

## Correction du DM n°5 – La petite histoire de Wolfram

1/	BD	2/	AD	3/	ABCD	4/	CD	5/	ABC
6/	AD	7/	CD	8/	C	9/	A	10/	E

### QCM 1 : BD

A) FAUX.

B) VRAI : on va lire la séquence en déterminant la nature de tous les terminateurs de chaîne de la multitude de brins générés. Comme on génère des brins de toutes les tailles, certains se sont arrêtés au premier nucléotide, d'autres au deuxième etc... jusqu'à ce qu'un brin s'arrête au dernier nucléotide de la séquence ! En lisant à chaque fois le dernier nucléotide de tous les fragments et en remettant les fragments dans l'ordre on peut déterminer toute la séquence nucléotidique !

C) FAUX.

D) VRAI : un ddNTP possède un ribose qui a été désoxygéné deux fois : en 2' mais aussi en 3'. Il a donc une extrémité 3'-H au lieu d'une extrémité 3'-OH ce qui empêche la polymérase de faire des liaisons de type phosphoester et stoppe donc la synthèse du brin !

E) FAUX.

### QCM 2 : AD

A) VRAI : la polymérase incorpore à chaque fois au hasard un dNTP ou un ddNTP ! La synthèse s'arrête donc pour chaque brin généré à un stade différent.

B) FAUX : il y a **4 ddNTP différents**, donc chaque fragment se termine par l'un de ces 4 ddNTP.

C) FAUX : ce sont les **ddNTP** qui sont terminateurs de chaîne et qui sont chacun liés à un fluorochrome !

D) VRAI : la séquence du brin séquencé sera lue de bas en haut et par complémentarité.

E) FAUX.

### QCM 3 : ABCD

A) VRAI.

B) VRAI.

C) VRAI.

D) VRAI.

E) FAUX.

### QCM 4 : CD

A) FAUX : on détermine la **succession de nucléotides** qui compose l'ADN et non pas leur nombre (on s'intéresse à la nature des nucléotides ce n'est pas une technique quantitative).

B) FAUX : les ddNTP et les dNTP sont incorporés **au hasard** par la polymérase, et donc pas nécessairement tour à tour !

C) VRAI.

D) VRAI : on lit la séquence du brin séquencé de bas en haut et par complémentarité **après migration électrophorétique**.

E) FAUX.

### QCM 5 : ABC

A) VRAI : la seule façon de diagnostiquer une mutation est avec une méthode **directe**, c'est-à-dire en la **séquençant** directement ! Même si la PCR-RFLP avec des enzymes de restriction met en évidence une mutation le diagnostic devra **toujours être confirmé** par un séquençage.

B) VRAI : le NGS a beau être beaucoup plus puissant que le Sanger, ce dernier est la **seule technique de référence** dans la mesure où on n'a pas suffisamment de recul avec le NGS en termes de fiabilité pour s'en contenter.

C) VRAI : même si dans le cas du syndrome de Wolfram, si l'un des deux parents possède un variant d'épissage ce séquençage sera dans un premier temps illisible et nécessitera d'utiliser un clonage moléculaire afin d'amplifier et de purifier/séparer les produits d'amplification paternel et maternel. On fera tout de même un séquençage en première intention.

D) FAUX : toute la phrase est vraie mais pour les **ddNTP** et non pas pour les dNTP !

E) VRAI.

### QCM 6 : AD

- A) VRAI : il est très important de retenir que dans le cas de **deux mutations ponctuelles**, le diagnostic pourra être **directement posé** après un séquençage, alors que dans le cas où un **variant d'épissage** est impliqué il faudra avoir nécessairement recours au **clonage moléculaire** pour pouvoir séquencer les deux allèles parentaux séparément dans un second temps, car le séquençage est de prime abord illisible !
- B) FAUX : c'est bien le gène WFS1 qui est responsable mais il code pour la **Wolframine**, pas pour son récepteur !
- C) FAUX : on recherche alors une mutation **intronique**. Retenez qu'on ne séquence que les exons, si on ne trouve rien c'est donc que la mutation est située **dans un intron** !
- D) VRAI : on utilise une enzyme virale, la **transcriptase inverse** qui synthétise un **ADNc** en **se servant de l'ARNm comme matrice**.
- E) FAUX.

### QCM 7 : CD

- A) FAUX : elle est issue d'un rétrovirus et est donc d'**origine virale** !
- B) FAUX : elle permet la synthèse d'un brin d'**ADN** complémentaire en prenant un **ARN** comme matrice
- C) VRAI : on utilise la **RNase H** pour dégrader l'ARN hybridé à l'ADN simple brin !
- D) VRAI : cette enzyme génère un ADNc à partir d'un **primer** constitué de **plusieurs T successifs** (on parle de queue d'**oligo-dT**), pour qu'il puisse **s'hybrider** au niveau de la **queue poly-A des ARNm** !
- E) FAUX.

### QCM 8 : C

- A) FAUX : le syndrome de Wolfram est bien de transmission autosomique récessive, mais pas l'achondroplasie qui est de transmission **autosomique dominante** ATTENTION !
- B) FAUX : son diagnostic repose sur une étude des ARNm issus de la transcription du gène WFS1 après une étape de transcription inverse pour les changer en ADNc ! On ne s'intéresse pas à la protéine dans le diagnostic.
- C) VRAI : l'extraction au phénol-chloroforme est **acide** pour l'ARN mais basique pour l'ADN attention !
- D) FAUX : un des exons sera nettement **plus long** à cause du **site cryptique d'épissage** qui rend une région non codante (et donc épissée) codante qui va rester dans l'ARNm mature après épissage !
- E) FAUX.

### QCM 9 : A

- A) VRAI : c'est important de savoir quelle peut être la forme clinique du syndrome !
- B) FAUX : la transmission de la maladie est autosomique **récessive**, il faut donc que **les deux allèles soient mutés** pour que le syndrome se développe chez le patient, sinon il est porteur sain !
- C) FAUX : la fonction exacte de la Wolframine n'est certes pas connue, mais on sait cependant qu'elle est impliquée dans le flux **calcique** de l'organisme
- D) FAUX : très important, le codon START n'est pas toujours nécessairement situé dans le premier exon comme c'est le cas ici, où il est situé sur le **deuxième** !
- E) FAUX.

### QCM 10 : E

- A) FAUX : on fait ça pour une **mutation ponctuelle**, ciblée qui est toujours la même et qui va se retrouver dans une séquence palindromique reconnue par une enzyme de restriction spécifique (cas de l'achondroplasie). Or ici il y a potentiellement plusieurs mutations réparties dans un gène, les enzymes de restriction n'ont donc aucun intérêt et on fait directement une PCR suivie d'un séquençage !
- B) FAUX : le Séquençage Haut Débit est indiqué pour détecter plusieurs mutations dans plusieurs gènes, mais il est beaucoup trop puissant pour une maladie ne touchant qu'un seul gène ! De plus il faut toujours confirmer un NGS par un séquençage classique utilisant la méthode Sanger : autant faire directement un séquençage Sanger sans perdre de temps avec un Séquençage Haut Débit ! (NGS = Séquençage Haut Débit)
- C) FAUX : dans le cas d'un **variant d'épissage** le séquençage est initialement illisible, il faut donc utiliser des techniques complémentaires de biologie moléculaire comme le clonage moléculaire avant de pouvoir l'utiliser !
- D) FAUX : c'est le rôle du **clonage moléculaire** mais pas du clonage d'expression attention à ne pas confondre les deux ils n'ont rien à voir !
- E) VRAI.

