

## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

Fiche sujet - candidat (1/3)

### Contexte

Un couple attend un enfant. Une anomalie est détectée lors d'une échographie à 7 mois de grossesse. Le gynécologue suspecte un cas de nanisme, dont il existe différentes formes telles que l'achondroplasie autosomique dominante (forme la plus fréquente du nanisme, liée à la mutation G380R du gène FGFR3), mais aussi des formes autosomiques récessives comme la chondrodysplasie (forme létale du nanisme, liée à la mutation R248C du gène FGFR3). Le couple consulte alors un médecin spécialisé en conseil génétique pour établir une étude généalogique de la famille. Une amniocentèse est également réalisée chez la femme pour extraire l'ADN du fœtus afin de le comparer à celui des parents.

**On cherche à déterminer si le fœtus est affecté par une achondroplasie dominante (hypothèse 1) ou par une chondrodysplasie létale récessive (hypothèse 2).**

### Consignes

**Partie A : Appropriation du contexte et activité pratique (durée recommandée : 30 minutes)**

**La stratégie adoptée consiste à : étudier** la généalogie de la famille, et **réaliser** une étude RFLP (polymorphisme de longueur de fragments de restriction) de la famille.

**Appeler l'examineur pour vérifier les résultats de la mise en œuvre du protocole.**

**Partie B : Présentation et interprétation des résultats, poursuite de la stratégie et conclusion (durée recommandée : 30 minutes)**

**Présenter et traiter les résultats obtenus**, sous la forme de votre choix et les **interpréter**.

**Répondre sur la fiche-réponse candidat, appeler l'examineur pour vérifier votre production et obtenir une ressource complémentaire.**

**Discutez** de la validité des deux hypothèses, en faisant preuve d'un esprit critique. **Proposez** une stratégie pour conforter l'identification des allèles du gène FGFR3 présents chez le fœtus.

**Appeler l'examineur pour présenter votre proposition à l'oral et obtenir une ressource complémentaire.**

**Conclure**, à partir de l'ensemble des données, sur la validité des 2 hypothèses, afin de déterminer la forme de nanisme qui affecte le fœtus.

## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

Fiche sujet - candidat (2/3)

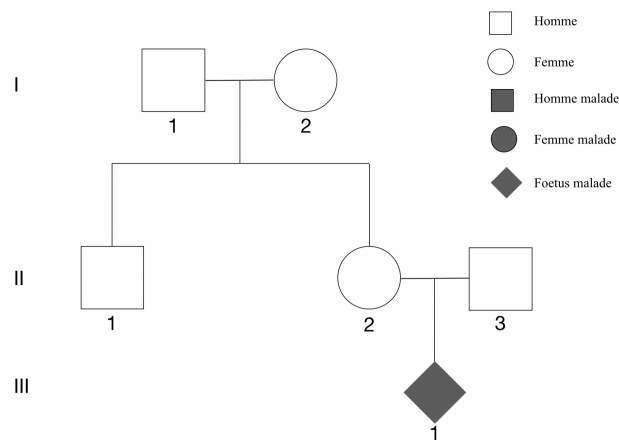
Protocole	
<p><b>Matériel :</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Application <b>Genix</b> et sa fiche technique</li><li>- Séquences de références du gène FGFR3 : FGFR3_sauvage , FGFR3_G380R , et FGFR3_R248C</li><li>- Eppendorf virtuel E_____ contenant l'ADN de la mère (II.2)</li><li>- Eppendorf virtuel E_____ contenant l'ADN du père (II.3)</li><li>- Eppendorf virtuel E_____ contenant l'ADN du fœtus (III.1)</li></ul>	<p><b>Étapes du protocole à réaliser :</b></p> <p><b>Utilisez l'application <u>Genix</u> , pour :</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Comparer</b> les séquences des 2 allèles mutés du gène FGFR3 avec l'allèle sauvage.</li><li>- <b>Rechercher</b> des <b>sites de restriction</b> dans les 3 allèles pour les enzymes de restriction PstI et SfcI.</li><li>- <b>Construire</b> une <b>sonde</b> d'ADN reverse complément d'une région cible judicieusement choisie dans le gène FGFR3 pour le Southern blot. <i>Votre sonde doit faire entre 20 pb et 50 pb.</i></li><li>- <b>Réaliser</b> une <b>électrophorèse</b> de l'ADN du père, de la mère et du fœtus, en utilisant l'enzyme de restriction adaptée à la mise en évidence éventuelle d'un polymorphisme de longueur de fragments de restriction.</li><li>- <b>Ajouter</b> votre sonde pour <b>réaliser</b> un <b>Southern blot</b> des allèles du gène FGFR3.</li></ul>

## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

Fiche sujet - candidat (3/3)

### Ressources

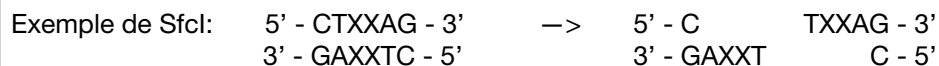
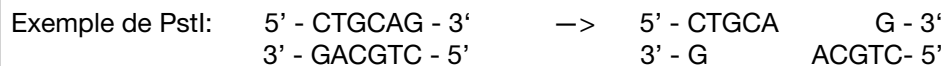
#### Arbre généalogique de la famille :



#### Les enzymes de restriction :

Les endonucléases, ou enzymes de restriction, sont des enzymes qui reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN et les coupent. Naturellement présentes chez les bactéries, elles jouent un rôle essentiel dans leur protection contre les bactériophages.

Les endonucléases de type IIA reconnaissent des séquences généralement palindromiques et coupent dans le site reconnu. Elles produisent alors soit des extrémités franches (blunt ends), soit des extrémités cohésives (sticky ends).



(Le X signifie n'importe quel nucléotide)

**Principe de la méthode RFLP :** Le RFLP ou polymorphisme de longueur de fragments de restriction est une technique de biologie moléculaire utilisée pour analyser les variations dans des séquences choisies d'ADN entre individus. Cela permet notamment d'établir le génotype haploïde ou diploïde d'un gène associé à une maladie donnée chez différents individus.

L'ADN génomique des différents individus est **digéré** par une ou plusieurs **enzymes de restriction**, puis les fragments de restriction de chaque individu sont **séparés** en fonction de leur taille par **électrophorèse**. On réalise ensuite un **Southern blot** en transférant les fragments de restriction sur une membrane de nitrocellulose, puis en les dénaturant avant de les **hybrider** avec une **sonde** d'ADN (simple brin) marquée spécifique d'une séquence **cible** caractéristique d'un allèle ou d'un gène donné.

La **sonde**, doit être le **reverse complément** de la séquence **cible**. Exemple :

Cible 5'→3' : ATTCGTC  
 Complément 3'→5' : TAAGCAG  
 Sonde 5'→3' : GACGAAT

## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

### Ressource complémentaire 1

#### **Mutations héritées et mutations « *de novo* » :**

On dit souvent que “les mutations sont aléatoires”, mais ce n’est vrai que du point de vue de l’effet biologique (elles ne “choisissent” pas d’être avantageuses ou désavantageuses ou neutres).

Sur le plan moléculaire, en raison de particularités chimiques ou structurales, certaines positions du génome sont beaucoup plus instables que d’autres. On parle de hotspots de mutation.

Dans le cas de certaines maladies génétiques telles que la drépanocytose, la mutation à l’origine de la maladie serait apparue un très petit nombre de fois au cours de l’évolution (5 fois) de manière indépendante dans différentes populations. Tous les drépanocytaires actuels et passés sont apparentés à l’une de ces 5 lignées.

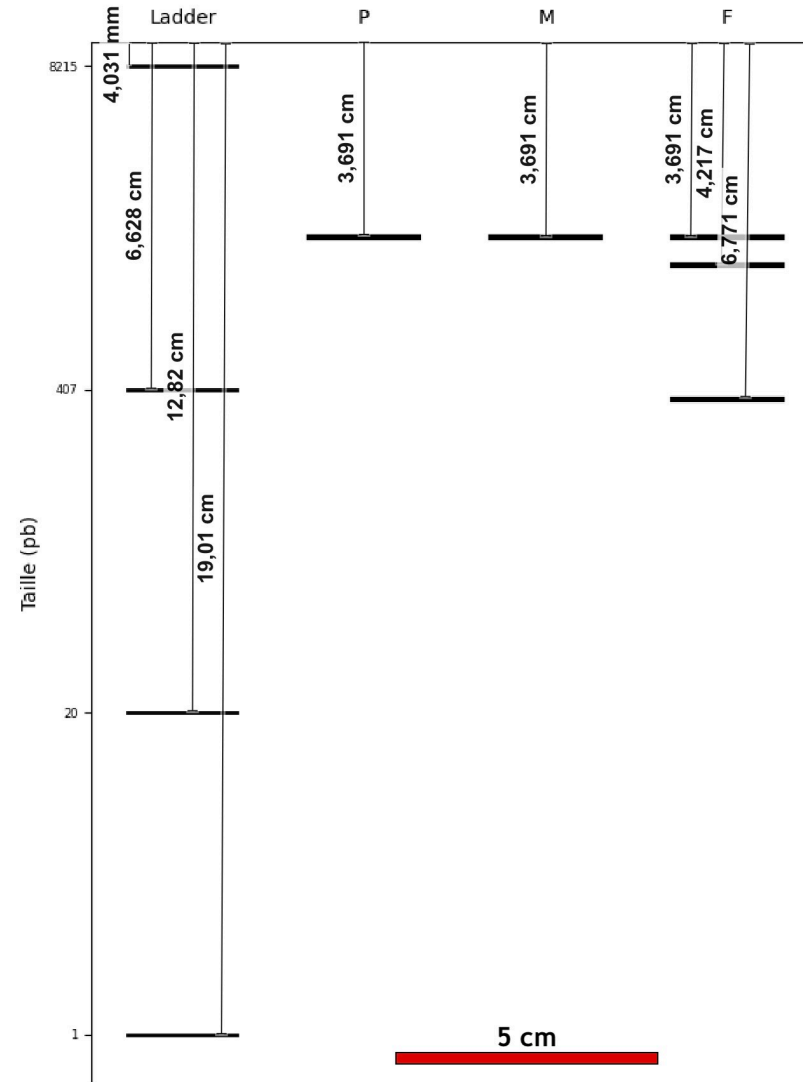
La mutation à l’origine de la drépanocytose ne se trouve pas dans un hotspot. Le fait que l’on constate aujourd’hui la similarité de ces 5 mutations indépendantes s’explique par la sélection naturelle qui a favorisé les hétérozygotes dans les régions impaludées. D’autres mutations identiques entre elles et situées à d’autres positions de la séquence ont dû se produire de manière indépendante sans que la sélection ne les conserve pour que l’on puisse les constater.

Pour d’autres maladies génétiques, un certain pourcentage d’individus malades possèdent une même mutation dite « *de novo* ». Il s’agit de mutations qui affectent l’un des gamètes, ou directement le zygote à l’origine de l’individu malade.

La similarité de ces mutations chez des malades non apparentés s’explique par leur position dans un hotspot de mutation, ce qui les rend plus fréquentes.

# Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

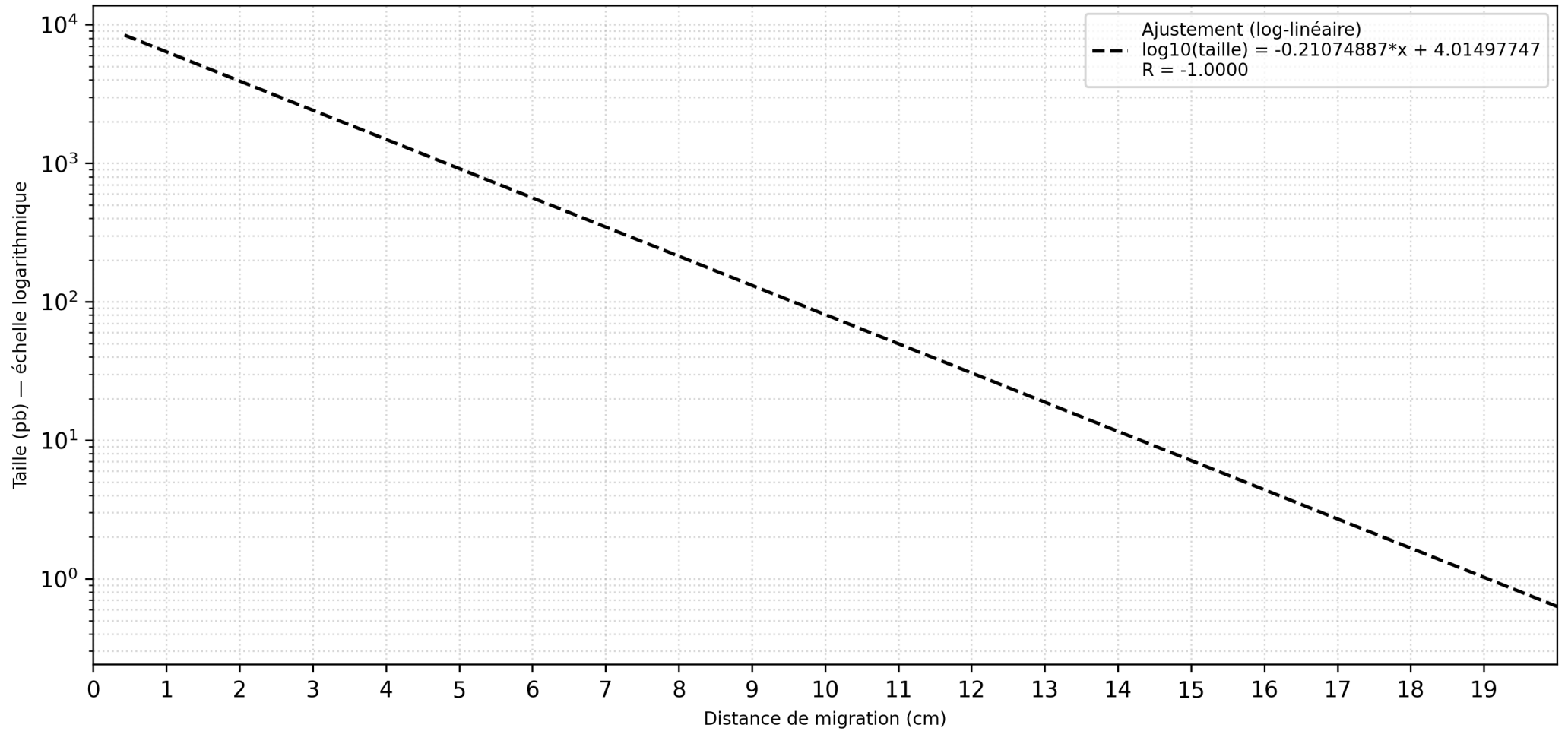
## Ressource complémentaire 2 (Recto)



# Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

## Ressource complémentaire 2 (Verso)

Courbe de référence semi-log (modèle log-linéaire)



## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

*Fiche laboratoire et évaluateur*

Matériel indiqué sur la fiche candidat	Précisions pour le laboratoire	Remarques à l'évaluateur et aides majeures envisageables	Ressources et/ou informations à donner au candidat au cours de l'épreuve
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Application web <u>Genix</u> et sa fiche technique</li>   <li>- Fichier FGFR3.fasta installé sur le bureau, contenant les séquences de références FGFR3_sauvage, FGFR3_G380R, FGFR3_R248C</li>   <li>- Document (à préparer) indiquant les références et les contenus des 3 Eppendorfs virtuels</li> </ul>	<p>Un zip déjà préparé, contenant les séquences de références et les Eppendorfs des génomes du père, de la mère et du fœtus, est disponible ici : <a href="#">ECE_nanimse.zip</a>. Les fichiers contenus dans le zip doivent être importés dans Genix.</p> <p>Si vous souhaitez préparer vos Eppendorfs vous même, suivez la méthode ci dessous.</p> <p>Pour préparer vos Eppendorfs virtuels:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recherchez</b> la séquence du plasmide NC_003065.3 (utilisée ici pour simuler un génome de grande taille). Et <b>ajoutez</b> la à votre classeur.</li> <li>• <b>Importer</b> les séquences des 3 allèles de FGFR3 depuis votre fichier fasta.</li> <li>• Dans votre classeur, <b>sélectionnez</b> FGFR3_sauvage et NC_003065.3</li> <li>• Faire <b>Ctrl + E</b>, et relever l'ID de l'Eppendorf du père homozygote (sauvage // sauvage)</li> <li>• Re faire <b>Ctrl + E</b>, et relever l'ID de l'Eppendorf de la mère homzygote (sauvage // sauvage)</li> <li>• <b>Sélectionnez</b> en plus FGFR3_G380R, et faire <b>Ctrl + E</b>. Relevez L'ID de l'Eppendorf du fœtus hétérozygote (sauvage // G380R).</li> <li>• Les Eppendorfs peuvent être sauvegardés en faisant ctrl + F, afin de les ré importer plus tard.</li> </ul> <p style="color: red; font-size: small;"><i>Attention, la base de données contenant les séquences temporaires et les Eppendorfs virtuels, est vidée tous les jours à 18h (heure française). Il faut donc préparer vos Eppendorfs la veille de l'épreuve (après 18h), ou le jour même de l'épreuve.</i></p> <p>Vidéo constitution Eppendorfs, Vidéo manipulation génix</p>	<p><b>Aides majeures:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faire la comparaison de séquences et / ou la recherche des sites de restriction à la place du candidat.</li> <li>• Construire la sonde à la place du candidat.</li> <li>• Faire l'électrophorèse et / ou le Southern blot à la place du candidat.</li> </ul> <p><b>Documents de secours</b> (à construire avec le matériel de l'établissement):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tableau présentant la localisation des sites de restriction pour les différents allèles.</li> <li>• Image de l'électrophorèse et du Southern blot.</li> </ul> <p><b>Remarques:</b></p> <p>L'étape spécifique porte sur la communciation orale de la comapraison des résultats contradictoires des 2 approches (généalogie / Southern blot). On attend du candidat qu'il fasse preuve d'un esprit critique (taille réduite de la famille) et qu'il élabore des hypothèses / généralisation / ou poursuite de démarche.</p>	<p><b>À l'issue de la présentation des résultats et de l'interprétation.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Donner la ressource complémentaire 1.</li> </ul> <p><b>À l'issue de la présentation orale de la démarche de l'étape spécifique.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Donner la ressource complémentaire 2.</li> </ul>

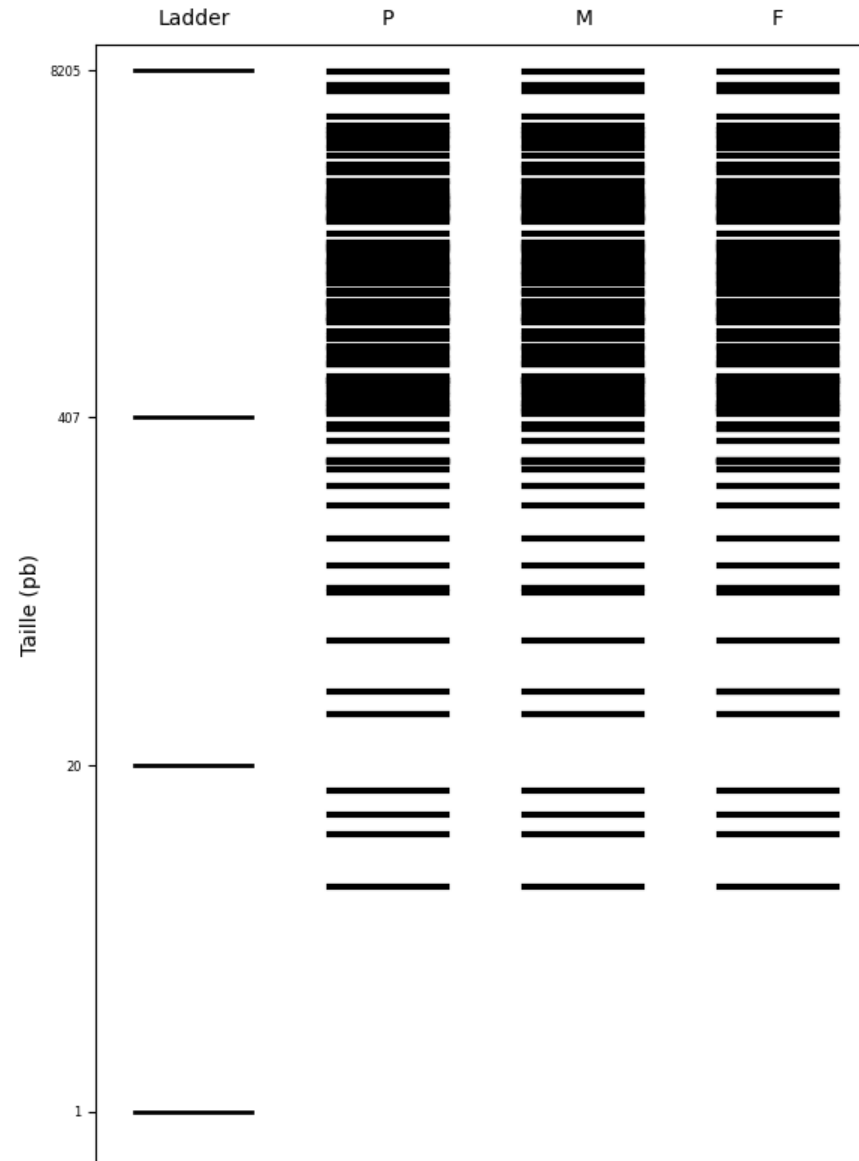
## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

**Document de secours n°1** : Comparaison des séquences des 3 allèles du gène FGFR3, et positions des sites de restriction PstI et SfcI

	Allèle Sauvage	Allèle G380R	Allèle R248C
Taille (pb)	2421	2421	2421
Mutations	Référence	G → A en 1138	C → T en 742
Positions des sites PstI	285, 768	285, 768	285, 768
Postions des sites SfcI	281, 319, 764	281, 319, 764, 1135	281, 319, 764

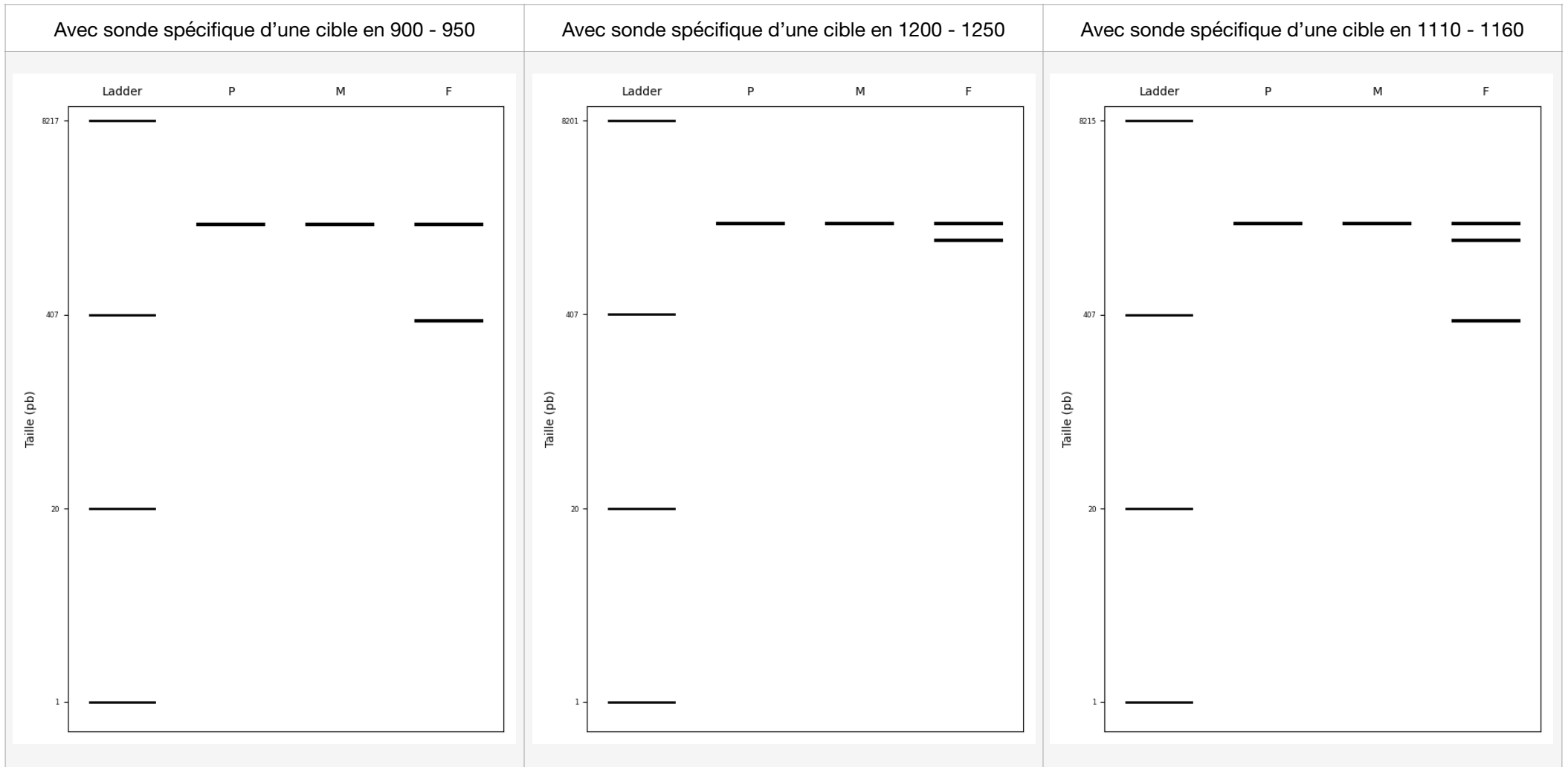
## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

**Document de secours n°2** : Electrophorèse des génomes du père (P), de la mère (M) et du fœtus (F) digérés par SfcI



## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

**Document de secours n°3** : Southern blot des allèles FGFR3 chez le père (P), la mère (M) et le fœtus (F) après digestion par SfcI



## Conseil génétique et diagnostique prénatal d'une forme de nanisme

Pour cette première étape, le candidat doit disposer des 3 fiches sujet - candidat, et de l'ensemble du matériel.

Mettre en œuvre un protocole pour résoudre une situation problème				
<p><b>On attend du candidat qu'il mette en œuvre le protocole. Le respect du protocole, la qualité du geste technique, et le respect des consignes de sécurité doivent permettre d'obtenir des résultats exploitables</b></p> <p><b>Aides mineures :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tous conseils pratiques apportés au candidat durant l'épreuve, mais ne se substituant pas au candidat.</li> <li>- Le rangement du poste de travail est comptabilisé comme une aide mineure.</li> <li>- Orienter le candidat dans le choix d'une cible pertinente pour la constitution de la sonde</li> </ul> <p><b>Aides majeures :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'examineur doit montrer au candidat comment réaliser le geste technique, ou réaliser le geste technique à la place du candidat.</li> <li>- L'examineur intervient pour imposer au candidat des règles de sécurité.</li> <li>- L'examineur fournit le document de secours parce que le candidat a été dans l'incapacité d'obtenir un résultat exploitable.</li> <li>- Faire la comparaison de séquences et / ou la recherche des sites de restriction à la place du candidat.</li> <li>- Construire la sonde à la place du candidat.</li> <li>- Faire l'électrophorèse et / ou le Southern blot à la place du candidat.</li> </ul> <p><i>Il est rappelé que dans le cas où le candidat n'arrive pas à obtenir un résultat exploitable, mais si cet échec ne lui est pas imputable, un document de secours lui est alors donné sans que cela soit considéré comme une aide majeure ou mineure.</i></p>	<p><b>Niveau A</b> = seul ou avec <b>une aide mineure</b>, il obtient des <b>résultats exploitables</b>. (9 pts)</p>			
	<p><b>Niveau B</b> = avec <b>plus d'une aide mineure</b>, il obtient des <b>résultats exploitables</b>. (6 pts)</p>			
	<p><b>Niveau C</b> = avec <b>une aide majeure</b>, il obtient des <b>résultats exploitables</b>. (3 pts)</p>			
	<p><b>Niveau D</b> = <b>malgré toutes les aides</b> apportées il n'obtient <b>pas de résultats exploitables</b>. <i>Un document de secours</i> est indispensable. (0 pt)</p>			

Communication et interprétation des résultats				
<p><b>On attend du candidat qu'il présente une production :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Techniquement correcte (soignée, lisible, appropriée).</li> <li>- Bien renseignée (informations complètes et exactes).</li> <li>- Pertinente elle met clairement en évidence comment l'information (ou les informations apportée(s) par l'activité pratique permet [permettent] d'apporter un ou des élément(s) de réponse au problème initialement posé</li> </ul> <p>La communication prépare:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- À la comparaison des séquences (mutations identifiées et localisées)</li> <li>- À la comparaison des positions des sites de restriction PstI et SfcI</li> <li>- À la comparaison des profils RFLP du père, de la mère et du fœtus</li> </ul> <p>Les profils RFLP des 2 parents, obtenus après digestion par SfcI, affichent une seule bande, donc un seul fragment de restriction reconnu par la sonde. Sachant que la maladie est autosomique et observant qu'ils sont sains, on en déduit qu'ils sont tous les deux homozygotes (Sauvage // Sauvage)</p> <p>Le profil RFLP du fœtus, obtenu après digestion par SfcI, montre une bande de même taille que celle des parents, il possède donc un allèle sauvage. Mais son profil montre aussi une (ou 2) bandes (fragments de restriction) supplémentaires. Le fœtus possède donc une mutation du gène FGFR3 qui fait apparaître un site SfcI supplémentaire. Il pourrait s'agir de la mutation G -&gt; A en 1138 qui fait elle aussi apparaître un site SfcI dans l'allèle G380R. Cela conforte l'hypothèse d'un achondroplasie. Le fœtus serait donc hétérozygote (Sauvage // G380R),</p> <p>L'étude généalogique montre que le fœtus malade a 2 parents sains, ce qui suggère un mode récessif, et donc une chondrodysplasie létale</p>	<p><b>Niveau A</b> = trois critères (5 pts)</p>			
	<p><b>Niveau B</b> = deux des trois critères (3 pts)</p>			
	<p><b>Niveau C</b> = un seul des trois critères (1 pt)</p>			
	<p><b>Niveau D</b> = rien à valoriser (0 pt)</p>			

A l'issue de cette étape de communication, vérifiez l'exactitude des résultats présentés puis distribuer la ressource complémentaire 1.

**Le candidat doit présenter sa réponse oralement pour l'étape spécifique**

Étape spécifique: Reproductibilité des résultats / Généralisation du phénomène.				
<p>Le candidat met en opposition les interprétations contradictoires des 2 approches.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'étude généalogique montre que le fœtus malade a 2 parents sains, ce qui suggère un mode récessif, et donc une chondrodysplasie létale</li> <li>- L'étude RFLP montre que le fœtus malade serait hétérozygote (Sauvage // G380R), et donc atteint d'une achondroplasie dominante. Mais ses 2 parents sont sains et homozygotes (Sauvage // Sauvage) !</li> </ul> <p>Le candidat fait preuve d'un esprit critique à l'égard de l'étude généalogique, du fait de la très petite taille de la famille étudiée, ce qui ne permet pas d'avoir des résultats statistiquement fiables.</p> <p>Le candidat formule l'hypothèse selon laquelle la position 1138 de FGFR3 pourrait être un hotspot de mutation. Une mutation G-&gt;A en 1138 dite « de novo » aurait pu se produire chez l'un des gamètes à l'origine du fœtus ou chez le zygote. Le fœtus pourrait donc être (Sauvage // G380R) , et donc atteint d'achondroplasie (dominante) tout en ayant des parents sains (Sauvage // Sauvage)</p> <p>Le candidat propose une poursuite de démarche:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Je détermine de manière plus précise la longueur (en pb) du ou des 2 fragments de restriction supplémentaires observés dans le profil RFLP du fœtus</li> <li>- J'importe la photo du Southern blot dans mesurim afin de mesurer la distance parcourue par les marqueurs du ladder et la distance parcourue par le (ou les 2) fragment(s) supplémentaire(s) du fœtus. J'utilise Excel pour tracer la droite de référence semi-logarithmique: <math>\log_{10}(\text{taille}) = f(\text{distance})</math>. Je reporte la distance parcourue par le (ou les 2) fragment(s) supplémentaire(s) sur la droite pour connaître leur taille en pb.</li> <li>- Si taille = 371 et / ou 1286 pb alors mutation G380R, et donc achondroplasie. Si taille significativement différente de 371 et / ou 1286 alors mutation différente de G380R et différente de R248C.</li> </ul> <p><i>Une aide mineure se comprend comme des pistes données par l'examineur pour faire évoluer la réponse du candidat vers plus de précision et de rigueur ou pour la rendre plus explicite. Le candidat intègre le conseil donné et le prend en compte en complétant par exemple sa réponse.</i></p> <p><b>Aides mineures :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- demande de précisions sur la réponse proposée ;</li> <li>- demande d'argumentation ou d'explicitation.</li> </ul> <p><i>Une aide majeure se comprend comme un deuxième temps d'aide (les aides mineures ayant échoué) où l'examineur est obligé d'identifier l'insuffisance ou l'incohérence de la réponse voire de la réorienter ou de la donner.</i></p> <p><b>Aides majeures :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- questions qui réorientent la réponse ;</li> <li>- questions qui permettent de souligner une insuffisance ou une incohérence de la proposition du candidat ;</li> <li>- explicitation par l'examineur de l'élément qui manque dans la proposition du candidat pour qu'elle soit pertinente.</li> </ul>	<p><b>Niveau A =</b> Seul ou avec <b>une aide mineure</b>, le candidat formule une proposition pertinente. (3 pts)</p>			
	<p><b>Niveau B =</b> Avec <b>plus d'une aide mineure</b>, le candidat formule une proposition pertinente. (2 pts)</p>			
	<p><b>Niveau C =</b> Avec <b>une aide majeure</b>, le candidat formule une proposition pertinente. (1 pt)</p>			
	<p><b>Niveau D =</b> Malgré toutes les aides apportées, le candidat est incapable de formuler une proposition pertinente. <b>L'examineur apporte la réponse.</b> (0 pt)</p>			

**A l'issue de cette étape spécifique, distribuez la ressource complémentaire 2.**

Conclusion finale				
<p><b>On attend du candidat qu'il présente une conclusion :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Complète, c'est-à-dire qui utilise toutes les informations issues de l'activité réalisée, des ressources et de l'étape spécifique.</li> <li>- Organisée, c'est-à-dire qui relie logiquement l'ensemble de ces informations et le problème posé.</li> <li>- Distanciée, c'est-à-dire qui interroge la démarche suivie ainsi que la qualité et la validité des données recueillies</li> </ul> <p><b>Informations apportées par la ressource complémentaire:</b>                      Le ou les fragments supplémentaires observés sur le profil RFLP du fœtus font respectivement environ 371pb et 1286 pb. Ils sont dus à la présence d'un site de restriction SfcI en position approximative de 1135 dans la séquence de FGFR3. Ce site est caractéristique de la mutation G -&gt; A en 1138 de l'allèle G380R. Le fœtus est donc hétérozygote (Sauvage // G380R) du fait d'une mutation « de novo ». Cela confirme l'hypothèse d'une achondroplasie.</p>	<p><b>Niveau A =</b> trois critères (3 pts)</p>			
	<p><b>Niveau B =</b> deux des trois critères (2 pts)</p>			
	<p><b>Niveau C =</b> un seul des trois critères (1 pt)</p>			
	<p><b>Niveau D =</b> rien à valoriser (0 pt)</p>			