ADN.

Exercice 5 : 18 points

Un industriel souhaite produire une protéine recombinante « Père Noel » qui fait 68 kD et dont la séquence codante du gène fait 1689 nucléotides. Pour réaliser le clonage du gène « Père Noel », le plasmide présenté dans la figure 1A est utilisé. Les sites de coupure sur le gène « père Noel » sont présentés dans la figure 1B.

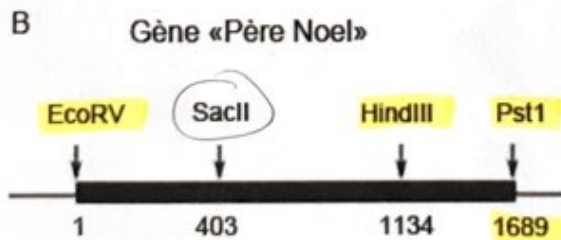
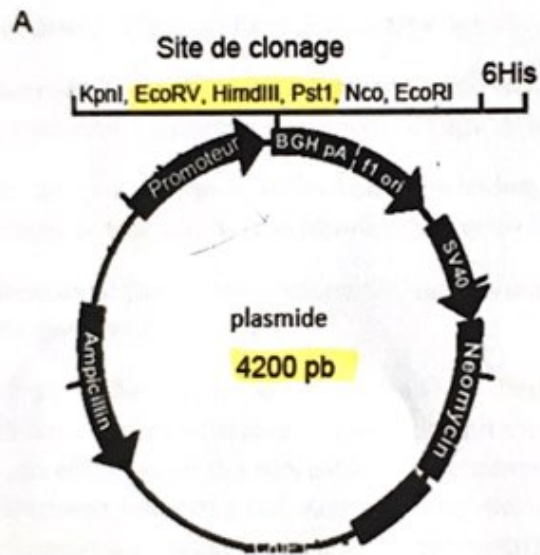


Figure 1 : carte du plasmide et du gène « Père Noel »

Est noté les noms et positions des enzymes de restriction qui coupent le gène et le plasmide.

Question 1 : Quelles sont les tailles des plasmides non recombinant et recombinant ? Quelles enzymes pouvons-nous utiliser pour cloner ce gène dans le plasmide ? Justifiez votre réponse

1 nucléotide = 1 pb
A

563 pb.

Après la ligation et transformation bactérienne, un criblage des bactéries est réalisé. L'ADN des différents clones bactériens est analysé après action des enzymes de restrictions : **Pst1** et **SacII**. Un profil de restriction a été réalisé sur ces différents ADN après action des 2 enzymes de restrictions : Pst1 et SacII. Les fragments obtenus ont été analysés sur un gel d'agarose. Le profil de migration est présenté dans la figure 2.

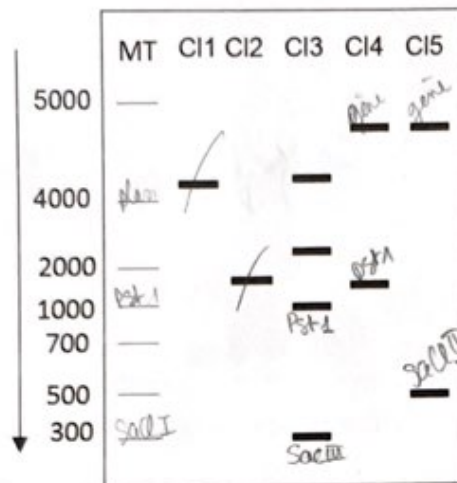


Figure 2 : Profil de migration de l'ADN des clones (CI) bactériens 1 à 5 après digestion enzymatique. L'ADN est visualisé grâce au Bromure d'éthidium.

MT : marqueur de taille en paire de base.
Flèche : sens de migration.

cl 1 : non recombinant
cl 2 : non recombinant
cl 3 :

Question 2 : Expliquez l'intérêt de cette étape de criblage.

Question 3 : Quel(s) clone(s) bactérien(s) allez-vous utiliser pour purifier le plasmide recombinant ? (Justifiez votre réponse à l'aide de schémas)

Afin de produire la protéine recombinante les industriels ont réalisé la transfection des cellules de **type CHO** avec le plasmide recombinant.

Question 4 : Comment les cellules CHO qui expriment le gène codant pour « Père Noel » sont sélectionnées ?

Afin de **purifier** la protéine « Père Noel », une **chromatographie par affinité de Nickel** est utilisée. L'élution est réalisée avec des concentrations croissantes en **imidazole**. Les différents éluats obtenus avec des concentrations croissantes d'imidazole sont analysés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Après migration des éluats, le gel est coloré avec du **Bleu de Coomassie** qui marque les **protéines**. Les résultats sont présentés dans la figure 3.

SacII 603
Pst1 1689.

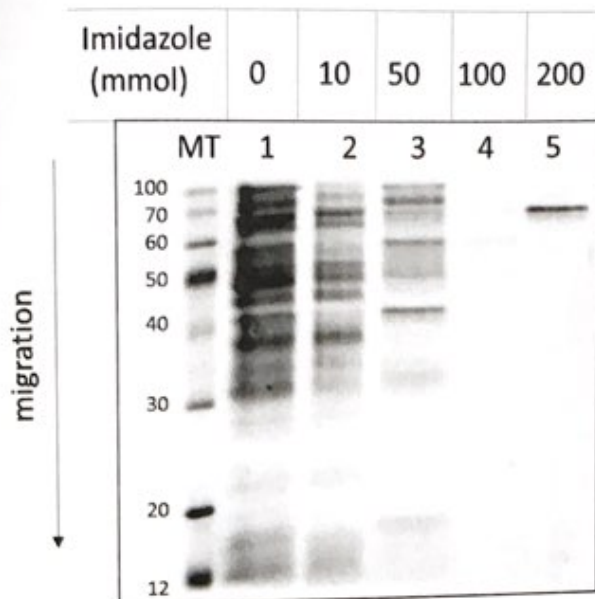


Figure 3 : Gel coloré au bleu de Coomassie. Ligne MT : marqueur de taille avec le poids moléculaire de 100 à 12 kD. Ligne 1 à 5 : migration des éluats correspondant à des concentrations croissantes d'imidazole utilisées pour réaliser l'élution. Ligne 1 : 0 mmol, Ligne 2 : 10 mmol, Ligne 3 : 50mmol, ligne 4 : 100mmol, ligne 5 : 200 mmol.

Question 5 : Expliquez le principe de cette chromatographie.

Question 6 : D'après les profils protéiques obtenus dans la figure 3, quelles est la condition optimale de concentration en imidazole permettant obtenir la protéine la plus pure, justifiez votre réponse.

Questions à réponses courtes (10 points) :

Question 1

Particularités réglementaires des tests génétiques en situation constitutionnelle

Question 2

Principe du séquençage de nouvelle génération

Question 3

Principaux critères de bonne qualité de l'ADN génomique

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

Examen de
UE PL2 Biologie Moléculaire et Génétique humaine

L'épreuve comporte:

2 exercices

3 questions

Total de 40 points

(3 pages)

Exercice 1 : 15 points

Exercice :

- 1- Soit une maladie autosomique récessive pour laquelle la fréquence des hétérozygotes dans la population générale est de 1/100.

Quel est la probabilité pour le frère d'un individu malade d'avoir un enfant atteint ?

Informations :

- Le frère de l'individu malade est phénotypiquement sain
- Les parents des deux frères sont également phénotypiquement sains
- On estime qu'il n'y a pas de mutation de novo dans ce cas.

- 1- Dessiner l'arbre généalogique de ce cas
- 2- Calculer la probabilité demandée

2- La phénylcétonurie, la mucoviscidose, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales et dans certains cas la drépanocytose sont des maladies dépistées dans les trois premiers jours de vie des nouveaux nés. Expliquez l'intérêt de dépister ces maladies chez l'ensemble des nouveaux nés.

- 3- Expliquez l'intérêt majeur de la PCR en temps réel avec une sonde TaqMan par rapport à l'utilisation de Syber-Green.

- 4- Compléter la séquence d'ADN double brin palindromique suivante :

5'- AGTC ____ -3'
3'- _____ -5'

- 5- Quels sont les éléments permettant de définir le risque d'une grossesse avec un fœtus présentant une trisomie 21 ?

Exercice 2 : 15 points

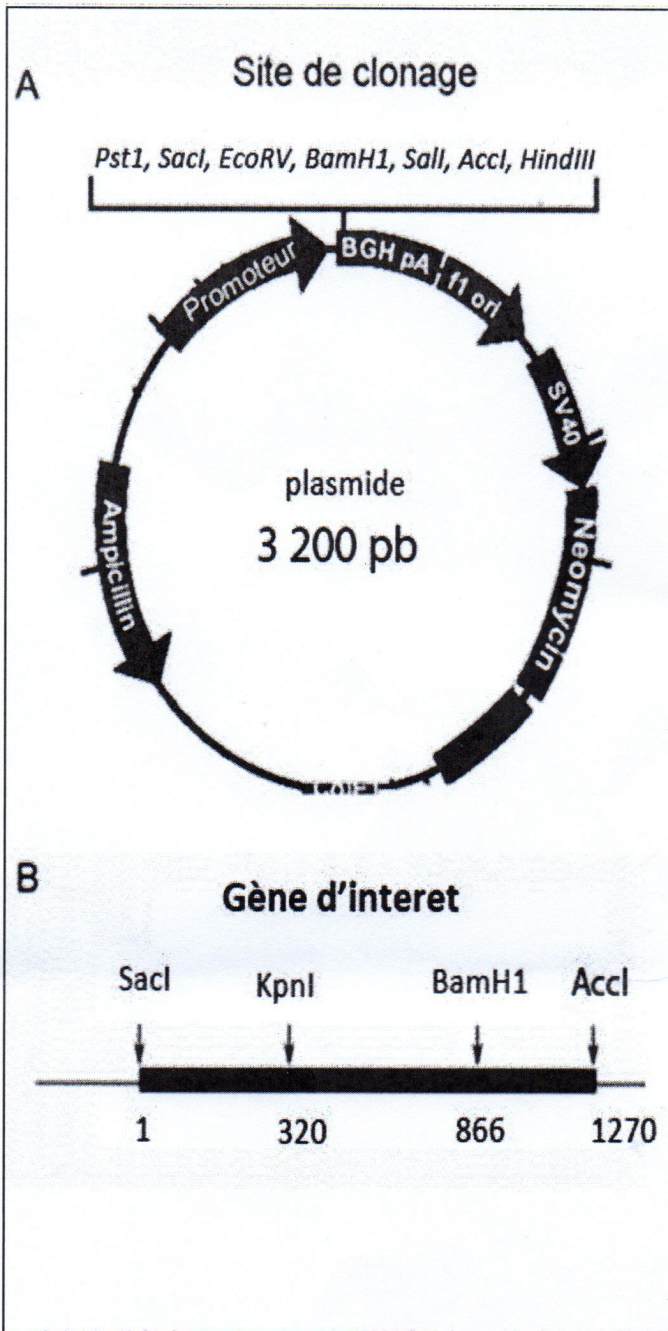
On cherche à cloner le gène d'intérêt dans un plasmide d'expression afin de produire une protéine recombinante. Le plasmide d'expression fait 3200 pb et possède un site de clonage comme décrit dans la figure A avec des sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction : Pst1, SacI, EcoRV, BamHI, Sall, Accl, HindIII.

Le gène d'intérêt fait 1270 pb et possède des sites de reconnaissances d'enzymes de restriction comme décrit dans la figure B (les chiffres sous le nom des enzymes désignent la position du site sur le gène d'intérêt) : SacI en position 1, KpnI en position 320, BamHI 866 et Accl en position 1270. Ce gène code pour une protéine de 30 KD, glycosylée.

Questions :

1. Quelle(s) enzyme(s) allez-vous choisir pour réaliser ce clonage ? Justifier votre réponse.

2. Quelles sont les tailles du plasmide recombinant et non recombinant (justifiez votre réponse).
3. Le plasmide recombinant est digéré par les enzymes *AccI* et *KpnI*.
 - i. Quelles sont les tailles des fragments observés après digestion enzymatique.
 - ii. Expliquer comment vous pouvez analyser et visualiser les fragments obtenus pour définir le profil de digestion.
4. Quelles sont les analogies et les différences entre un plasmide d'expression et de clonage ?
5. Quel(s) hôte(s) vous pouvez utiliser afin de produire cette protéine recombinante? Justifiez votre réponse.
6. Afin de purifier cette protéine à partir d'un mélange biologique, une purification par chromatographie d'affinité a été réalisée. Expliquer son principe.



Questions : 10 points

- 1- La détection des transcrits de fusion dans les tumeurs solides pédiatriques requiert l'utilisation de la technique de RT-PCR quantitative selon une approche de type TaqMan : Décrire le principe réactionnel, la détection des résultats et leur mise en forme
- 2-Séquençage de nouvelle génération : principe, enchaînement des étapes, et utilisation des résultats
- 3- Décrire les stratégies de caractérisation d'une mutation génique en génétique du cancer. Structurer votre réponse selon le matériel biologique de départ (donc l'objectif recherché) ou selon la méthodologie pouvant être utilisée.

UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année
Examen de
UE PL2-18 Biologie Moléculaire

1ere session Janvier 2017

2 exercices

5 questions à réponses courtes

Total de 40 points

Questions à réponses courtes : 15 points

1. Expliquer la notion de « seuil phénotypique » dans le cas des cytopathies mitochondriales
2. Définir une mutation non-sens
3. Soit une maladie autosomique récessive avec un allèle délétère « a » de fréquence q. Quelle est la valeur de cette fréquence q si la fréquence des individus malades est de 1/2500 ?
4. Un enfant avec une toux chronique subit un « test de la sueur ». La mesure effectuée montre une concentration d'ion chlorure de 120mmol/l (Valeur normale < 60 mmol/L).
 - a. Quelle pathologie cherche t'on à dépister ? Quel est le résultat ?
 - b. Expliquer pourquoi on a une augmentation des ions chlorure chez ce patient ?
5. La détection des transcrits de fusion dans les tumeurs solides pédiatriques requiert l'utilisation de la technique de RT-PCR quantitative selon une approche de type TaqMan : Décrire le principe réactionnel, la détection des résultats et leur mise en forme.

Exercice 1 : 5 points

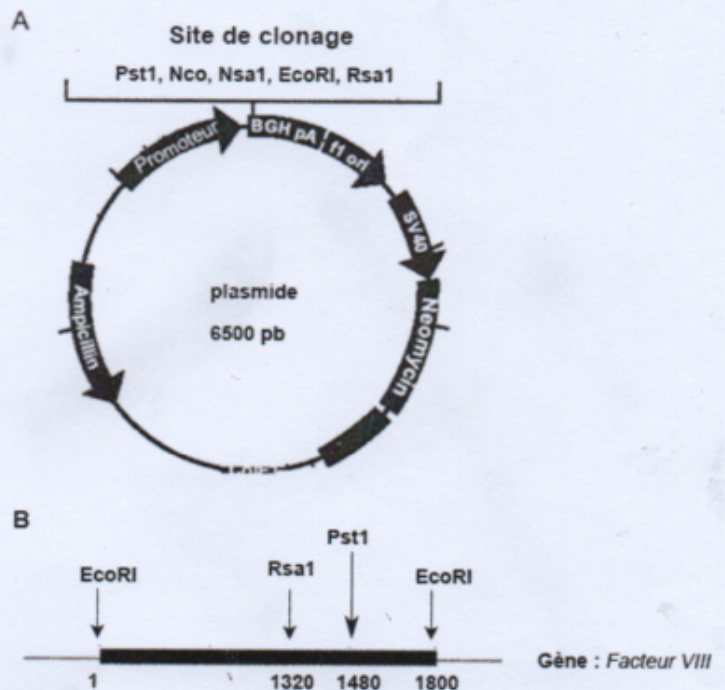
Un jeune homme non hémophile souhaiterait avoir un enfant avec une jeune fille dont le frère est atteint d'une hémophilie mais dont les parents sont sains; il y a d'autres cas connus d'hémophilie dans cette famille. Quel risque encourent-ils pour leur descendance?

Exercice 2 : 20 points

Le Facteur VIII est une glycoprotéine qui est importante pour la coagulation et est inactive ou non présente chez les hémophiles A. Le Facteur VIII peut être synthétisé par génie génétique. Actuellement une nouvelle génération de facteur VIII est produite et correspond à une forme tronquée de la protéine du Facteur VIII. La séquence codant pour cette protéine tronquée (de 1800 pb) a été clonée dans un plasmide de 6500 pb afin de produire par génie génétique ce Facteur VIII recombinant.

1. Expliquer les similitudes et les différences entre un vecteur d'expression et un vecteur de clonage

2. Le plasmide utilisé pour le clonage est représenté dans la figure 1A, ainsi que la séquence codant pour Facteur VIII tronquée (Figure 1B).
 - a. Quelle enzyme de restriction allez-vous choisir pour faire le clonage du gène *FVIII*
 - b. Suite aux différentes étapes du clonage, afin de vérifier si le clone bactérien sélectionné possède le plasmide recombinant ou non recombinant, l'ADN extrait des bactéries est incubé avec 3 enzymes de restrictions : *Rsa1*, *EcoRI*, *Pst1*. Expliquer le nombre et la taille des fragments qui seront obtenu dans les différents cas : bactérie ayant le plasmide recombinant, bactérie ayant le plasmide non recombinant.



3. Pour produire le facteur VIII recombinant, quel type de système de production allez-vous utiliser, pourquoi ?
4. Une étape importante pour la production de biomédicament est la purification. Afin de purifier le Facteur VIII, le laboratoire a choisi de produire la protéine de fusion Facteur VIII avec une étiquette « histidine » (Facteur VIII-His). Expliquer le principe de la chromatographie qui est alors utilisée afin de purifier le Facteur VIII.

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

Examen de
UE PL2-18 Biologie Moléculaire

1^{ere} session Janvier 2016

L'épreuve d'une durée de **45 minutes** comporte:

2 exercices

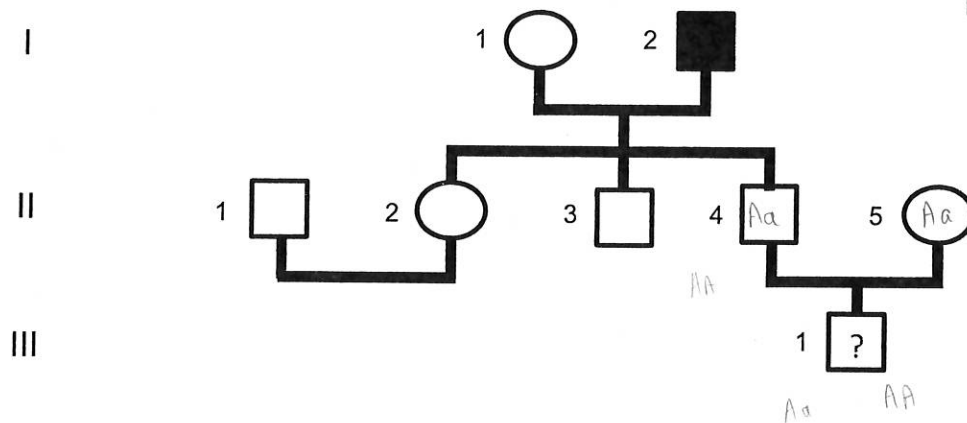
5 questions à réponses courtes

Total de 40 points

(4 pages)

Exercice 1 : 5 points

Soit l'arbre généalogique suivant. I2 est atteint de mucoviscidose. Quel est le risque que III1 soit malade sachant que la fréquence des hétérozygotes est de 1/50 dans la population générale? (On considère que I1 est une femme homozygote)



Exercice 2 : 20 points

Nous souhaitons produire par génie génétique une hormone humaine de 45 KDa. Le gène de 1680 pb codant pour cette protéine est représenté dans la figure 1A. L'analyse de la séquence montre des sites de restriction pour 3 enzymes : Pst1 en position 1 et 1680, EcoRV en position 230 et BamH1 en position 867.

Afin de produire l'hormone humaine, la séquence du gène humain est clonée dans le plasmide pcDNA3 représenté dans la figure 1B. Son site de clonage possède des sites de reconnaissance pour 4 enzymes : EcoRV, BamH1, Pst1, Kpn1.

- 1) Quelle(s) enzyme(s) pouvez-vous utiliser pour le clonage du gène de cette hormone dans le plasmide pcDNA ? justifiez votre réponse.
- 2) Quelle est la taille du plasmide recombinant ?
- 3) Comment pouvez-vous sélectionner les clones bactériens possédant le plasmide recombinant ?
- 4) Cette hormone est produite dans des cellules de type CHO par génie génétique, expliquez les avantages et les inconvénients de l'utilisation de ce système de production.
- 5) Après avoir transfecté les cellules CHO, comment sélectionner les cellules qui ont intégré le plasmide permettant une production stable de protéine ?
- 6) Les lysats cellulaires du clone cellulaire sont récupérés et une purification de la protéine est réalisée. La figure 2 montre le résultat de la migration des protéines sur un gel de polyacrylamide du lysat cellulaire avant purification (ligne 1), puis 3 fractions correspondant à 3 étapes de purification (ligne 2-3-4). Le gel a été coloré par un colorant marquant les protéines.

- Citez les différentes techniques de purification des protéines.
- Qu'elle fraction d'élution allez-vous utiliser pour réaliser une préparation de cette hormone à usage pharmaceutique ?
- Pourquoi cette étape est importante ? (Justifier votre réponse)

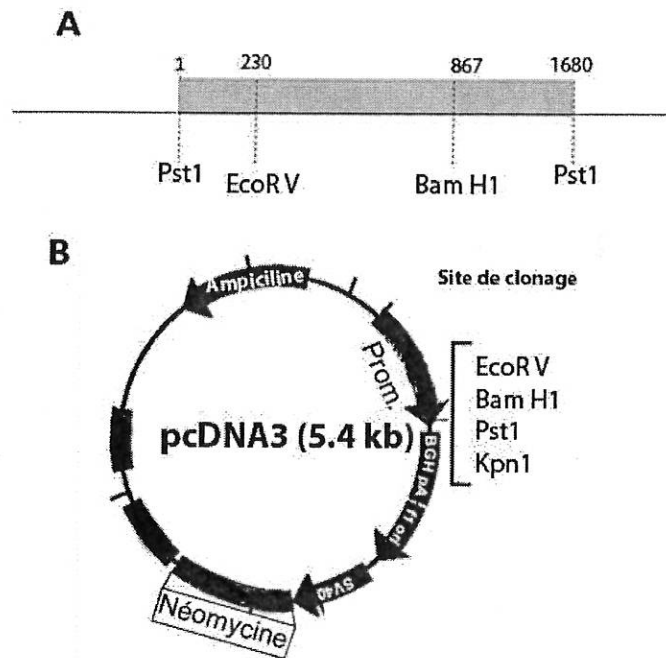


Figure 1 : Séquence du gène et du plasmide pcDNA3.

A) Séquence du gène avec les sites de restriction pour Pst1, EcoRV, Bam H1.

B) Carte du plasmide pcDNA3 avec le site de clonage possédant 4 sites de coupure d'enzymes : EcoRV, Bam H1, Pst1, Kpn1.

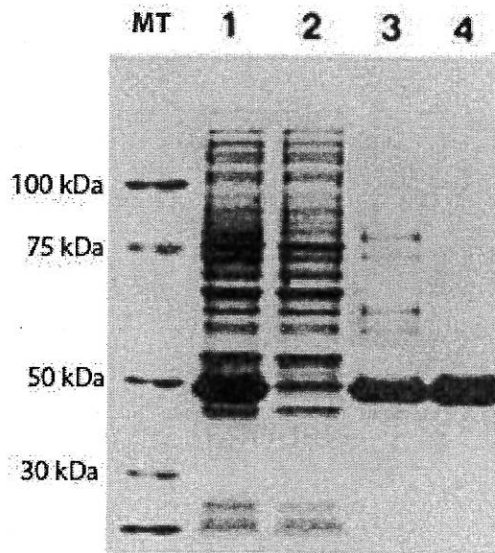


Figure 2 : gel de polyacrylamide, coloration des protéines. MT (marqueurs de taille en kDaltons), piste 1 : lysat total avant purification, 2-3-4 correspond à 3 fractions de purification réalisées à partir du lysat cellulaire total.

Questions à réponses courtes : 15 points

- 1- La microphthalmie est une maladie génétique à pénétrance incomplète. Expliquer ce qu'est une maladie génétique à pénétrance incomplète.
- 2- Dans la mucoviscidose :
 - a- Quelle protéine est mutée.
 - b- Quel est son rôle physiologique.
- 3- Quel est le risque de récurrence pour un couple après la naissance d'un enfant atteint d'une maladie autosomique récessive.
- 4- Quels sont les matériels biologiques entrants au laboratoire de biologie moléculaire ?
- 5- Criblage des réarrangements de grande taille des gènes : principe

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

Examen de
UE PL2-18 Biologie Moléculaire

2^{ème} session Mai 2016

L'épreuve d'une durée de 45 minutes comporte:

2 exercices

5 questions à réponses courtes

Total de 40 points

(3 pages)

Exercice 1 : 15

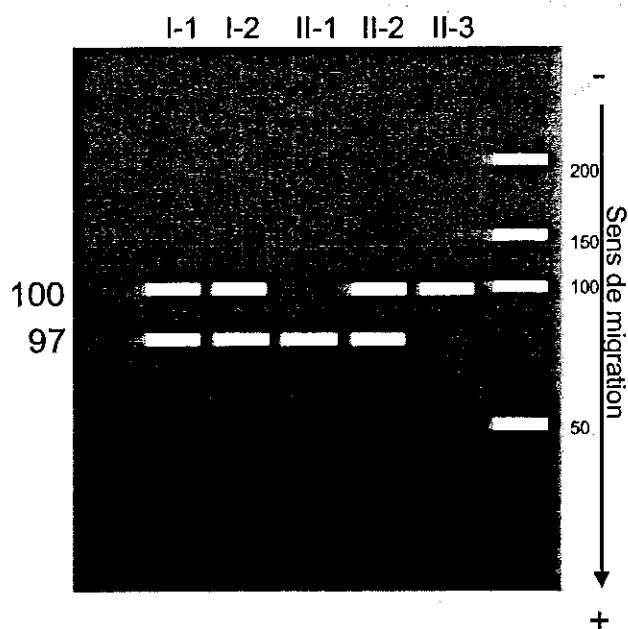
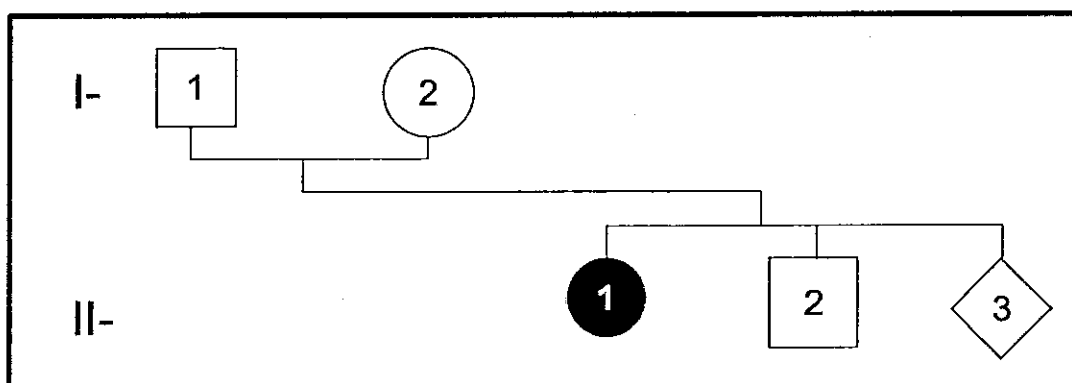
La famille dont l'arbre généalogique est représenté ci-dessous (**document 1**) présente un membre (II-1) atteint d'une maladie génétique. Le couple présenté sur l'arbre a un nouveau projet parental et souhaiterait savoir si l'enfant à naître (II-3) sera atteint ou non de la pathologie.

La cause moléculaire majeure de cette affection est liée à une délétion au niveau du gène **CFTR**, situé sur le chromosome 7.

L'allèle muté « a » à l'origine du phénotype malade est caractérisé par la **délétion de trois nucléotides dans l'exon 10 du gène CFTR entraînant la perte d'une phénylalanine en position 508 de la protéine (p.Phe508del)**. La différence de taille entre l'allèle muté (a) et sauvage (A) pourra être utilisée dans la méthode de détection pour établir le génotype des différents membres de la famille.

Après extraction de l'ADN génomique à partir des leucocytes sanguins, un fragment d'ADN de l'exon 10 du gène **CFTR** contenant la région susceptible d'être mutée est amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de cet exon encadrant la zone cible. La taille des fragments amplifiés est évaluée après électrophorèse en gel d'agarose par comparaison à un standard de taille. Les profils d'électrophorèse obtenus pour les différents membres de la famille sont présentés dans le **document 2**.

Document 1 :



QUESTIONS :

1. Quel est le nom de la maladie génétique dont II-1 est atteint
2. Donner le génotype des individus I-1, I-2.
3. D'après l'analyse des résultats, l'enfant à naître (II-3) présente-t-il un risque d'être atteint de la pathologie ? Donner le génotype de l'enfant.
4. Quel est le risque pour le couple I-1 et I-2 :
 - a. de transmettre l'anomalie à sa descendance et
 - b. d'avoir des enfants atteints de la maladie.
5. Quelle méthode biologique utilisant les caractéristiques physiopathologiques de la maladie est utilisée en clinique pour dépister cette maladie ? Quel est le marqueur biologique d'un patient atteint ?

Exercice 2 : 15 points

Le gène « *football* » a été cloné dans un plasmide d'expression de 6 700pb.

1. Expliquer quelles sont les différences et les analogies entre un plasmide d'expression et un plasmide de clonage
2. Le gène de 1458 pb est cloné dans le vecteur d'expression procaryote.
 - a. Quel est la taille du plasmide recombinant
 - b. Expliquer les différentes étapes permettant le clonage du gène *football* dans le plasmide d'expression.
 - c. Expliquer les avantages et les inconvénients de l'utilisation du système procaryote pour la synthèse de la protéine recombinante « Football »
 - d. Les bactéries compétentes de type *Escherichia coli* sont utilisées pour exprimer la protéine football. Expliquer les 3 techniques de purification que vous pouvez utiliser afin d'obtenir une protéine pure à partir de cette culture de bactéries.

Questions à réponses courtes : 10 points

1. Principe du séquençage de nouvelle génération (en 8 phrases maximum). Par quel critère détecte-t'on une mutation ponctuelle à l'état hétérozygote ?
2. Quantification et qualification de l'ADN génomique humain : décrire le principe de la (des) méthode(s) employée(s)
3. Comment peut-on visualiser le résultat d'une réaction de PCR ?
4. Citer les 4 principales caractéristiques des amorces de PCR lors de leur design
5. Expliquer brièvement le terme « siRNA » et ses applications thérapeutiques potentielles.

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

Examen de
UE PL2-17 Biologie Moléculaire

1ère session, 04/05/2015

L'épreuve d'une durée de 45 minutes comporte:

2 exercices

4 questions à réponses courtes

Total de 40 points

(4 pages)

Exercice 1 : 16 points

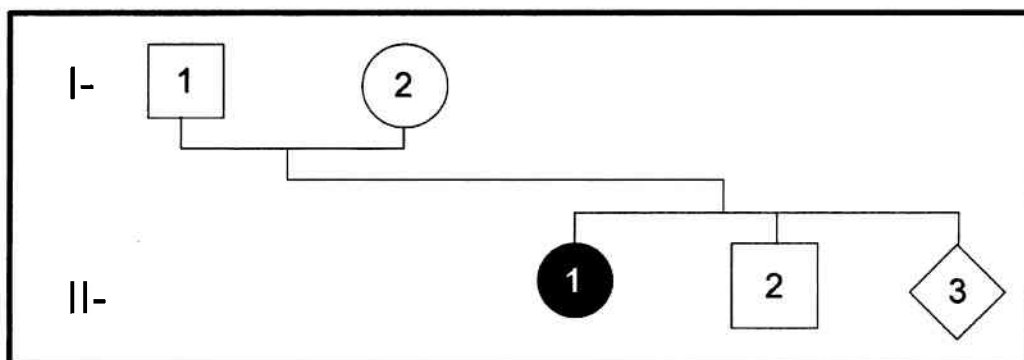
La famille DUPONT dont l'arbre généalogique est représenté ci-dessous (**document 1**) présente un membre atteint de mucoviscidose. Le couple présenté sur l'arbre a un nouveau projet parental et souhaiterait savoir si l'enfant à naître sera atteint ou non de la pathologie. P.Phe508del.

La cause moléculaire majeure de cette affection est liée à une délétion au niveau du gène X, situé sur le chromosome 7.

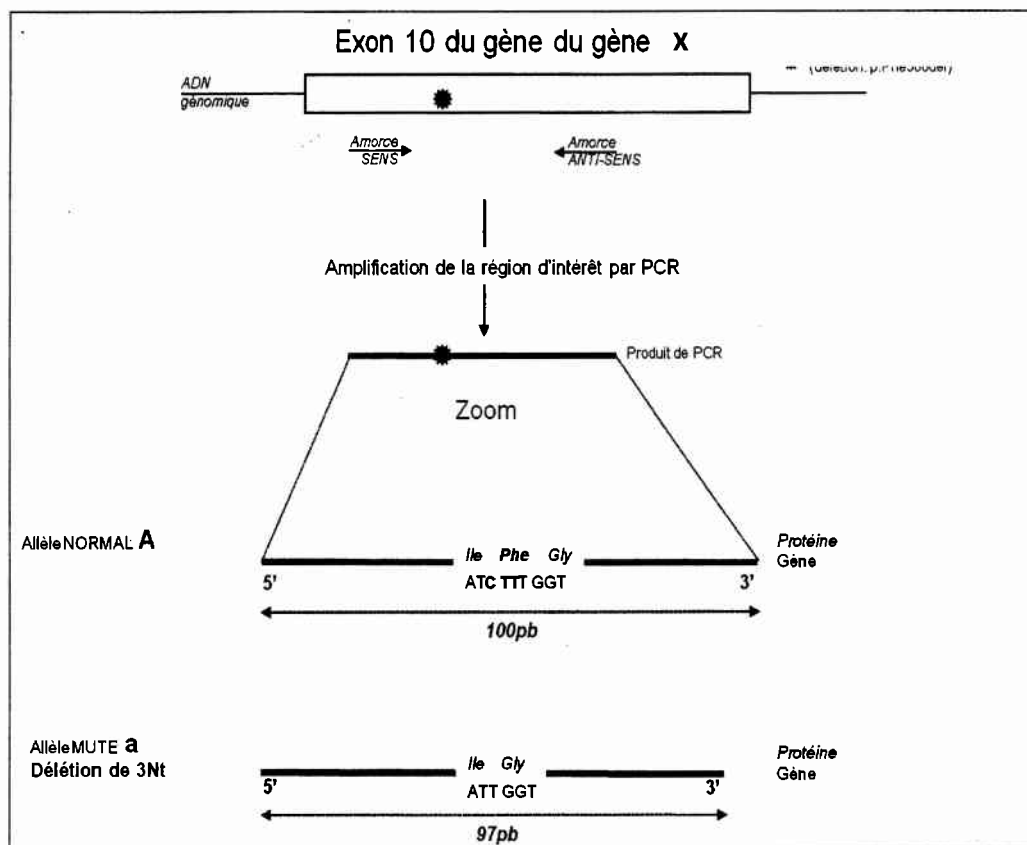
L'allèle muté « a » à l'origine du phénotype malade est caractérisé par la **délétion de trois nucléotides dans l'exon 10 du gène X entraînant la perte d'une phénylalanine en position 508 de la protéine (p.Phe508del)**. La différence de taille entre l'allèle muté et sauvage pourra être utilisée dans la méthode de détection pour établir le génotype des différents membres de la famille (**document 2**).

Après extraction de l'ADN génomique à partir des leucocytes sanguins, un fragment d'ADN de l'exon 10 du gène X contenant la région susceptible d'être mutée est amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de cet exon encadrant la zone cible. La taille des fragments amplifiés est évaluée après électrophorèse en gel de polyacrylamide par comparaison à un standard de taille. Les profils d'électrophorèse obtenus pour les différents membres de la famille sont présentés dans le **document 3**.

Document 1 : Arbre généalogique de la famille Dupont



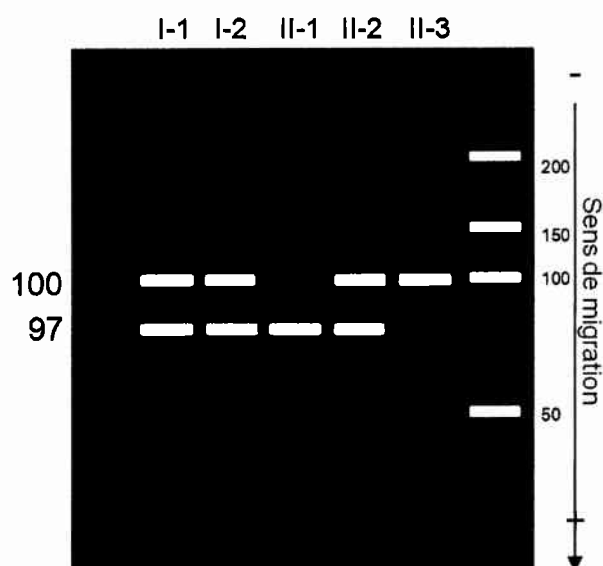
Document 2 : Schéma global de la méthode RFLP utilisée pour l'analyse de la variation de séquence (délétion p.Phe508del)



Légende du document 2 :

L'étoile noire représente la région susceptible d'être porteuse de la variation de séquence (délétion p.Phe508del)

Document 3 : Gel d'électrophorèse



Légende du document 3:

Les fragments d'ADN détectés apparaissent en blanc. Un marqueur de taille a été déposé dans le puits le plus à droite du gel.

Les indications de taille (100 et 97) à gauche du gel donne la taille exacte des bandes obtenues chez les différents patients.

QUESTIONS :

1. Quel est le nom du gène X ? Quel type de protéine est codé par ce gène ?
2. Déterminer le mode de transmission de l'anomalie.
3. Donner le génotype des individus I-1, I-2.
4. D'après l'analyse des résultats, l'enfant à naître (II-3) présente-t-il un risque d'être atteint de la pathologie ? Donner le génotype de l'enfant.
5. Quel est le risque pour l'individu II-2 (*en admettant que sa conjointe n'est pas porteuse de l'anomalie*)
 - a. de transmettre l'anomalie à sa descendance et
 - b. d'avoir des enfants atteints de la maladie.
6. Quelle méthode biologique utilisant les caractéristiques physiopathologiques de la maladie est utilisée en clinique pour dépister cette maladie ? Quel est le marqueur biologique d'un patient atteint ?

Exercice 2 : 16 points

L'érythropoïétine (EPO) recombinante humaine (rHuEPO) issue du génie génétique est utilisée chez les patients présentant une anémie symptomatique. L'érythropoïétine est constituée de 161 acides aminés et possède 3 sites de N-glycosylation et un site de O-glycosylation. Pour synthétiser cette protéine les industriels ont cloné la séquence humaine de l'EPO dans un plasmide d'expression.

Questions :

- 1) Quels sont les caractéristiques d'un vecteur d'expression par rapport à un vecteur de clonage ?
- 2) En justifiant votre réponse, quel(s) système(s) de production pouvez utiliser pour produire l'EPO humaine recombinante utilisée comme biomédicament ?
- 3) Décrire les différentes étapes (allant du clonage à la protéine purifiée) pour l'obtention de l'EPO humaine recombinante (vous pouvez vous aider de schémas en complément).

Questions à réponses ouvertes courtes (QROC) : 8 points

QROC1 : L'extraction de l'ADN génomique humain s'effectue en plusieurs étapes. Les lister dans l'ordre de leur réalisation.

QROC2 : Quels sont les différents types de prélèvement entrant au niveau d'un laboratoire de génétique moléculaire en cancérologie ?

QROC3 : Quelles sont les différentes catégories de gènes dont l'altération va favoriser la prolifération tumorale ?

QROC4 : Citer 2 techniques d'inhibition d'expression de gène

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

Examen de
UE PL2-17 Biologie Moléculaire

2eme session 2015

L'épreuve d'une durée de 45 minutes comporte:

2 exercices

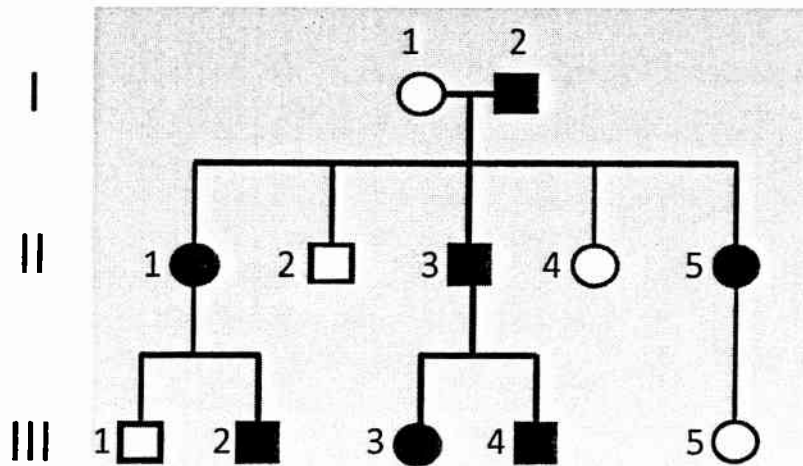
5 questions à réponses courtes

Total de 40 points

(3 pages)

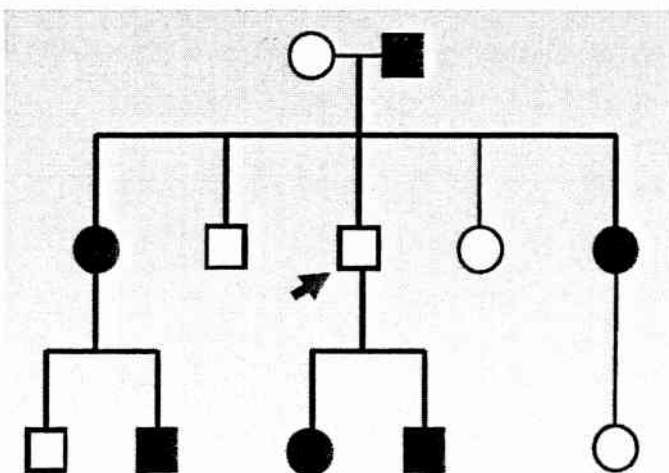
Exercice 1 : 15 points

Plusieurs cas de neurofibromatose de type 1 sont présent dans une famille dont l'arbre généalogique est présenté ci-dessous.



Questions :

- 1- D'après cet arbre génétique quel est le mode de transmission de la neurofibromatose de type 1 ?
- 2- En admettant que les épouses des individus III 1 et III 4 sont saines :
 - a) Quel est le risque pour l'individu III 1 d'avoir un enfant malade ?
 - b) Quel est le risque pour l'individu III 3 d'avoir un enfant malade ?
- 3- Une autre famille présentant également des cas de neurofibromatose de type 1 vient en consultation génétique et un arbre génétique est effectué.



Quel phénomène génétique permet d'expliquer le phénotype du patient pointé d'une flèche sur l'arbre obtenu ?

Exercice 2 : 15 points

On cherche à cloner le gène d'intérêt dans un plasmide d'expression. Le plasmide fait 2700 pb et possède un site de clonage comme décrit dans la figure A avec des sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction : PstI, SacI, EcoRV, BamHI, Sall, AclI, HindIII. Le gène d'intérêt fait 1270 pb et possède des sites de reconnaissances d'enzymes de restriction comme décrit dans la figure B (les chiffres sous le nom des enzymes désignent la position du site sur le gène d'intérêt).

Questions :

1. Quelle enzyme allez-vous choisir pour réaliser ce clonage. Justifier votre réponse.
2. Quelles sont les tailles du plasmide recombinant et non recombinant (justifiez votre réponse).
3. Le plasmide recombinant est digéré par les enzymes BamHI et KpnI.
 - a. Quelles sont les tailles des fragments observés après digestion enzymatique.
 - b. Expliquer comment vous pouvez visualiser les fragments obtenus.

Questions à réponses ouvertes courtes (QROC) : 10 points

QROC1 : Principe de l'exploration (et du calcul) des réarrangements de grande taille

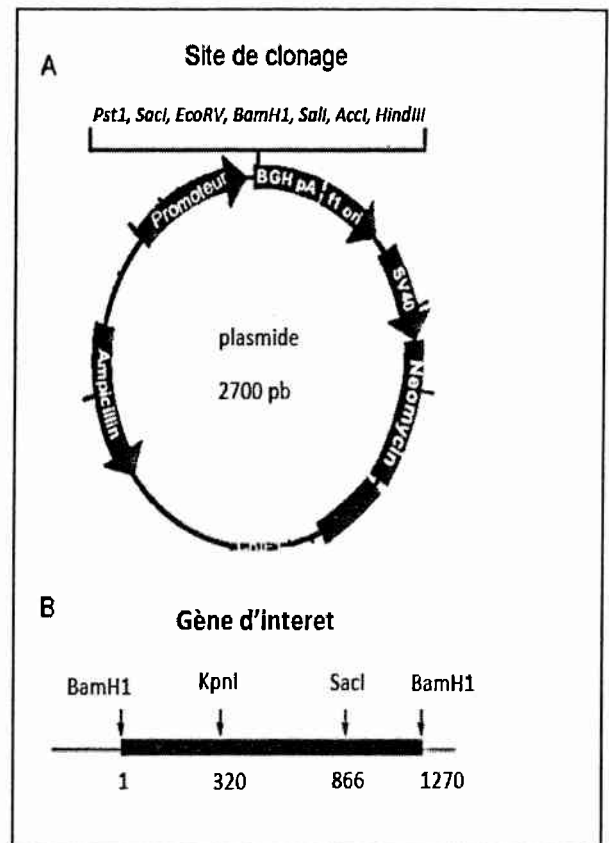
QROC2 : Principaux critères de bonne qualité de l'ADN génomique

QROC3 : Le criblage des mutations ponctuelles : définition, intérêts et inconvénients

QROC4 : Citer 3 des 5 maladies génétiques dépistées chez le nouveau né au 3^{ème} jour de vie ?

QROC5 : Compléter la séquence d'ADN double brin suivant sachant qu'il s'agit d'une séquence palindromique :

5' GATT- - - - 3'
3' - - - - - 5'



Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

Examen de
UE PL2-17 Biologie Moléculaire

1ère session, 05/05/2014

L'épreuve d'une durée de **45 minutes** comporte:

2 exercices

3 questions

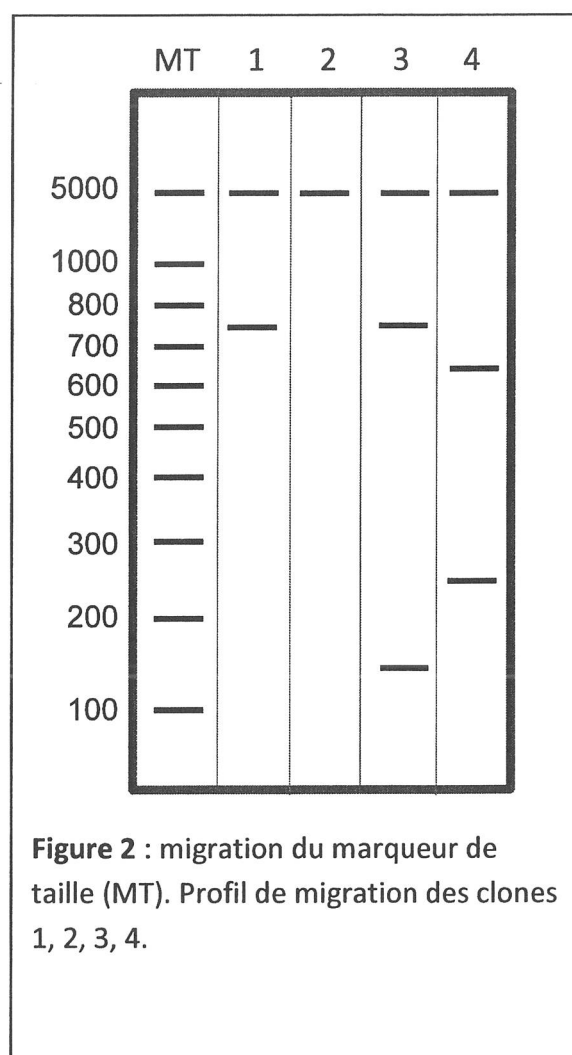
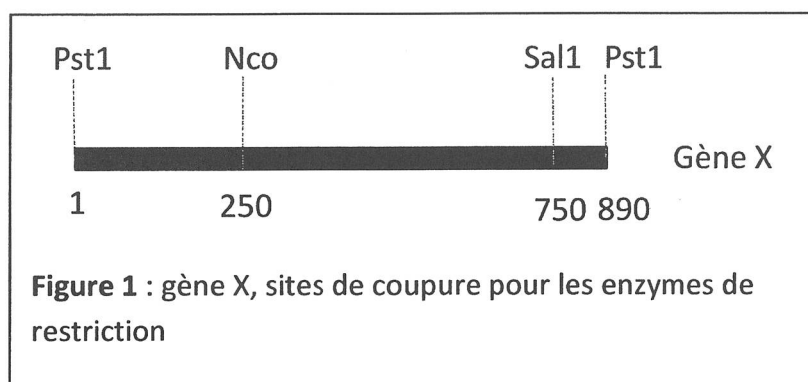
Total de 40 points

(3 pages)

Exercice 1 : 25 points

Nous souhaitons cloner le gène X pour synthétiser une protéine recombinante en vue d'une production d'un biomédicament. La protéine codée par le gène X possède 2 ponts di-sulfures et est glycosylée. La séquence du gène X de 890pb présente un site de reconnaissance pour l'enzyme Pst1 en position 1 et 890 pb, une pour Nco en position 250 et une pour Sal1 en position 750. Le gène X est représenté dans la **figure 1**. Pour réaliser le clonage nous souhaitons utiliser un plasmide de 5000pb qui possède dans son site de clonage 4 sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction : Pst1, Nco, EcoRV et SacII.

- 1- Quelle enzyme de restriction pouvez-vous utiliser pour cloner le gène X dans le plasmide (justifier votre choix) ?
- 2- Quelles sont les tailles des plasmides recombinant et non recombinant ?
- 3- Quelles sont les caractéristiques d'un vecteur d'expression par rapport à un plasmide de clonage ? Expliquer en quoi elles sont importantes.
- 4- Au cours du clonage, le *screening* des bactéries ayant intégré le plasmide recombinant est réalisé par une analyse des fragments de restriction. Pour cela l'ADN des différents clones bactériens (clone de 1 à 4) a été purifié et digéré par 2 enzymes de restriction Pst1 et Sal1. Le profil de migration des fragments obtenu est représenté dans la **figure 2** après électrophorèse sur un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Quel clone possède le plasmide recombinant ? (justifiez votre réponse).
- 5- Quel système hôte allez-vous ensuite utiliser pour produire la protéine ? (justifiez votre réponse)
- 6- Citer 3 techniques de purification de protéine pour obtenir la protéine recombinante pure.



Exercice 2 : 5 points

Compléter la séquence palindromique suivante

5' AGTC????

????????

Questions à réponse courte : 10 points

- 1- Un enfant avec une toux chronique subit un « test de la sueur ». La mesure effectuée montre une concentration d'ions chlorure de 120mmol/l (Valeur normale < 60 mmol/L).
 - a) Quelle pathologie cherche t'on à dépister ? Quel est le résultat ? *(En 1 ligne)*
 - b) Expliquer pourquoi on observe une augmentation des ions chlorure chez ce patient ? *(En 2-3 lignes)*
- 2- Après l'avoir défini, expliquer pourquoi un hétérozygote composite pour une maladie autosomique récessive développe la maladie ? *(En 3 lignes)*
- 3- Citer 2 techniques d'inhibition de gène

Université de Bordeaux
UFR des Sciences Pharmaceutiques

2^{ème} année

**Examen de
UE PL2-17 Biologie Moléculaire**

2eme session, 23/06/2014

L'épreuve d'une durée de **45 minutes** comporte:

Total de 40 points

(3 pages)

Exercice : 15 points

Le gène « *footeux* » de 1654 pb a été cloné dans le plasmide représenté dans la figure 1A. Le plasmide de 6000pb possède 5 sites de coupures pour les enzymes de restriction *SacI*, *SalI*, *NcoI*, *NsaI*, *BamHI*. Le gène *footeux* (Figure 1B) est constitué de 1654 pb et possède 4 sites de reconnaissance pour les enzymes *SalI* en position 1 et 1654, *PstI* en 1320, *EcoRV* en 1480. Le gène *footeux* a été cloné dans le plasmide grâce à l'enzyme *SalI*.

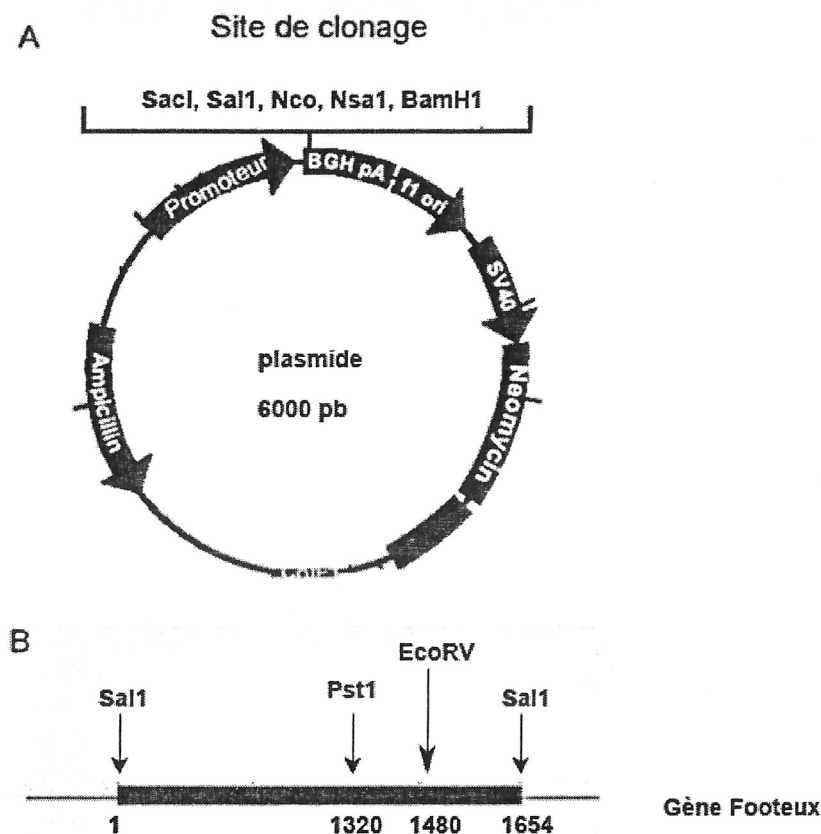


Figure 1 : présentation du plasmide et du gène *footeux* .

- A) Plasmide de 6000 pb avec son site de clonage.
- B) gène *footeux*, constitué de 1654 pb. Les flèches représentent les sites de coupure par les enzymes de restrictions.

Questions :

- 1- Décrire les différentes possibilités pour obtenir l'ADN codant pour le gène *footeux* en vu de son clonage sachant que cette protéine est exprimée dans les hépatocytes.
- 2- Décrire les 5 étapes nécessaires pour cloner le gène *footeux* dans le plasmide
- 3- Expliquez et détaillez à l'aide d'un schéma les tailles des fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique par *SalI*, *PstI* et *EcoRV* du non plasmide recombinant et recombinant (Justifier et organiser vos réponses).
- 4- Représentez les différents profils de migration que vous obtenez lorsque l'ADN digéré est analysé dans un gel d'Agarose avec du Bromure d'éthidium pour les 2 conditions : plasmide non recombinant et recombinant.

Question : 13 points

Quels sont les avantages et les inconvénients des systèmes de production de protéines recombinantes par l'utilisation des systèmes procaryotes, eucaryotes et les animaux transgéniques.

Questions à réponses courtes : 12 points

- 1- Quantification et qualification de l'ADN génomique humain : décrire le principe de la (des) méthode(s) employée(s)
- 2- Principe de l'exploration (et du calcul) des réarrangements de grande taille
- 3- Le criblage des mutations ponctuelles : définition, intérêts et inconvénients
- 4- Sur quel principe de base de biologie moléculaire repose la technique de High résolution melt (HRM) ?

Université Segalen Bordeaux 2
UFR des Sciences Pharmaceutiques

Examen de
UE PL2-17 Biologie moléculaire

2^{ème} année

1^{ère} session, 15/05/2013

L'épreuve d'une durée de **45 minutes** comporte:

1 Exercice

8 Questions à réponses courtes

Exercice : 20 points

L'hormone humaine H1 est une glycoprotéine de 30 000 daltons produite par génie génétique. Le gène *H1*, de 2220 pb, codant pour cette protéine est représenté dans la figure 1A. L'analyse de la séquence montre des sites de restriction pour 3 enzymes : *SacI* en position 1 et 2220, *EcoRI* en position 1200 et *PstI* en position 350.

Afin de produire l'hormone humaine, la séquence du gène *H1* humain est clonée dans le plasmide pcDNA3 représenté dans la figure 1B. Son site de clonage possède des sites de reconnaissance pour 3 enzymes : *Sac I* en position 80, *Nco* en position 120 et *KpnI* en position 203.

- 1) A l'aide d'un schéma décrire les étapes principales permettant la production d'une protéine recombinante.
- 2) Au cours du clonage du gène *H1* dans le plasmide pcDNA3, un criblage des clones bactériens a été réalisé. Cinq clones ont été testés. Les ADN de ces 5 clones ont été digérés par 3 enzymes de restrictions : *PstI*, *EcoRI* et *SacI*. Les profils de migration dans un gel d'agarose sont représentés dans la figure 2.
 - a. Quelle est la taille du plasmide recombinant ?
 - b. D'après les profils de migration des fragments obtenus après digestion enzymatique, quel(s) clone(s) possède(nt) le plasmide recombinant ?
- 3) Quel hôte allez-vous choisir pour la production de cette protéine humaine ?
- 4) Après avoir transfecté les cellules hôtes, comment sélectionner la cellule qui a intégré le plasmide pour une production stable de protéine ?
- 5) Les lysats cellulaires du clone cellulaire sont récupérés et une purification de la protéine est réalisée. La figure 3 montre le résultat de la migration des protéines sur un gel de polyacrylamide du lysat cellulaire avant purification (ligne 1), puis 3 fractions correspondant à 3 étapes de purification (ligne 2-3-4). Le gel a été coloré par un colorant marquant les protéines. Quelle fraction d'élution allez-vous utiliser pour réaliser une préparation de H1 à usage pharmaceutique ? Pourquoi cette étape est importante ? (Justifier votre réponse)

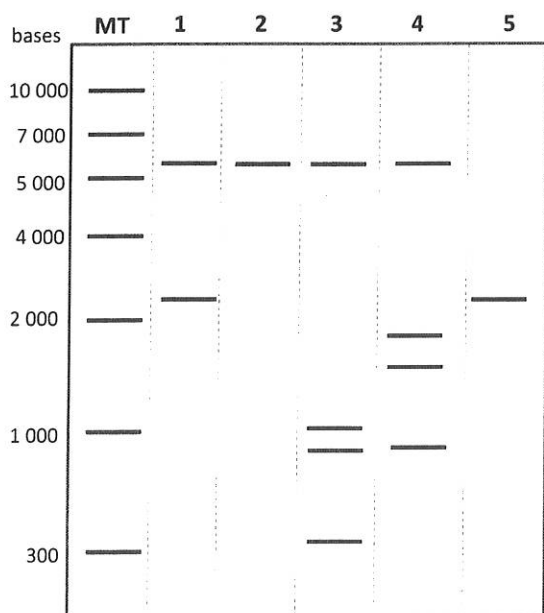
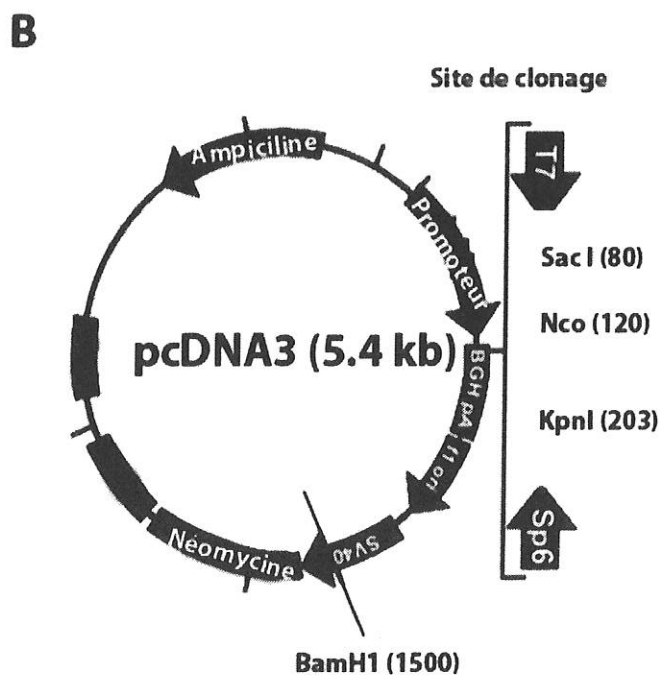
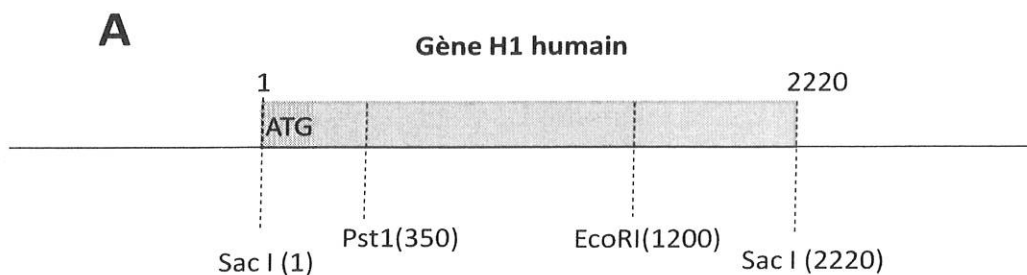
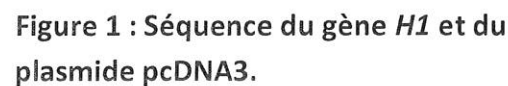


Figure 2 : Gel d'agarose avec du bromure d'éthidium, analyse aux UV. MT (marqueur de taille, bases), 1-2-3-4-5 numéro des clones analysés.



A) Séquence du gène *H1* avec les sites de restriction pour Sac I, Pst1, EcoRI.

B) Carte du plasmide pcDNA3 avec le site de clonage possédant 3 sites de coupure d'enzymes : Sac 1, Nco, et KpnI. Le plasmide pcDNA 3 ne possède pas de site de reconnaissance pour Pst1 et EcoRI. BamH1 coupe le plasmide en position 1500. Ampicilline et néomycine : gène de résistance à l'Ampicilline et la Néomycine

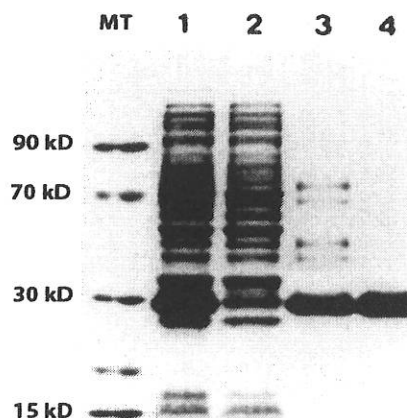


Figure 3 : gel de polyacrylamide, coloration des protéines. MT (marqueurs de taille en k Daltons), piste 1 : lysat total avant purification, 2-3-4 correspond à 3 fractions de purification à partir du lysat cellulaire total.

Questions à réponses courtes : 20 points

1. Comment peut-on visualiser le résultat d'une réaction de PCR ?
2. En vue d'effectuer la recherche de mutation ponctuelle dans un gène par une technique de criblage séparant les éventuels hétéroduplex, quelle étape particulière doit être ajoutée à la réaction de PCR ?
3. Quelle est la première étape d'une réaction de PCR ?
4. Quels sont les matériels biologiques entrants au laboratoire de biologie moléculaire ?
5. Criblage des réarrangements de grande taille des gènes : principe
6. Génotypage : principe et présentation succincte d'une application
7. Quantification et qualification de l'ADN génomique humain : décrire le principe de la (des) méthode(s) employée(s)
8. Citer une méthode directe et une méthode indirecte de recherche de mutation ponctuelle d'un gène

Université Segalen Bordeaux 2
UFR des Sciences Pharmaceutiques

Examen de
UE PL2-17 Biologie moléculaire

2^{ème} année

2^{ème} session, 3 Juillet 2013

L'épreuve d'une durée de **45 minutes** comporte:

2 Questions rédactionnelles

3 Questions à réponses courtes

I- Question rédactionnelle sur 8 points :

L'altéplase (Actilyse®) est une forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) utilisé comme médicament thrombolytique lors d'embolie pulmonaire, d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral ischémique. Il est obtenu par génie génétique. Le t-PA est une protéase de 527 acides aminés qui nécessite des modifications post-traductionnelles pour être active.

- 1) A l'aide d'un schéma décrire les différentes étapes pour l'obtention d'une protéine recombinante.
- 2) Pourquoi la production de cette protéine recombinante est-elle réalisée avec des cellules eucaryotes de type CHO.
- 3) Expliquer les avantages et les inconvénients des systèmes eucaryote et procaryote pour la production des protéines recombinantes.

II- Question rédactionnelle sur 6 points :

L'hémochromatose génétique : diagnostic biologique et moléculaire

III- Questions à réponses courtes sur 6 points

1. Citer les critères de choix d'un couple d'amorces de PCR
2. Citer 2 techniques d'inhibition d'expression de gène
3. Citer une méthode directe et une méthode indirecte de recherche de mutation ponctuelle d'un gène

UFR des Sciences Pharmaceutiques

Examen de Biologie Moléculaire et Génétique 2^{ème} année, 1^{ère} session, 21 Mai 2012

I- Exercice sur 6 points :

L'altéplase (Actilyse®) est une forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) utilisé comme médicament thrombolytique lors d'embolie pulmonaire, d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral ischémique. Il est obtenu par génie génétique. Le t-PA est une protéase de 527 acides aminés qui possède plusieurs ponts disulfures et qui a besoin d'une structure tertiaire pour être active.

- 1) Le clonage du gène t-PA est réalisé dans un plasmide de 6200 paires de bases dont la carte est représentée dans la figure 1A. La séquence du gène codant pour le t-PA (1551 pb) est présentée dans la figure 1B avec les sites de reconnaissance pour différentes enzymes de restriction. D'après les données de la figure 1A et 1B, quelle enzyme de restriction peut-on utiliser pour le clonage du gène t-PA dans le plasmide proposé ? Justifiez votre réponse.
- 2) Comment sélectionner le clone bactérien ayant intégré le plasmide recombinant ?
- 3) Quatre clones de bactéries ont été sélectionnés. Après extraction de l'ADN de chaque clone et une digestion enzymatique par les 2 enzymes de restriction : Nsa I et BamH1, les fragments obtenus ont été analysés sur un gel d'agarose. D'après le profil de migration présenté dans la figure 2, quel est le clone de bactérie qui possède le plasmide recombinant? (justifier votre réponse)
- 4) Pourquoi utilise-t-on pour la production du t-PA recombinant la lignée de cellule CHO ?
- 5) Comment sélectionne-t-on la cellule qui a intégré le plasmide permettant une production de t-PA ?

Figure 1

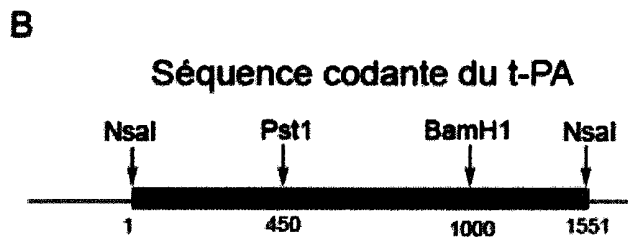
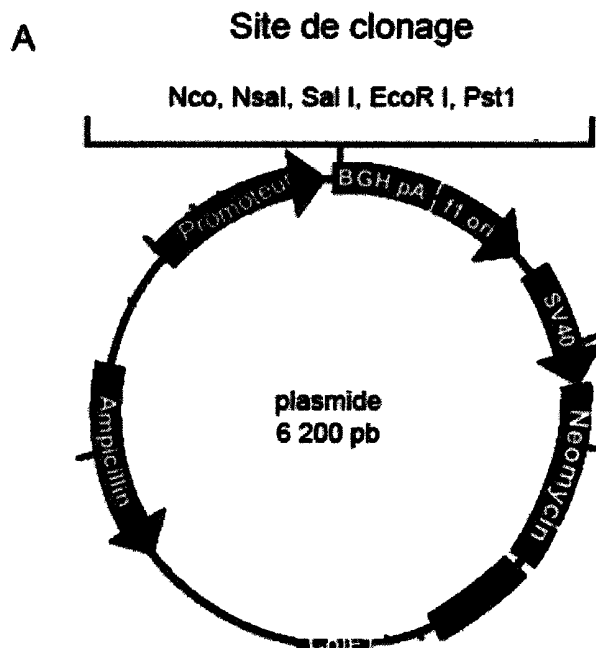
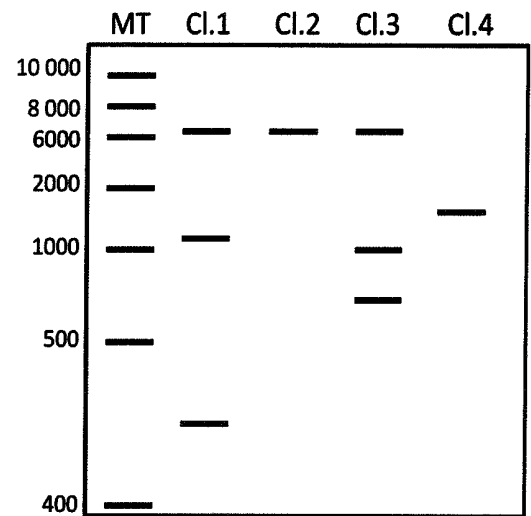


Figure 2



Profil de migration après digestion avec NsaI et BamHI. MT : marqueur de taille, Cl.= numéro de clone bactérien

II- Question rédactionnelle sur 6 points :

Expliquer la différence entre constitutionnel et acquis, au niveau des mutations, de leur présentation cellulaire, de leur incidence sur la pathologie et de leur transmission familiale, uniquement pour la pathologie cancéreuse.

III- Questions à réponses courtes sur 8 points

- 1) Citer 2 techniques d'inhibition d'expression de gène
- 2) Quelle est la caractéristique majeure d'un vecteur d'expression par rapport à un vecteur de clonage?
- 3) Quels sont les types de prélèvements entrant au laboratoire de diagnostic moléculaire en cancérologie
- 4) Le criblage des mutations ponctuelles : définition, intérêts et inconvénients

UFR des Sciences Pharmaceutiques

Examen de Biologie Moléculaire et génétique 2^{ème} année, 2^{ème} session, Juillet 2012

I- Question 1 sur 6 points :

Décrire les deux principaux protocoles d'extraction de l'ADN génomique

II- Question 2 sur 6 points :

A l'aide d'un schéma décrire les différentes étapes (du clonage à la purification) pour l'obtention d'une protéine recombinante.

III- Questions à réponses courtes sur 8 points

1. Principe de l'exploration (et du calcul) des réarrangements de grande taille
2. Principaux critères de bonne qualité de l'ADN génomique
3. Citer les techniques de transfert de gène dans les cellules eucaryotes ?
4. Expliquer la thérapie génique d'augmentation