

Université Claude Bernard  Lyon 1



# Tutorat Lyon Est

Année Universitaire 2020 - 2021

## Unité d'Enseignement Spé MEAG

Contrôle Terminal PASS de Spé Médecine/Kiné

Avril 2021

Correction détaillée

Hélène JOMAIN  
Marie NEGRIN

## Correction rapide

<u>Questions</u>	<u>Réponses</u>
1	AB
2	E
3	BD
4	AC
5	ABC
6	BE

### **Question 1 : AB**

Vous souhaitez détecter une mutation sur le codon 273 de *TP53* (exon 8). Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) exacte(s) ? Vous pouvez :

- A. Séquencer l'exon 8 de *TP53* après l'avoir amplifié par PCR
- B. Utiliser une sonde Taqman s'hybridant avec la séquence mutée
- C. Faire une MLPA de l'exon 8 de *TP53*
- D. Hybrider le transcrit avec des sondes Nanostring
- E. Faire une FISH avec une sonde ciblant *TP53*

**A VRAI** En effet, il est nécessaire d'amplifier une séquence avant de pouvoir la séquencer pour avoir une quantité suffisante de matériel génétique à étudier.

**B VRAI** On peut utiliser une sonde Taqman c'est-à-dire un fluorochrome couplé à un quencher, protéine qui absorbe à une longueur d'onde donnée l'énergie donnée par le fluorophore donneur et stoppe cette fluorescence. Comme la sonde s'hybride avec la séquence mutée, si il y a une fluorescence, c'est que la séquence est bien mutée.

**C FAUX** La MLPA permet de détecter des délétions ou des duplications d'exons ou de gènes, or on recherche une mutation sur un codon.

**D FAUX** Les sondes Nanostring permettent de détecter des skipping d'exons ou des transcrits de fusion.

**E FAUX** Extrait du cours : "Toutes les anomalies supérieures à 150-200 kb seront identifiables par la méthode de FISH"

### **Question 2 : E**

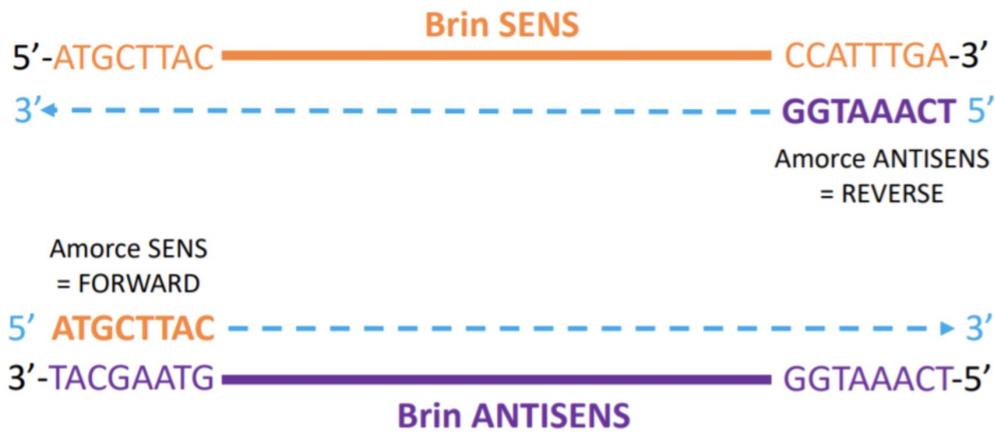
Soit la séquence de l'exon 8 de *TP53* (introns en minuscule, exon en majuscule, codon 273 en gras souligné) :

```
ctcttgcttctcttttcctatcctgagtagTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTT(...)TCACCACGA  
GCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGgtaagcaagcaggacaagaagcgggtggagg
```

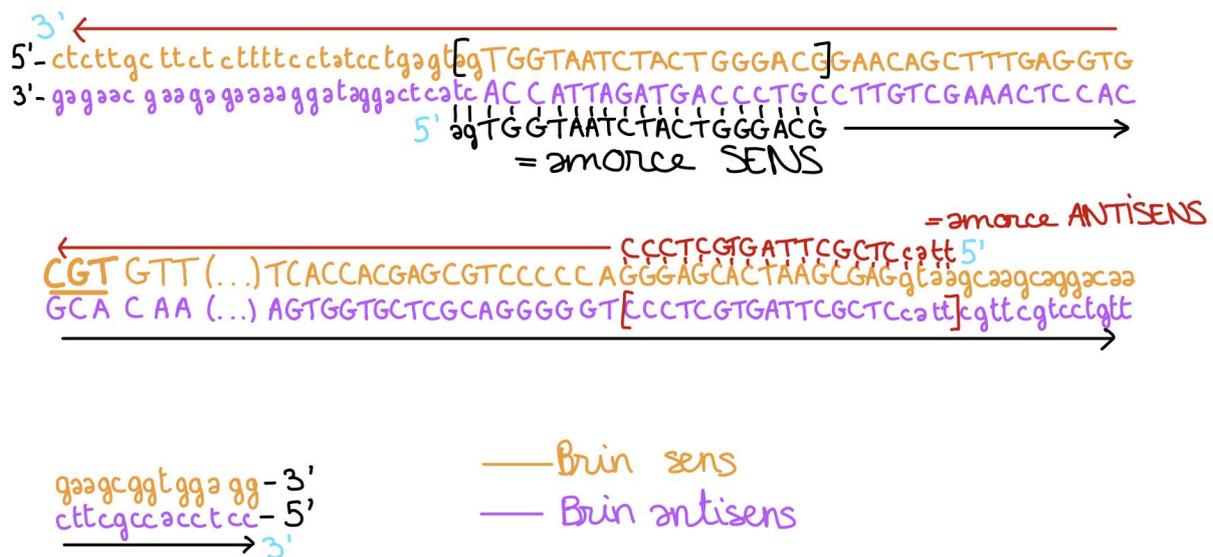
Quel(s) couples(s) d'amorces pouvez vous utiliser pour détecter par PCR-HRM une mutation du codon 273 de *TP53* ?

- A. CCTATCCTGAGTAGTGGTAA et TCACCACGAGCTGCCCCAG
- B. CCTATCCTGAGTAGTGGTAA et GGGAGCACTAAGCGAGGTAA
- C. TTACCACTACTCAGGATAGG et GGGAGCACTAAGCGAGGTAA
- D. ACAGCTTTGAGGTGCGTGTT et TTACCTCGCTTAGTGCTCCC
- E. AGTGGTAATCTACTGGGACG et TTACCTCGCTTAGTGCTCCC

Rappel sur les amorces (avec des exemples de séquences du cours) : CE SCHÉMA EST IMPORTANT À COMPRENDRE !!!



Tout d'abord, on oriente notre brin, j'ai choisi arbitrairement d'orienter la séquence qu'on nous donne en 5' → 3'. J'ai ensuite écrit en dessous du brin sens la séquence complémentaire donc le brin antisens. Ensuite on cherche les 2 amorces SENS et ANTISENS : l'amorce SENS est celle qui s'hybride sur le brin complémentaire 3' → 5' (voir schéma ci dessus), cela correspond donc aux premiers codons du brin sens donc l'amorce en noir sur le schéma ci-dessous. L'amorce ANTISENS est celle qui d'hybride sur le brin sens 5' → 3' en partant de la fin de la séquence (voir schéma ci dessus), c'est donc la séquence qui correspond aux derniers codons complémentaires au brin sens, l'amorce en rouge sur le schéma ci dessous. La bonne réponse était donc la réponse E.



- A FAUX
- B FAUX
- C FAUX
- D FAUX
- E VRAI

Question 3 : BD

Vous suspectez une trisomie 21 chez un nouveau-né. Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) exacte(s) ?

- A. Dans 95% des cas, il s'agit d'une trisomie 21 par translocation
- B. Un diagnostic rapide est possible par FISH
- C. Une étude en FISH sur noyaux interphasiques est nécessaire au conseil génétique
- D. Le risque de récurrence dépend de la forme cytogénétique de trisomie 21
- E. En cas de dépistage anténatal négatif, cette hypothèse clinique est écartée

**A FAUX** (Les explications ci dessous n'ont pas été abordées dans le cours de 2021). Il existe trois formes de trisomie 21: **la trisomie 21 libre** (96% des cas); **la trisomie 21 en mosaïque** (2% des cas); **la trisomie 21 par translocation** (2% des cas).

La trisomie la plus fréquente (95%) est donc la trisomie libre qui résulte d'une mauvaise répartition des chromosomes dans les gamètes lors de la méiose ce qui donne lieu la présence d'un chromosome surnuméraire. Dans le cas d'une trisomie libre toutes les cellules du corps du futur enfant posséderont 3 chromosomes au lieu de 2.

La trisomie 21 en mosaïque est la conséquence d'une erreur de distribution des chromosomes 21 survient lors de la deuxième, voire la troisième division cellulaire. Une partie des cellules auront donc un bon nombre de chromosomes tandis que l'autre partie des cellules auront un chromosome en plus.

Enfin la trisomie 21 par translocation est plus rare et provient d'un transfert d'un segment de chromosome vers un autre chromosome. Ceci est très important car la trisomie par translocation comporte un risque de récurrence dans une famille ayant déjà un enfant atteint de trisomie 21. L'ensemble ou une partie d'un chromosome (souvent le chromosome 14) se transloquent à une partie ou à la totalité du chromosome 21. A l'heure actuelle, on sait qu'une petite partie du chromosome 21 surnuméraire est suffisante pour faire apparaître les signes de la maladie. Les translocations surviennent sporadiquement

**B VRAI** La FISH est une méthode de cytogénétique simple et rapide qui permet le diagnostic anténatal de la trisomie. Cette technique se base sur l'hybridation *in situ* de sondes marquées sur l'ADN et permet de détecter des anomalies ciblées.

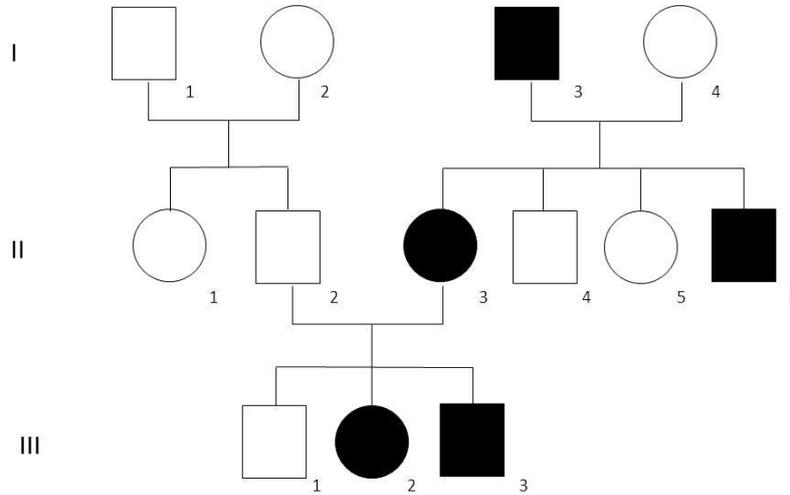
**C FAUX** Le support de l'hybridation *in situ* étant l'ADN (et non les chromosomes dans leur totalité ), nous ne sommes plus dans l'obligation de travailler sur des cellules en mitose. En effet, dans d'autres méthodes de cytogénétique conventionnelle on étudie les chromosomes doubles, on est donc obligés de travailler sur des noyaux en interphases qui ne se sont pas encore divisés.

**D VRAI** En effet ce n'est pas dit dans le cours mais le risque de récurrence dépend de la forme cytogénétique de trisomie. Par exemple, le risque est plus important si l'un des parent est porteur d'une translocation par rapport à une anomalie de novo.

**E FAUX** Attention il faut bien différencier dépistage et diagnostic. Le diagnostic de certitude est apporté uniquement par l'étude des chromosomes (le plus souvent caryotype) qui est une méthode invasive. Le dépistage lui, va venir essayer de détecter de manière non invasive la présence d'une anomalie de chromosome en prélevant du sang de la mère mais ne permet aucune certitude. On fait une prise de sang car l'ADN foetal est à moitié identique à celui de la mère puis on effectue un séquençage et un Z-score qui quantifie l'excès du chromosome 21. Cette méthode permet de réduire le nombre de gestes invasifs mais il existe des faux positifs ou des faux négatifs.

### Question 4 : AC

On vous adresse en consultation une famille pour laquelle il y a plusieurs personnes atteintes d'une insuffisance surrénalienne périphérique. En interrogeant la famille, vous reconstituez l'arbre généalogique suivant. Les individus malades sont en noir, les individus sains en blanc.



Vous réalisez une étude d'exome chez les membres de la famille qui avaient donné leur consentement pour étudier leur ADN. Concernant cette analyse quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) exacte(s) ?

- A. Les différents membres de la famille peuvent être analysés dans une même expérience grâce à l'ajout de barcodes sur les fragments d'ADN
- B. Les fragments d'ADN sont amplifiés en solution
- C. Le séquençage de 2<sup>ème</sup> génération utilise des nucléotides avec des terminateurs réversibles
- D. Plus d'un million de variants sont identifiés par cette technique pour un individu donné
- E. Les variants sont classés en 3 classes selon leur pathogénicité

**A VRAI** Les barcodes sont quelques paires de bases que l'on ajoute à la fin des séquences à analyser lorsqu'on les séquence dans une même expérience. Ils sont spécifiques à chaque patient et permettent donc de les différencier.

**B FAUX** Les brins d'ADN sont fixés sur un support solide lors de la phase d'amplification.

**C VRAI** En NGS, on utilise des terminateurs réversibles qu'on peut laver contrairement au séquençage Sanger où on utilise des terminateurs irréversibles.

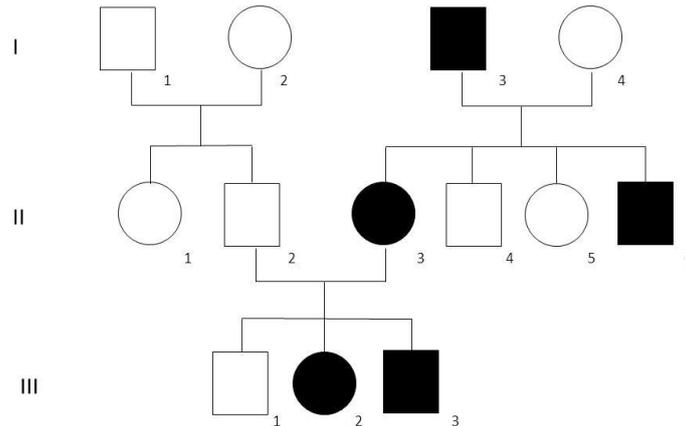
**D FAUX** Dans l'exome, on trouve entre 15 000 et 20 000 variations pour un individu.

**E FAUX** Les variants sont classés en 5 classes selon leur pathogénicité.

### Question 5 : ABC

Les précédentes études génétiques de cette famille vous ont permis d'isoler un locus pouvant contenir le gène responsable de la maladie. Trois SNPs « single nucleotide polymorphism » (A, B et C) sont regardés plus attentivement (tableau ci-dessous)

SNP	Locus		
	A	B	C
I3	A1/A1	B1/B2	C1/C2
I4	A1/A1	B1/B2	C1/C2
II2	A1/A2	B1/B1	C2/C2
II3	A1/A1	B2/B2	C1/C2
II6	A1/A1	B1/B2	C1/C1
III2	A1/A2	B1/B2	C1/C2
III3	A1/A1	B1/B2	C1/C2



Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) exacte(s) ?

- A. L'haplotype A1 B2 C1 du locus responsable co-ségrège avec la maladie
- B. L'haplotype A2 B1 C2 est un haplotype sain chez le sujet III-2
- C. L'haplotype A1 B2 C2 est un haplotype sain chez le sujet II-3
- D. Le LOD score calculé qui a permis de définir ce locus était <1
- E. La transmission de la maladie se fait selon un mode autosomique récessif

Tout d'abord on identifie dans le tableau les haplotypes correspondant à ceux des personnes malades.

SNP	Locus		
	A	B	C
I3	A1/A1	B1/B2	C1/C2
I4	A1/A1	B1/B2	C1/C2
II2	A1/A2	B1/B1	C2/C2
II3	A1/A1	B2/B2	C1/C2
II6	A1/A1	B1/B2	C1/C1
III2	A1/A2	B1/B2	C1/C2
III3	A1/A1	B1/B2	C1/C2

**A VRAI** On peut voir que toutes les personnes malades ont un haplotype A1 B2 C1, et une personne (I4) qui n'est pas malade l'a également, cela peut être issu d'une recombinaison mais cela laisse penser que cet haplotype co-ségrège avec la maladie.

**B VRAI** III-2 a comme haplotype A1/A2, B1/B2, C1/C2 donc sa mère II-3 lui a transmis l'haplotype A1 B2 C1 et son père II-2 lui a transmis l'haplotype A2 B1 C2. II-3 n'est pas malade et comme la maladie est à transmission autosomique dominante (voir E), l'haplotype A2 B1 C2 est un haplotype sain chez III-2.

**C VRAI** On sait que II-3 a transmis à son fils malade III-2 l'haplotype A1 B2 C1 (voir B) qui est donc un haplotype malade. L'haplotype A1 B2 C2 est donc un haplotype sain chez II-3.

**D FAUX** On peut dire qu'il y a une liaison entre des marqueurs lorsque le LOD score est supérieur à 3, donc il n'était pas  $<1$ .

**E FAUX** La transmission est bien autosomique car on voit qu'il y a aussi bien des hommes que femmes qui sont malades, mais elle est dominante car si elle était à transmission récessive, il n'y aurait pas autant de personnes atteintes dans l'arbre généalogique à chaque génération. De plus, dans la famille de II-2, il n'y a aucune personne malade donc ils n'ont pas la mutation dans leur génome et pourtant 2 de ses enfants sont atteints de la maladie : si elle était récessive, ils auraient simplement été porteurs sains.

### **Question 6 : BE**

Dans le cadre de votre activité de diagnostic moléculaire, vous identifiez une variation exonique du gène le plus fréquemment muté dans la pathologie du patient. Vous classez cette variation comme « variation de signification incertaine » (classe 3). Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) exacte(s) ?

- A. Afin de conclure sur son éventuelle pathogénicité, la seule manière est de proposer une étude fonctionnelle
- B. Afin d'imaginer une étude fonctionnelle, il est important de bien connaître la fonction de la protéine codée par le gène en question
- C. La réalisation d'une étude fonctionnelle permet à chaque fois de reclasser la variation testée
- D. Vous pouvez proposer la réalisation d'une biopsie cutanée pour obtenir facilement des cellules souches induites pluripotentes
- E. Certains modèles animaux peuvent permettre d'étudier facilement ces variations de signification incertaine

**A FAUX** L'étude fonctionnelle n'est en aucun cas la seule manière de conclure sur la pathogénicité du variant. On peut se baser sur bien d'autres critères pour conclure sur la pathogénicité d'un variant notamment sur les données bibliographiques ou encore sur la clinique associée.

**B VRAI** En fonction de la morphologie cellulaire, de la localisation de la protéine, de sa fonction dans la cellule on va venir réfléchir à quel test effectuer pour étudier au mieux les modifications de fonction apportées

**C FAUX** Il existe toujours des exceptions et parfois les tests fonctionnels ne sont pas concluants.

**D FAUX** La réalisation d'une biopsie cutanée est l'une des étapes pour obtenir des cellules souches induites pluripotentes mais ne nous permet pas d'en prélever DIRECTEMENT. Afin d'obtenir des cellules souches induites pluripotentes, on commence par faire une biopsie cutanée pour prélever des cellules somatiques, on va ensuite les re programmer et contrôler leur qualité.

**E VRAI** En effet, il existe des modèles animaux comme la drosophile et le ver *Caenorhabditis elegans* qui sont pratiques pour l'étude des variants car leur génome est facilement manipulable et proche de l'homme. Ces études in vitro peuvent apporter des **éléments importants pour prouver le caractère délétère d'un variant de classe 3.**