

Denis Morency

De: no-reply@www.usherbrooke.ca
Envoyé: 17 avril 2015 11:10
À: Sciences-CentreImpression@USherbrooke.ca
Objet: COMMANDE EXAMENS
Pièces jointes: TSB400-H2015-final_v2cd.doc

TYPE-EXAMEN	FINAL
SIGLE-COURS	TSB400
TITRE-COURS	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
PROFESSEUR	Benoit Guillemette
DATE-HEURE	21 avril 2015, 9:00AM
AUTORISE-PAR	Claude Déry
NOMBRE-PAGES	14
NOMBRE-COPIE-PROF	29
IMPRESSION-QUESTIONNAIRE	Recto broché
NOMBRE-FEUILLES-BLANCHES	0
NOMBRE-PAPIER-GRAPHIQUE	0
NOMBRE-CAHIERS	0
POSSESSION-VEILLE	1
CONSETEMENT-AGES	1
REMARQUES	
E-MAIL	
FIRST-NAME	
LAST-NAME	
NICK-NAME	
SPAMSHIELD	true

NOM: _____

MATRICULE: _____

PRÉNOM: _____

SIGNATURE: _____

**TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
TSB400**

EXAMEN FINAL

DOCUMENTATION PERMISE : AUCUNE

Répondre sur le questionnaire

Respecter l'espace alloué

Nombre de pages à cet examen: 13

Date: mardi 21 avril 2015

Heure: 9h00 à 12h00

Local : D3-2039

Professeur : Benoit Guillemette

Total : 100 points (+2 points boni),
comptant pour 60% de la note finale

A. VRAI ou FAUX pour les questions 1 à 10: si la réponse est fausse, expliquez pourquoi. (Total de 20 points)

- 1) La réaction de Sanger permet le séquençage de 500 à 1000 molécules d'ADN simultanément. (2 points) _____

- 2) L'ARN interférence (« RNAi ») est un mécanisme qui permet de créer des mutations dans un gène. (2 points) _____

- 3) Une empreinte à la DNaseI permet de révéler la séquence d'ADN en contact direct avec une protéine. (2 points) _____

- 4) Dans une expérience de retardement sur gel, les ADN non-liés par des protéines migrent plus rapidement que celles faisant partie d'un complexe ADN-protéine. (2 points) _____

- 5) Le séquençage d'ARN permet une quantification plus précise des ARNm que l'utilisation de puces à ADN. (2 points) _____

- 6) L'immunoprécipitation de la chromatine, communément appelée « ChIP » permet de déterminer les interactions directes protéine-ADN *in vivo*. (2 points) _____

- 7) Afin d'obtenir une transfection stable d'ADN dans des cellules humaines en culture, il faut procéder à une sélection par résistance antibiotique. (2 points) _____

- 8) La température de fusion de l'ADN (T_m ; aussi appelée melting temperature en anglais) est la température à laquelle toutes les molécules d'ADN initialement double-brin sont dénaturées et

retrouvées sous forme simple-brin exclusivement. (2 points) _____

9) L'utilisation des lentivirus pour l'insertion d'ADN dans des cellules en culture présente un problème de sécurité parce que les virus qu'on utilise en laboratoire ont la capacité de se répliquer dans les cellules ciblées. (2 points) _____

10) Les trois activités enzymatiques retrouvées dans la méthode d'assemblage d'ADN de Gibson sont : endonucléase, polymérase 5' → 3', et ligase. (2 points) _____

B. Questions 11-22 à choix de réponses. (Total de 16 points)

11) La technologie Cas9 peut permettre : (2 point)

1. de créer des coupures d'ADN à un endroit spécifique du génome
2. de séquencer jusqu'à 100 million de fragments d'ADN simultanément
3. d'augmenter la fréquence de recombinaison homologue
4. d'assembler jusqu'à 25 fragments d'ADN à la fois
5. de cibler une protéine à un endroit précis du génome
6. de faire la mutagenèse dirigée dans le génome
7. de faire la transplantation d'un génome de Mycoplasme

Choisir parmi les suivants :

- a) 1,2,6 b) 3,4,6 c) 1,4,7 d) 2,4,5,6 e) 1,3,5,6 f) 7 seulement

12) Encerclez la lettre correspondant à l'énoncé qui est vrai. (1 point)

- a) La méthode de simple-hybride chez la levure permet de déterminer si deux protéines sont capables d'interagir ensemble.
- b) Le simple-hybride utilise habituellement une protéine de fusion contenant le domaine d'activation de la transcription de la protéine Gal4 et le domaine d'activation de la transcription de la protéine étudiée.
- c) Les essais d'interaction de protéines par « tandem affinity purification (TAP) » nécessitent la fabrication d'anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt.
- d) La méthode SELEX permet en quelques cycles de déterminer la séquence d'ADN reconnue avec la plus grande affinité par une protéine.

13) Encerclez la lettre correspondant à l'énoncé qui est vrai. (1 point)

- a) L'amplification d'ADN à l'aide de la polymérase du bactériophage Phi29 est une méthode d'amplification ne nécessitant aucun changement de température (isothermale) et permettant de produire des fragments d'une taille atteignant jusqu'à 100kpb.
- b) Les liens phosphorothioates aux extrémités d'une molécule d'ADN facilitent sa dégradation par des activités exonucléases.
- c) Une réaction de recombineering est aussi efficace dans une bactérie en phase de croissance

- exponentielle que dans une bactérie en phase de croissance stationnaire.
- d) La majorité des enzymes de restriction sont capables de reconnaître et de digérer leur séquence de reconnaissance si celle-ci est située directement à l'extrémité d'un fragment d'ADN.
 - e) Les énoncés a, b, c et d sont vrais.

14) Dans les technologies de séquençage ci-dessous, les quatre nucléotides (dA, dT, dC, dG) sont offerts simultanément à l'ADN polymérase, sauf dans une, laquelle ? (1 point)

- a) Sanger
- b) Ion Torrent
- c) Illumina
- d) Pacific Biosciences (PacBio)
- e) aucune de ces réponses

15) Quelles sont les caractéristiques des cellules souches embryonnaires (ES) ? (2 points)

1. Elles sont pluripotentes
2. Elles sont isolées à partir de blastocystes
3. Elles peuvent se différencier en cellules placentaires
4. Elles sont facilement transfectables
5. Leur croissance est illimitée
6. Elles peuvent être réimplantées dans un blastocyste en développement

Choisir parmi les suivants :

- a) 1,4 b) 3,6 c) 2,3,5 d) 1,2,4,6 e) 1,2,4,5,6 f) 1,2,3,4,5,6

16) Laquelle de ces molécules ne peut pas initier l'interférence par ARN. (1 point)

- a) un long ARN double brin.
- b) un petit ARN sens simple brin.
- c) un transgène d'ADN contenant une séquence en répétition inversée.
- d) un petit ARN double brin.

17) Quelle affirmation ne s'applique pas à la technologie de qPCR avec les sondes Taqman ? (1 point)

- a) Dépend de l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase Taq
- b) Constitué d'une amorce d'ADN spécifique à laquelle un fluorophore est lié à une extrémité et un extincteur à l'autre
- c) Permet de quantifier plusieurs amplicons simultanément dans une même réaction en utilisant différents fluorophores
- d) Requiert une courbe de dissociation pour valider le T_m de l'amplicon
- e) Toutes les affirmations s'appliquent

18) Lors d'une expérience de RT-qPCR, on obtient un Ct de 20 avec l'échantillon A, et un Ct de 22 avec l'échantillon B avec la même paire d'amorces. Que signifie le résultat ? (1 point)

- a) A possède deux fois moins d'ADN que B
- b) A possède deux fois plus d'ADN que B
- c) A possède quatre fois moins d'ADN que B
- d) A possède quatre fois plus d'ADN que B

19) Quel type de mutation peut-on introduire dans un fragment d'ADN codant pour un gène cloné dans un plasmide ? (2 point)

- 7. Substitution d'un nucléotide causant un changement de résidu
- 8. Délétion d'un nucléotide causant un changement de cadre de lecture
- 9. Insertion de 20 nucléotides permettant l'ajout d'un « tag » protéique
- 10. Délétion d'une portion codante de 500 paires de bases
- 11. Substitution d'un nucléotide causant une mutation silencieuse
- 12. Insertion d'une partie codante de 1000 bases pour créer une fusion protéique

Choisir parmi les suivants :

- a) 1,5 b) 2,4 c) 3,6 d) 1,2,5 e) 3,4,6 f) 1,2,3,4,5,6

20) Laquelle de ces affirmations ne s'applique pas au système Cre/Lox. (1 point)

- a) Il permet d'effacer un gène à un moment précis.
- b) Il est important pour effacer un gène dans un seul tissu.
- c) Il est un système de recombinaison.
- d) Il utilise le système du RNAi
- e) Il nécessite un marqueur de sélection

21) Parmi les technologies suivantes, lesquelles permettent de conclure qu'il y a une interaction directe protéine-protéine ? (2 points)

- 1. co-immunoprécipitation avec un anticorps à partir d'un extrait cellulaire
- 2. une expérience de FRET entre deux protéines dans des cellules en culture
- 3. un « pull-down » in vitro avec deux protéines purifiées
- 4. co-localisation par microscopie à fluorescence
- 5. expérience de double-hybride en levure
- 6. une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Choisir parmi les suivants :

- a) 2,3 b) 1,5 c) 1,3,6 d) 2,4,5 e) 1,3,4,6 f) 1,2,3,4,5

22) Quel est l'intérêt de la seconde étape de MS (spectrométrie de masse) dans la technique de LC-MS/MS suite à une digestion à la trypsine? (1 point)

- a) Identifier les protéines grâce à leurs fragments tryptiques
- b) Purifier les protéines afin de faire des essais d'interaction protéine-protéine
- c) Identifier la séquence d'ADN ayant co-immunoprécipité avec une protéine
- d) Identifier la séquence protéique d'un peptide fragmenté par collision
- e) Identifier la séquence N-terminale d'une protéine

C. Questions à réponses courtes (23-36).

(Total de 34 points)

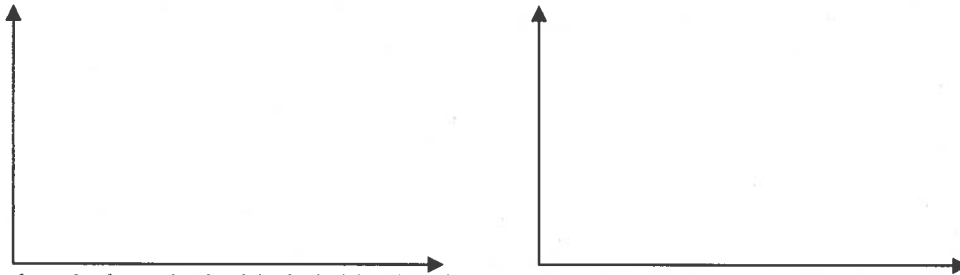
Répondez brièvement aux questions suivantes.

- 23) Nommez les trois types de stratégies (types d'amorces) permettant la production d'un ADN complémentaire par transcription inverse à partir d'ARN. **(3 points)**
- 24) Quelles informations à propos du transcrit d'un gène peuvent être obtenues lors d'une expérience de buvardage de type Northern? **(2 points)**
- 25) Qu'est-ce qui est mesuré par la technique de « Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) »? **(2 points)**
- 26) Qu'est-ce qu'une banque d'ADN? Expliquez et donnez un exemple concret où elles sont utilisées. **(3 points)**
- 27) Sachant que l'ordre des nucléotides dans un cycle de séquençage de type Ion Torrent est TACG, combien de cycles sont nécessaires pour séquencer une molécule de séquence 5'-ACGTTTCG-3'? **(2 points)**

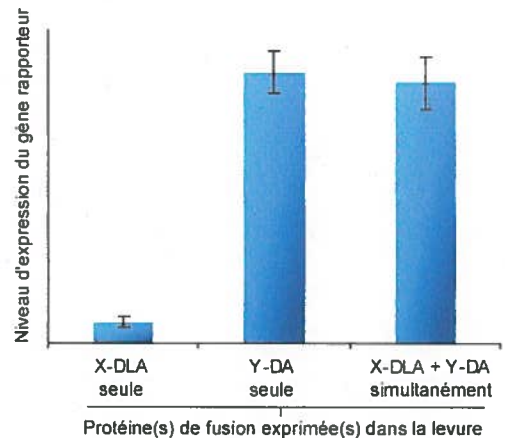
28) Pour quelle raison les ARN ribosomiaux sont généralement considérés comme problématiques lors d'expériences de séquençage du transcriptome? (2 points)

29) Pourquoi exprime-t-on les résultats de séquençage d'ARN (RNAseq) en FPKM (Fragments Per Kilobase per Million mapped reads)? (2 points)

30) Dessinez les courbes d'amplification et de dissociation obtenues à l'aide de la technologie SYBR green pour une réaction générant le produit souhaité et un dimère d'amorce non-souhaité. Identifiez bien les axes. (4 points)



31) D'après les résultats de double-hybride chez la levure présentés dans le graphique ci-bas, peut-on conclure que les protéines X et Y interagissent? Justifiez votre réponse en quelques mots. [DLA = domaine de liaison à l'ADN de l'activateur de levure Gal4; DA = domaine d'activation de l'activateur de transcription Gal4 de la levure] (2 points)



32) Compte tenu des caractéristiques des technologies de séquençage actuelles retrouvées dans le tableau 1 en annexe, quelle(s) technologie(s) de séquençage serait la plus appropriée pour les situations suivantes. Justifiez brièvement votre réponse.

- a) Le séquençage d'un produit de PCR de 1kpb cloné dans un plasmide **(1 point)**
- b) Le séquençage du transcriptome humain exprimé dans deux conditions **(1 point)**
- c) L'identification de mutations entre deux génomes humains **(1 point)**
- d) L'assemblage d'un génome bactérien de 3Mb comptant plusieurs copies des gènes codant pour des ARN ribosomiaux **(1 point)**
- 33) Expliquer brièvement les différences entre les systèmes d'expression inductible Tet-on et Tet-off. **(2 points)**
- 34) D'un point de vue de biologie moléculaire, quel est le principal avantage d'utiliser un adaptateur en « Y » tel que préconisé par la compagnie Illumina par rapport à l'utilisation d'adaptateurs parfaitement complémentaires comme ceux de la compagnie 454 ou Ion Torrent? **(2 points)**
- 35) Vous avez des cellules eucaryotes dont l'introduction d'ADN exogène est difficile avec la méthode des liposomes (efficacité d'environ 20%), quelles sont les alternatives à ce problème d'efficacité de

transfection ? (2 points)

36) Combien de domaines « TALEN » doivent être juxtaposés dans une protéine de fusion afin de permettre la reconnaissance d'une séquence de 21 nucléotides? (2 points)

D. Questions à développement.

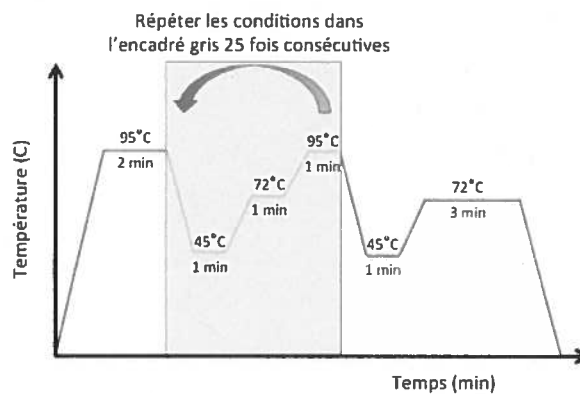
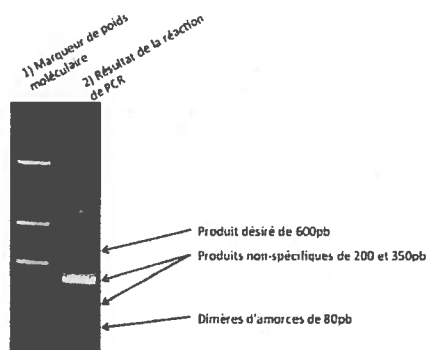
(Total de 30 points)

- 37) Vous voulez étudier un gène qui est essentiel pour la survie de vos cellules, proposez trois approches à privilégier pour étudier la fonction de ce gène. Expliquez pourquoi et détaillez votre approche expérimentale. **(6 points)**

38) Vous tentez d'amplifier le gène vgp à l'aide des amorces et conditions d'amplification suivantes :

Amorce #1 : 5'-ttcgggtatcaatgggtaccac-3' Tm =58°C

Amorce #2 : 5'- acagctgggtataatcttgacca -3' Tm =59°C



Le produit de la réaction est migré sur gel et le résultat de l'électrophorèse vous est présenté plus haut à gauche. Décrivez deux approches que vous pourriez tenter pour produire le fragment souhaité de façon majoritaire sans devoir synthétiser de nouvelles amorces et expliquez brièvement comment, d'un point de vue théorique, ces modifications pourraient permettre d'obtenir le fragment d'ADN escompté (6 points).

39) Décrivez les étapes requises pour effectuer le « knock-out » inductible et tissu spécifique d'un gène pour étudier sa fonction dans le foie de la souris. Présentez également un schéma de la construction d'ADN (cassette d'insertion) que vous allez utiliser pour effectuer ce knock-out.
(6 points)

40) Vous devez construire un plasmide permettant d'exprimer le gène abc contenant une mutation P92A (en remplaçant le codon CCG, encadré, amenant une proline par un codon GCG traduit en alanine) en fusion avec l'étiquette « His Tag » du plasmide pET15b. Notez que vous devez conserver les codons de départ « atg » et stop « tag » du gène abc et qu'aucun des sites de restriction présents dans le site de clonage multiple de pET15b ne se trouve dans le gène abc. Considérez que des séquences de 20 nucléotides s'appariant à la matrice d'ADN complémentaire sont suffisantes pour obtenir un Tm adéquat lors d'une amplification par PCR.

gène abc :

```

M K P V T L Y D V A E Y A G V S Y Q T V
atg aaa cca gta acg tta tac gat gtc gca gag tat gcc ggt gtc tct tat cag acc gtt

S R V V N Q A S H V S A K T R E K V E A
tcc cgc gtg gtg aac cag gcc agc cac gtt tct gcg aaa acg cgg gaa aaa gtg gaa gcg

A M A E L N Y I P N R V A Q Q L A G K Q
gcg atg gcg gag ctg aat tac att ccc aac cgc gtg gca caa caa ctg gcg ggc aaa cag

S L L I G V A T S S L A L H A P S Q I V
tcg ttg ctg att ggc gtt gcc acc tcc agt ctg gcc ctg cac gcg ccg tcg caa att gtc

W H K Y L T R N Q I Q P I A E R E G D W
tgg cat aaa tat ctc act cgc aat caa att cag ccg ata gcg gaa cgg gaa ggc gac tgg

A M L V A N D Q M A L G A M R A I T E S
gcg atg ctg gtt gcc aac gat cag atg gcg ctg ggc gca atg cgc gcc att acc gag tcc

V S L V K R K T T L A P N T Q T A S P R
gtc tca ctg gtg aaa aga aaa acc acc ctg gcg ccc aat acg caa acc gcc tct ccc cgc

A L A D S L M Q L A R Q V S R L E S G STOP
gcg ttg gcc gat tca tta atg cag ctg gca cga cag gtt tcc cga ctg gaa agc ggg tag
  
```

NcoI	C-CATGG
NdeI	CA-TATG
XhoI	C-TCGAG
BamHI	G-GATCC

Les séquences sont représentées de 5' vers 3' et les « - » montrent les sites de coupures.

vecteur pET15b:

```

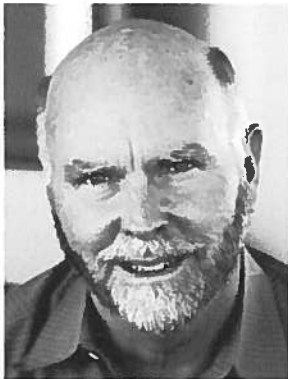
      Nco I           His-Tag           Nde I   Xho I   BamH I
TATACCA TGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCATA TGC TCAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGA
MetGlySerSerHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetLeuGluAspProAlaAlaAsnLysAlaArg
  
```

a) Quelles seraient votre stratégie et la séquence de vos amorces si vous n'aviez à votre disposition que le matériel pour effectuer des réactions de PCR, des enzymes de restrictions et de la ligase (pas de mélange enzymatique de Gibson) ? (6 points)

- b) Quelles serait votre stratégie et la séquence de vos amorces si vous deviez plutôt utiliser le mélange enzymatique de Gibson en digérant le plasmide avec le site BamHI ? Votre stratégie ne doit pas permettre de recréer le site BamHI après clonage et la longueur des régions d'homologie avec le plasmide doit être de 20 nucléotides exactement (6 points)

A. Question bonus

La personne ci-dessous a donné son nom à un institut de recherche aux États-Unis et a fait la manchette à plusieurs reprises pour ses accomplissements. Nommez cette personne et mentionnez un de ses nombreux accomplissements scientifiques. (2 points boni)



ANNEXE :

Tableau 1 : Résumé des principales caractéristiques des technologies de séquençage actuelles.

	Sanger dideoxy	Pyroséquençage 454	Pyroséquençage Ion Torrent	Illumina HiSeq	Pacific BioSciences
Nombre de séquences obtenues par réaction	1	1 million	50 millions moyenne de 200bp	200 millions	150 000
longueur des séquences obtenues	500-1000pb	500-1000pb		50 pb	500pb à 25kpb, moyenne de 3kpb
Séquence(s) simple ou en paire	Simple	Simple	Simple	Simple ou paire	simple
% erreur à l'intérieur des séquences	0,1%	1,7%	1,7%	0,2%	15-20%
Coût par réaction	3,50\$	7 000\$	1 000\$	1 500\$	600\$
Temps requis pour le séquençage	4 heures	10 heures	2 heures	1,5 à 11 jours	2 heures

Tableau 2 : Le code génétique standard

	T			C			A			G		
T	TTT	Phe	F	TCT	Ser	S	TAT	Tyr	Y	TGT	Cys	C
	TTC			TCC			TAC			TGC		
	TTA	Leu	L	TCA			TAA	STOP		TGA	STOP	
	TTG			TCG			TAG			TGG	Trp	W
C	CTT	Leu	L	CCT	Pro	P	CAT	His	H	CGT	Arg	R
	CTC			CCC			CAC			CGC		
	CTA			CCA			CAA	Gln	Q	CGA		
	CTG			CCG			CAG			CGG		
A	ATT	Ile	I	ACT	Thr	T	AAT	Asn	N	AGT	Ser	S
	ATC			ACC			AAC			AGC		
	ATA			ACA			AAA	Lys	K	AGA	Arg	R
	ATG	Met	M	ACG			AAG			AGG		
G	GTT	Val	V	GCT	Ala	A	GAT	Asp	D	GGT	Gly	G
	GTC			GCC			GAC			GGC		
	GTA			GCA			GAA	Glu	E	GGA		
	GTG			GCG			GAG			GGG		