Introduction à la bioinformatique (UE SSV3U15)
TP3. Du gène au génome
Diaporama d'accompagnement du TP

Jacques van Helden (Aix-Marseille Université)
ORCID 0000-0002-8799-8584

Objectifs et notions

Objectifs

- Utiliser des ressources bioinformatiques pour explorer les génomes d'organismes modèles, afin de comprendre la structuration et la composition de ces génomes.

Notions mises en pratique

- Structuration des gènes : transcrits, introns, exons, régions codantes, régions non traduites
- Organisation des génomes : régions géniques et intergéniques, régions répétitives, opérons bactériens
- Génomique comparative : conservation / divergence des séquences entre espèces
- Transcriptomique : expression différentielle des gènes dans différents tissus
- Annotation des séquences génomiques
- Détections des cadres ouverts de lecture
- Assignation de fonction par similarité de séquences

N'oubliez pas que vous pouvez à tout moment consulter le **glossaire du cours** pour obtenir une définition sommaire des principaux termes utilisés.

Déroulé du TP

Etapes

- Cas d'étude 1. Contexte génomique et transcriptomique du gène humain PAX6
  - Annotations génomiques
  - Génomique comparative : régions conservées et divergentes chez les vertébrés
  - Profil tissulaire d'expression
- Cas d'étude 2. Annotation d'un fragment de séquence bactérienne
  - Recherche de cadres ouverts de lecture
  - Assignation de fonction par similarité
  - Consultation de la base de données RegulonDB

Complétion

- Tous les exercices doivent être réalisés par chaque étudiant.
- Les QCM de TP ne sont pas notés.

Eléments de contexte

Exemples traités

Analyse génomique du gène PAX6

Le gène PAX6 code pour un facteur transcriptionnel (en violet sur l'image du haut), qui se lie à des sites spécifiques sur l'ADN génomique (vert et rose), et contrôle l'expression de gènes impliquées dans la formation de l'oeil. Les gènes cibles de PAX6 sont encore pour la plupart inconnus.

Phénotypes mutants chez la drosophile

- **Perte de fonction :** l'inactivation de eyeless (= PAX6) provoque une malformation ou une absence d'oeil.
- **Gain de fonction :** si on force le gène eyeless à s'exprimer dans les tissus larvaires précurseurs des antennes ou dans les ailes, les mouches développent à ces endroits des yeux à facettes (photo du bas).

Ces phénotypes indiquent que PAX6 est le déterminant-clé de la formation de l'oeil au cours du développement de l'organisme.

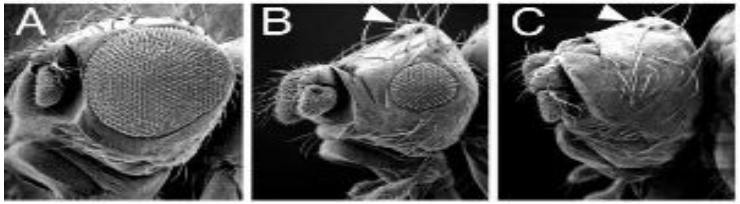
Conservation du gène PAX6

- Le gène PAX6 est fortement conservé chez tous les animaux, des invertébrés aux vertébrés.
- Ceci est compréhensible étant donné son rôle crucial pour le développement de l'organe de la vision, qui est essentiel à la survie des métazoaires.

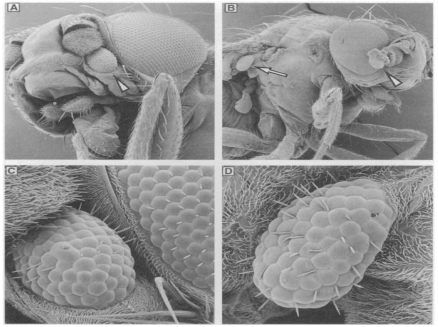
Liaison PAX6 - ADN

http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=6PAX

Phénotype de perte de fonction



Phénotype de gain de fonction



Halder et al. Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development. Development (1998) vol. 125 (12) pp. 2181-91.
Halder, Callaerts and Gehring (1995). Science, 267, 1788–1792.

Annotations du génome humain

Le tableau indique le nombre d'annotations pour différents types d'éléments du génome humain (gènes codants, non-codants de différents types, transcrits) dans différentes bases de données de référence.

Les nombres précis d'annotations varient d'une base de données à une autre, mais les ordres de grandeur sont indicatifs.

Constats :

- Au début du projet de séquençage du génome humain, on s'attendait à trouver ~100 000 gènes codants. Une vingtaine d'années plus tard, on en répertorie ~20 000
- Le séquençage de l'ARN révèle un nombre à peu près équivalent de "gènes" non-codants (plus précisément, régions transcrites dont on ignore généralement la fonction).
- Au total, on dénombre ~200 000 transcrits, qui incluent les transcrits alternatifs (variants d'épissage) pour ces gènes codants et non-codants.

Feature type	Gencode	Ensembl	RefSeq	CHESS
Protein-coding genes	19 901	20 376	20 345	21 306
lncRNA genes	15 779	14 720	17 712	18 484
Antisense RNA	5 501		28	2 694
Miscellaneous RNA	2 213	2 222	13 899	4 347
Pseudogenes	14 723	1 740	15 952	
Total transcripts	203 835	203 903	154 484	323 827

Salzberg, S. L. Open questions: How many genes do we have? BMC Biol 16, 94 (2018). https://doi.org/10.1186/s12915-018-0564-x

Annotation d'un fragment de séquence génomique bactérienne

- L'annotation des génomes bactériens est relativement plus simple que celle des génomes d'eucaryotes (et en particulier des multicellulaires), car chez les procaryotes il n'y a pas d'épissage. On peut donc détecter une bonne partie des gènes codants par **recherche de cadres ouverts de lecture** (Open Reading Frames, **ORF**).
- On peut ensuite déduire la séquence des protéines potentiellement produites par ces ORF, en effectuant une **traduction informatique** (au sens moléculaire) sur base du **code génétique** (correspondance codons - acides aminés).
- Après avoir localisé les gènes, on tente de leur assigner une fonction. La première approche utilisée est l'**assignation de fonction par similarité de séquence** : on compare les séquences protéiques d'intérêt (celles potentiellement produites par les ORFs) avec une base de données de séquences protéiques de fonction connue. On retient ensuite les alignements significatifs (en veillant à appliquer un seuil de significativité assez sévère) et on considère en première approximation que la séquence protéique d'intérêt assure vraisemblablement la même fonction que l'homologue trouvé dans la base de donnée.
- Un autre élément qui intervient dans l'annotation des génomes bactérien est l'organisation des gènes : les gènes bactériens sont regroupés en **opérons**, qui consistent en une succession de gènes localisés sur le même brin, généralement peu espacés, et qui sont transcrits sur une molécule d'ARN unique (unité transcriptionnelle poly-cisdtronique).

Codons start pour la détection d'ORF

Chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, la traduction peut occasionnellement démarrer sur un autre codon que le "canonique" ATG.

A titre d'exemple, la table ci-contre indique le nombre et le pourcentage de gènes d'*Escherichia coli* qui commencent par différents codons start (souche de référence *Escherichia_coli_str._K-12_substr._MG1655_GCF_000005845.2_ASM584v2*).

ATG ne représente que 85% des codons. Les deux codons alternatifs les plus fréquents sont **GTG** (7.6%) et **TTG** (1.8%). Les autres codons sont marginaux (<1%).

L'existence de ces codons alternatifs peut être prise en compte lors de la recherche de cadres ouverts de lecture.

Codon	Occurrences	Frequency
ATG	3955	85.26%
GTG	354	7.63%
TTG	85	1.83%
GGG	19	0.41%
GCG	17	0.37%
GGT	15	0.32%
ATT	12	0.26%
GTC	10	0.22%
GCC	9	0.19%
GAT	8	0.17%
TGC	8	0.17%
AAA	8	0.17%
GCT	7	0.15%
GGC	7	0.15%
GCA	7	0.15%
GTT	7	0.15%
TCC	6	0.13%
TTT	6	0.13%
GGA	6	0.13%
AGG	5	0.11%
ACA	5	0.11%

Statistiques d'alignement

Scores d'alignement

Un algorithme d'alignement de séquences arrivera toujours à aligner un certain nombre de résidus identiques en insérant les gaps aux endroits propices. Ceci est particulièrement vrai pour les alignements de séquences nucléiques, qui comportent seulement 4 résidus. A priori, même sans insérer le moindre gap, on s'attend déjà à observer 25% d'identité au hasard. Pour éviter cet écueil, les logiciels d'alignement de séquence calculent plusieurs scores informatifs qu'il est important de savoir interpréter.

- **Longueur de l'alignement** (qui dépend notamment des gaps insérés dans les deux séquences)
- **Nombre** et **pourcentage d'identité**
- **Nombre** et **pourcentage de positifs** (positifs = identités + similarités)
- **Nombre** et **pourcentage de gaps**
- **Score brut** (exprimé en bits d'information, que vous pouvez considérer comme une boîte noire à ce stade)
- L'**espérance aléatoire**, notée "**E-value**", "**expect**", est la clé principale d'évaluation de la significativité statistique de l'alignement (et indirectement, de sa pertinence biologique)

Comment interpréter une e-valeur ?

Dans un résultat de BLAST, l'espérance aléatoire (score **expect**) indique, le nombre d'alignements au moins aussi bons (avec un score brut au moins égal à celui obtenu) si on avait effectué la même recherche avec une requête et/ou une base de données de séquences aléatoires.

Ce nombre est par définition

- Toujours positif
- Éventuellement supérieur à 1

Par conséquent, une valeur **expect**

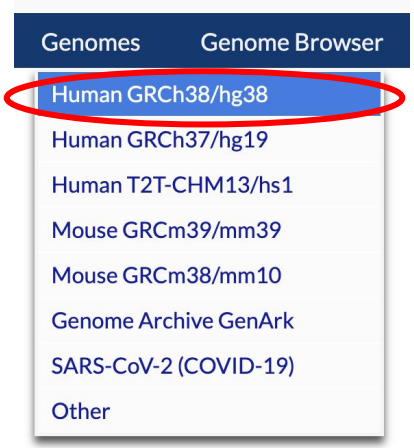
- ≥ 1: résultat pas du tout significatif
- ≤≤≤ 1 (par exemple 1.4e-95): résultat très significatif
- Faiblement inférieur à 1 : faiblement significatif, risques de faux-positifs (considérer comme significatif un résultat qui résulte du hasard)
- 0: littéralement, signifie qu'un tel serait impossible avec des séquences aléatoires. En pratique, signifie que la e-value est inférieure à la limite de précision du calcul informatique (ce qui correspond à peu près à < 1e-320)

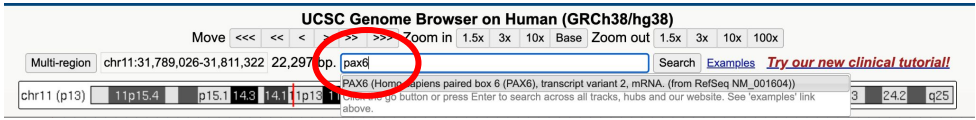
Cas d’étude 1.
Contexte génomique et transcriptomique du gène humain PAX6

Tutoriel illustré
Annotations génomiques dans la région du gène humain PAX6

PAX6 sur UCSC genome browser

- Connectez-vous au **UCSC Genome Browser**
- Dans le menu **Genomes**, sélectionnez la version **hg38 du génome humain.**
- Entrez le nom du gène d'intérêt (**PAX6**) dans la boîte de recherche et cliquez sur **Search**.



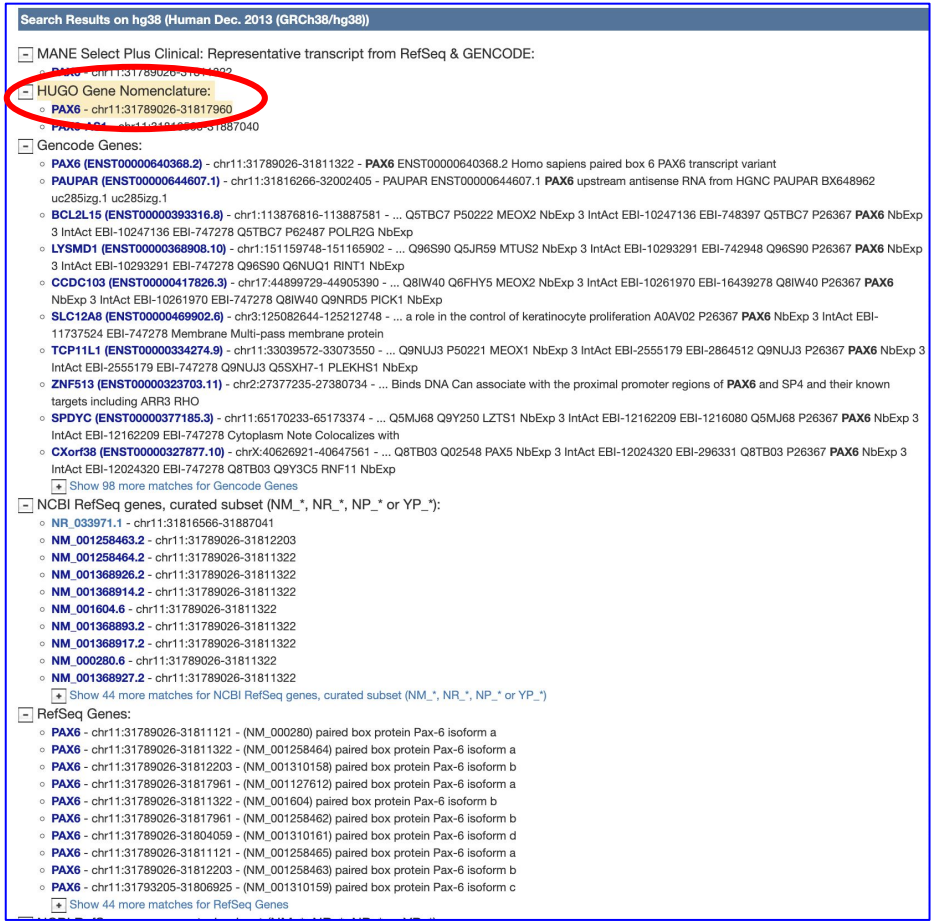


PAX6 sur UCSC genome browser

- Connectez-vous au **UCSC Genome Browser**
- Sélectionnez la version **hg38 du génome humain**
- Entrez le nom du gène d'intérêt (**PAX6**) dans la boîte de recherche et cliquez sur **Search**.

La page de résultat affiche une série d'annotations de PAX6 dans différentes bases de données de référence pour le génome humain. Comment choisir ? En première instance, le mieux est de se fier aux annotations du consortium international HUGO, responsable de la nomenclature des gènes humains.

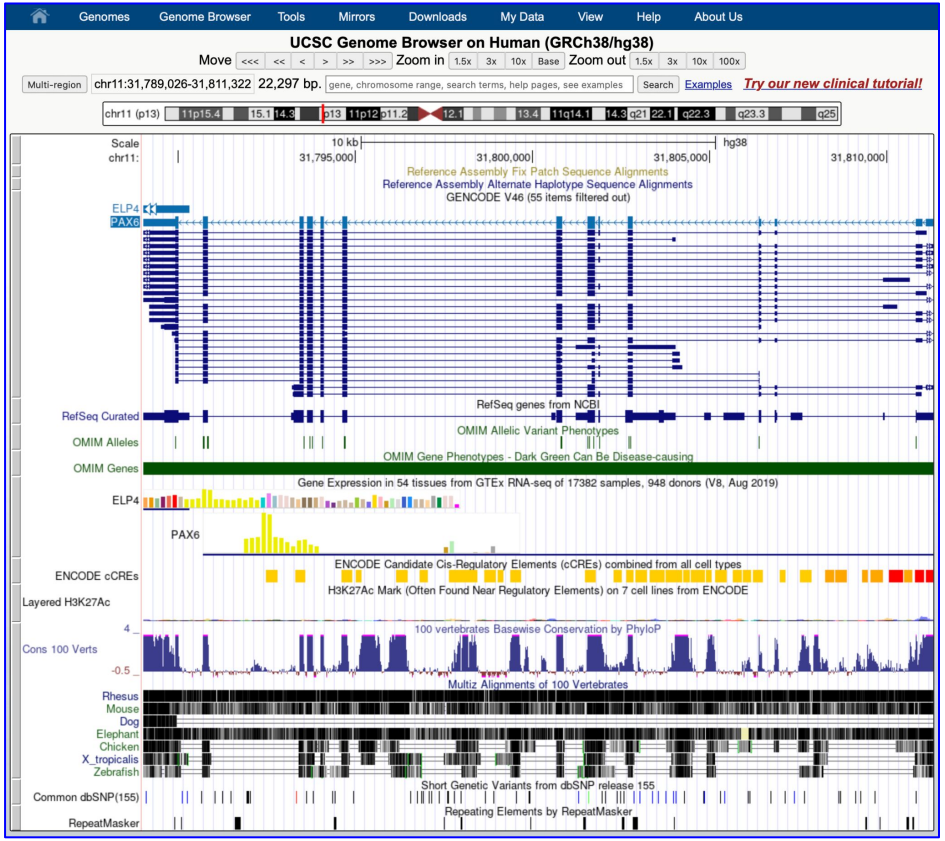
- Sous le titre "HUGO Gene Nomenclature", cliquez sur le lien **PAX6** - chr11:31789026-31817960



Choix de pistes d'annotations du UCSC Genome Browser

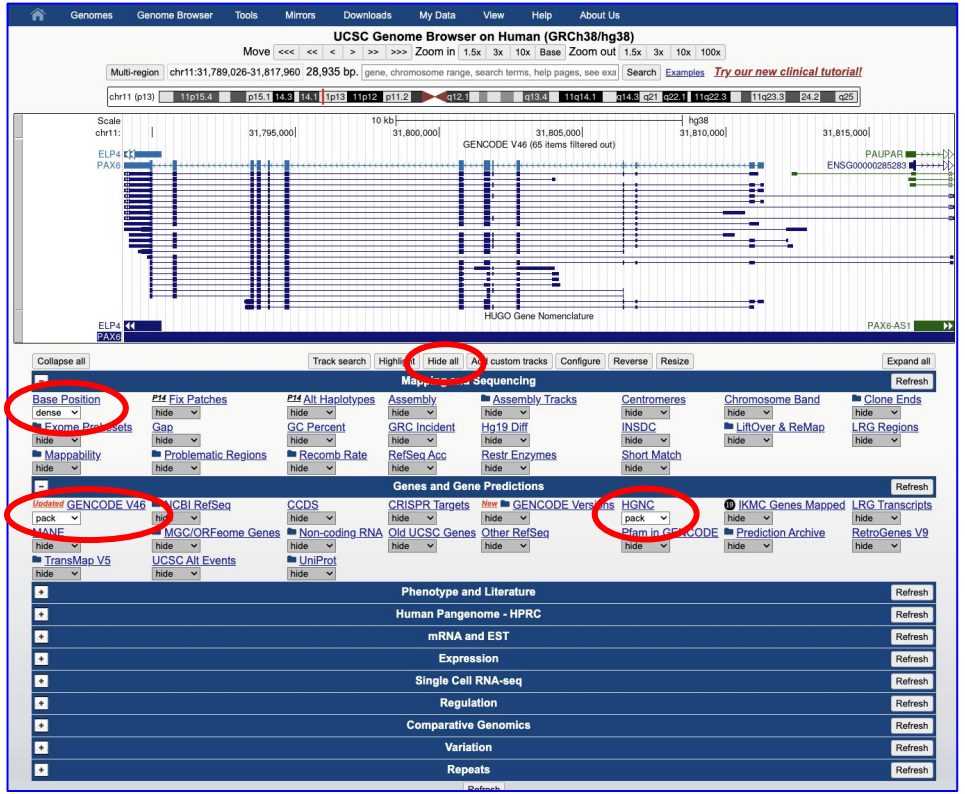
Le navigateur de génomes **UCSC Genome Browser** affiche un vaste choix de pistes d'annotation. La carte génomique en affiche un sous-ensemble, qui s'adaptent en fonction de vos consultations précédentes.

Nous allons restreindre la visualisation aux pistes d'annotations utilisées pour ce TP.



PAX6 sur UCSC genome browser

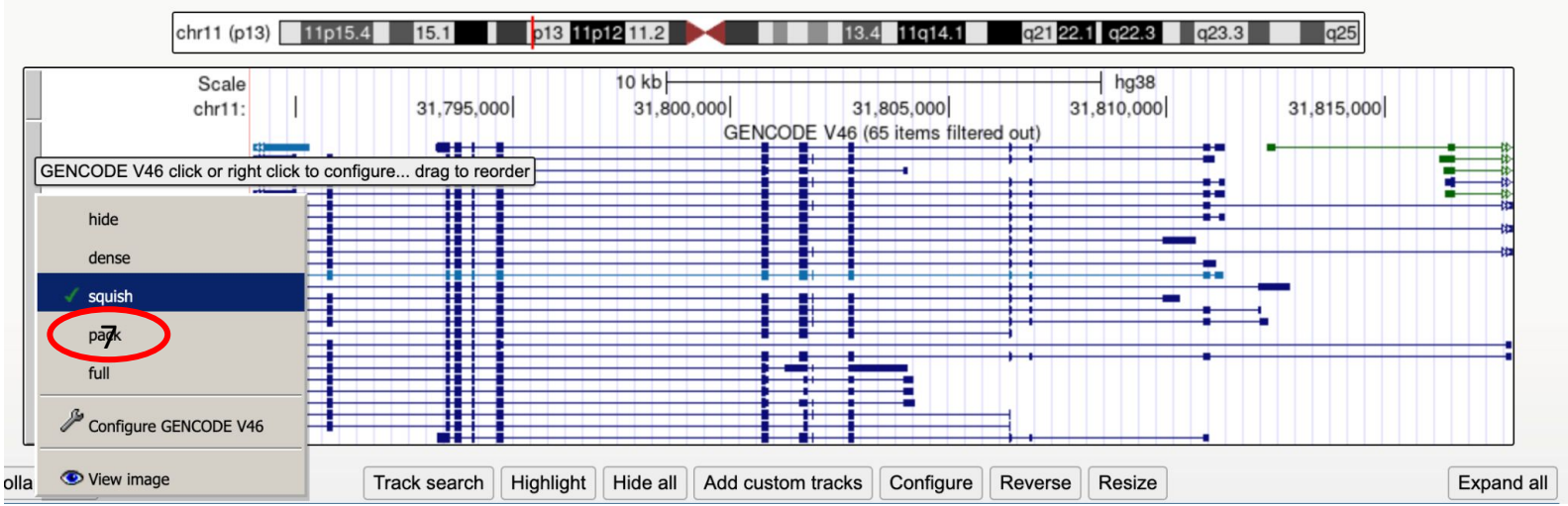
- Descendez sous la carte génomique pour afficher les choix de pistes d'annotations.
- Entre la carte et les options, cliquez **Hide all** pour masquer les pistes génomiques par défaut.
- Dans la catégorie "**Mapping and Sequencing**", sélectionnez le mode d'affichage "**dense**" pour la piste d'annotation "**Base position**".
- Dans la catégorie "**Genes and Gene Prediction**", sélectionnez le mode "**pack**" pour les pistes "**GENCODE_V46**" et **HGNC**.
    - HGNC indique les limites des gènes, tandis que GENCODE_V46 fournit des informations plus détaillées sur la structure des gènes (introns, exons, transcrits alternatifs, ...).
- Cliquez "**Refresh**" à droite d'une des catégories.
- Cliquez "**Resize**" sous la carte pour ajuster la largeur à celle de votre écran.



Reconfigurer le mode d'affichage

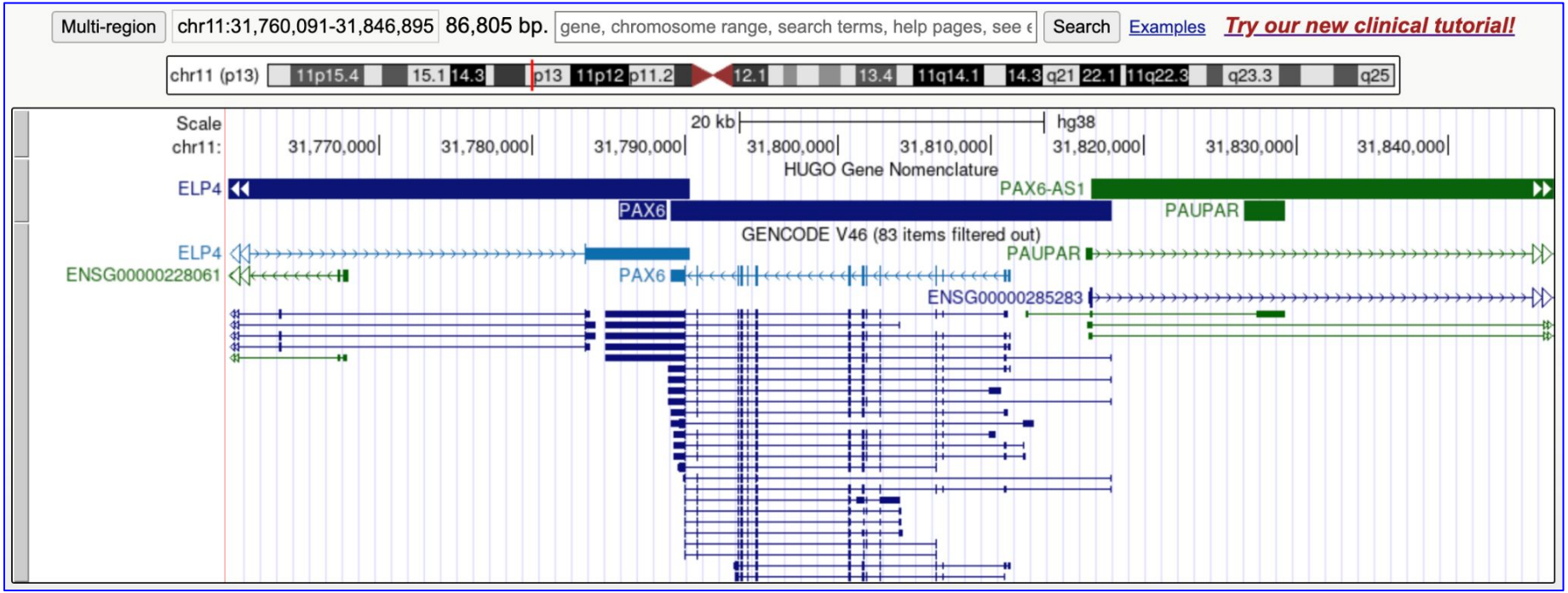
Vous pouvez à tout moment reconfigurer le mode d'affichage d'une piste d'annotation, en cliquant droit (**contrôle-clic**) sur la figure. Ceci vous affichera un menu avec des modes d'affichages de plus en plus détaillés : hide, dense, squish, pack, full.

- Testez les différents niveaux de détail avec la piste **GENCODE_V46**, puis sélectionnez le mode **pack**, qui vous permet généralement de visualiser les transcrits alternatifs en occupant une place raisonnable.



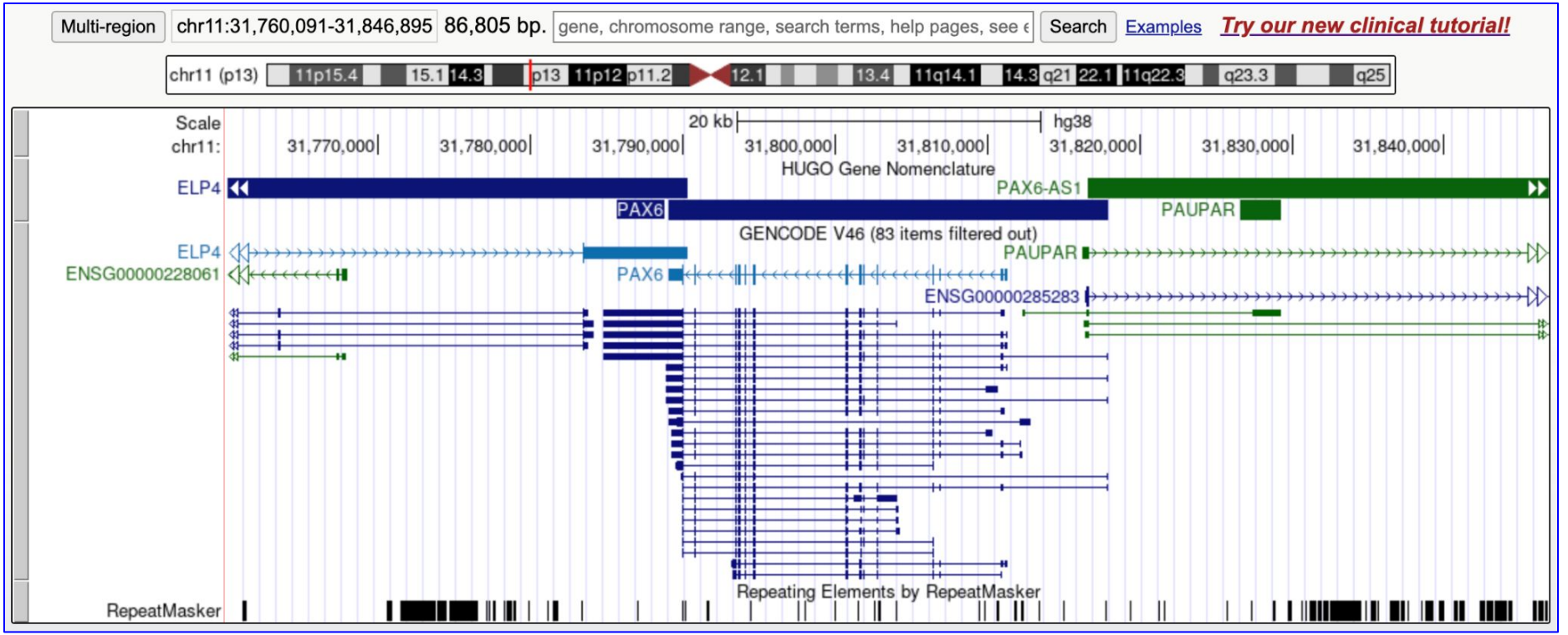
Voisinage du gène PAX6

- Dézoomez (**Zoom out**) d'un facteur **x3** pour voir les environs du gène
- **Déplacez** la piste HGCN au-dessus de la piste GENCODE (en positionnant la souris vers le coin supérieur gauche d'une piste, une flèche apparaît qui permet de la déplacer)
- Observez la disposition du gène PAX6. Notez qu'il chevauche ses voisins de gauche (ELP4) et de droite (PAX6-AS1, où AS indique qu'il s'agit d'un gène antisens).



Régions répétées

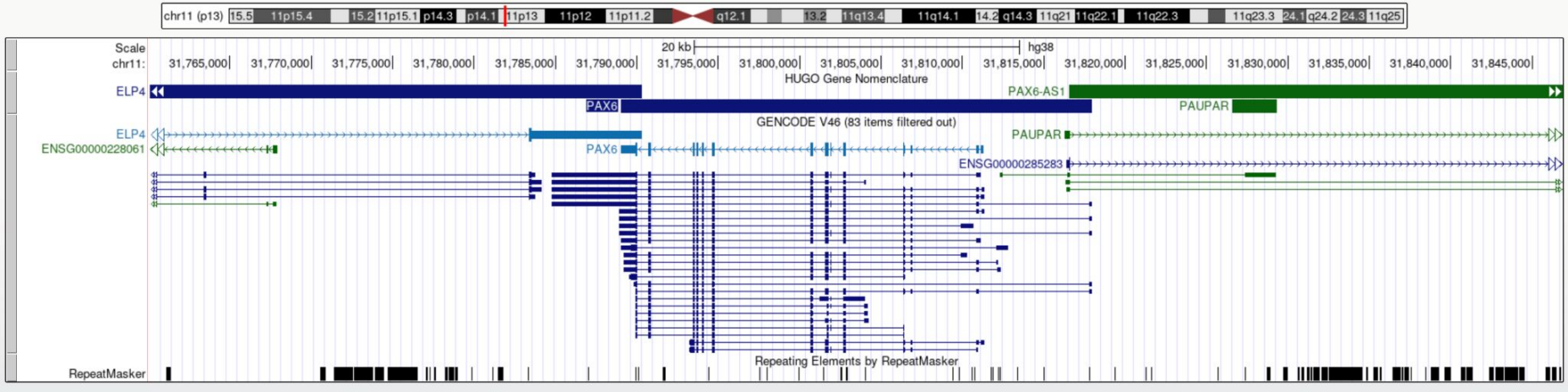
- Dans la catégorie "**Repeats**", activez l'affichage de "**Repeatmasker**" en format "**dense**" et cliquez "**Refresh**".
- Comparez les localisations des éléments répétés et la structure du gène PAX6 et des régions qui l'entourent. Pour mieux voir des détails, vous pouvez zoomer et parcourir ces régions progressivement.



Exercice 1. Annotations génomiques dans la région du gène humain PAX6

Sur Ametice, ouvrez le questionnaire du TP3 et répondez aux questions de l'**Exercice 1**.

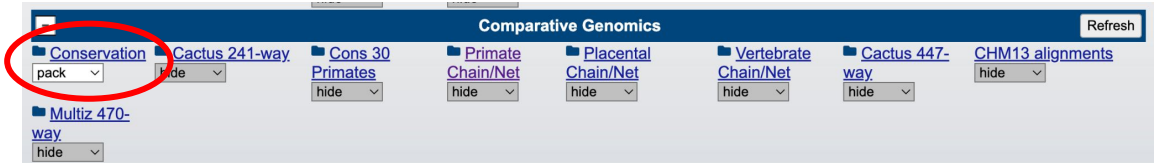
1. Sur quel chromosome est situé le gène PAX6 ? 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X, Y
2. Sur quel brin chromosomique se situe le gène PAX ? +, -
3. Sur quel bras chromosomique se trouve PAX6 ? Gauche, droite
4. Sur quelle région chromosomique se trouve le gène PAX6 ? p15.4, 15.1, 11p13, p11.2, q2.1, q23.3
5. Quelle est sa longueur en kilobases ? 12, 22, 29, 31 789, 31 817
6. Combien de régions répétitives distinguez-vous sur la région du gène PAX6 ? aucune, 15, 22, 30, 50
7. Quelle est la densité approximative (nombre de régions répétitives / kilobase) ? 0.1, 0.8, 1, 1.2, 1.3, 2, 5, 10
8. Sur la longueur du gène PAX6, les régions répétitives coïncident généralement avec les introns, régions exoniques codantes, régions exoniques non-codantes

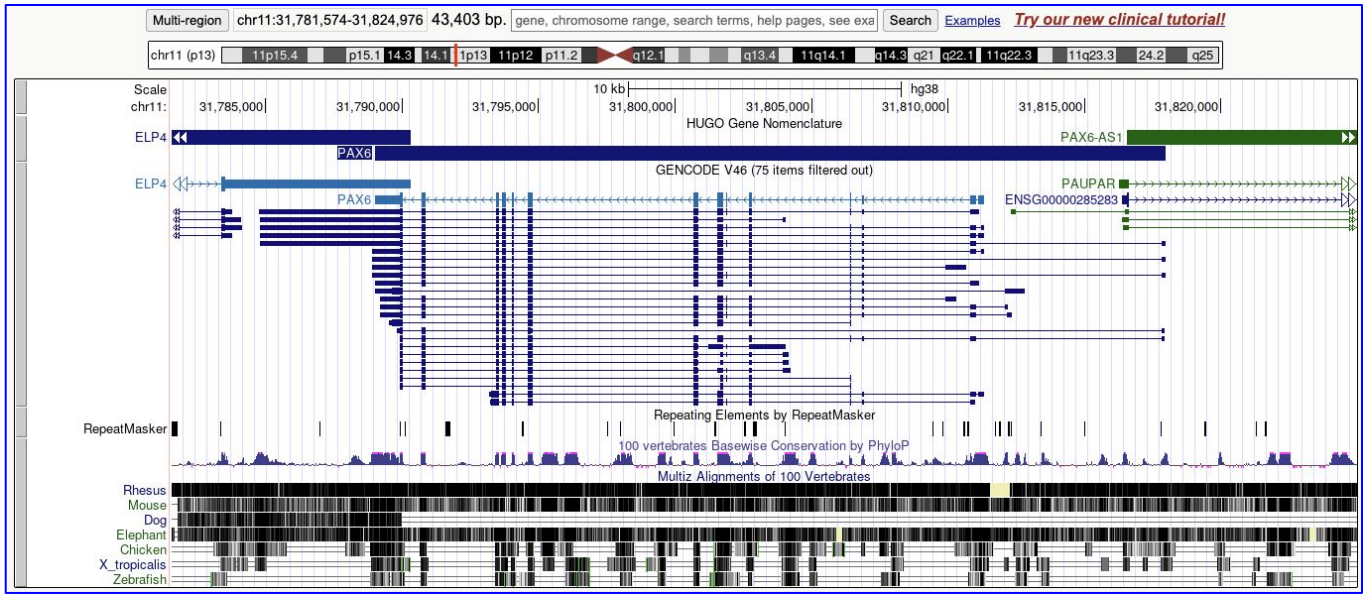


Conservation du gène PAX6 dans les génomes de vertébrés

Génomique comparative : régions conservées chez les vertébrés

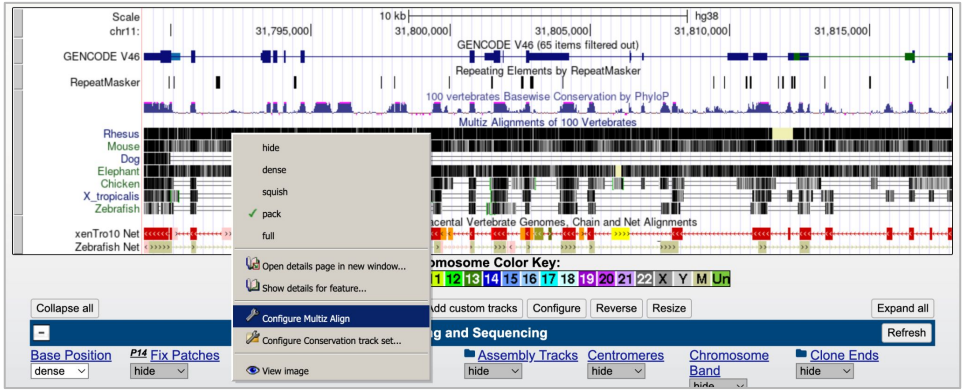
- Dans la catégorie **Comparative genomics**, activez l'affichage **pack** de la piste **Conservation**. Cette piste s'affiche entre les annotations GENCODE_V46 et les régions répétitives
- Faites remonter la piste **RepeatMasker** pour la placer entre les pistes GENCODE_V46 et Conservation

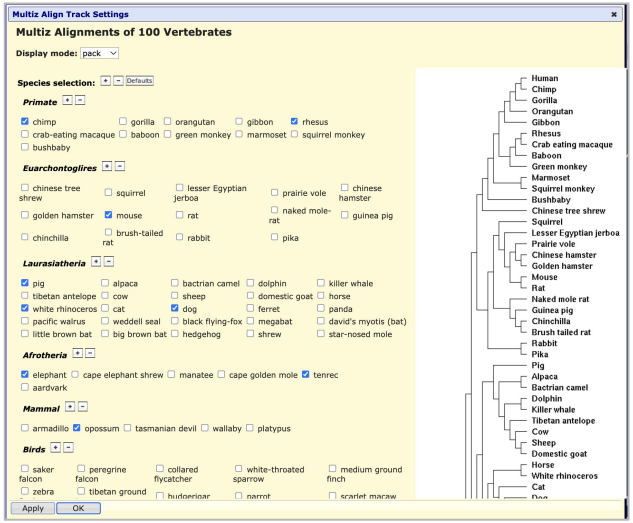




Configuration de la piste d'annotation Conservation

- Cliquez droit (contrôle-clic) sur l'image de conservation à la hauteur où s'affichent les espèces et sélectionnez **Configure MultiZ Align**.
- Dans la fenêtre d'options qui apparaît, **cochez quelques espèces de votre choix**
  - **Veillez à panacher** (essayez d'avoir une ou deux espèces de chaque groupe plutôt qu'un tas d'espèces du même groupe).
  - Pour une raison technique, le génome du chien présente des lacunes à cet endroit du génome. **Désactivez l'affichage du chien** (dog) et activez celui d'un ou deux autres mammifères du même groupe.
  - Dans la catégorie **Mammal**, **cochez toutes les espèces**. Notez que les catégories précédentes contiennent également des mammifères (Primates, Euarchontoglires, Laurasiatheria). La catégorie Mammal présente des espèces plus éloignées (marsupiaux, monotrèmes), qui sont utiles pour visualiser les régions les plus conservées entre mammifères.
- Cliquez **Apply**.
- **Dézoomez d'un facteur 1.5** pour observer le contexte aux alentours du gène.

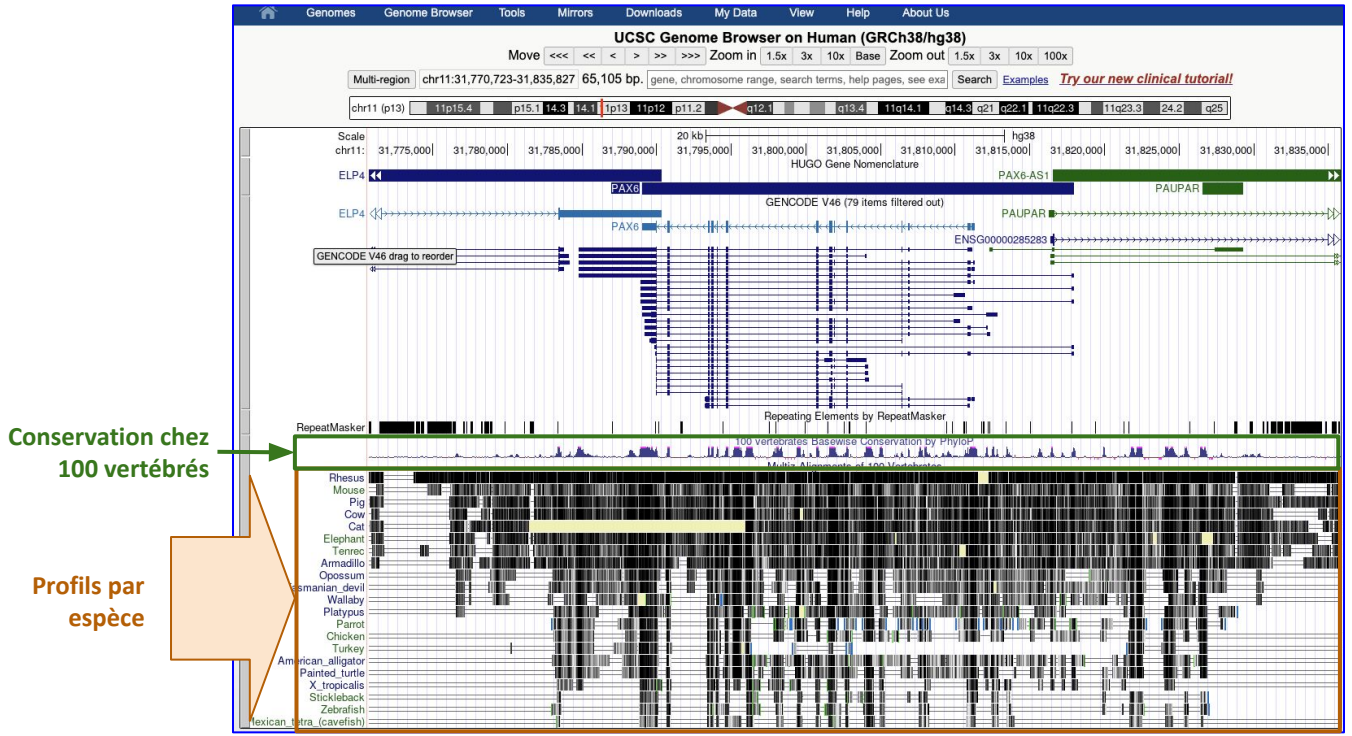




Conservation de la région génomique PAX6 chez les vertébrés

La carte de conservation génomique comporte deux parties.

1. La partie supérieure affiche un **profil de conservation dans 100 génomes de vertébrés**. La hauteur du profil indique le pourcentage de positions identiques (PPI) à chaque position du génome. Notez que l'échelle verticale va de 50% à 100%, pour mieux faire ressortir les régions conservées.
2. La partie inférieure indique, sous forme d'une échelle de gris, le **profil de conservation par espèce** (pour celles que vous avez sélectionnées).
3. Les zones marquées en jaune correspondent à des trous de séquençage (on ne dispose pas de la séquence).



Exercice 2. Conservation de la région génomique PAX6 chez les vertébrés

Sur Ametice, ouvrez le questionnaire du TP3 et répondez aux questions de l'**Exercice 2**.

1. Zoomez sur la carte génomique que vous avez générée et parcourez le gène PAX6 sur toute sa longueur. Sur le profil de conservation génomique 100 vertébrés, dans quelles régions du gène retrouve-t-on généralement les régions conservées (plusieurs réponses possibles):
   - ❑ 5'UTR
   - ❑ partie codante des exons
   - ❑ Introns
   - ❑ 3'UTR

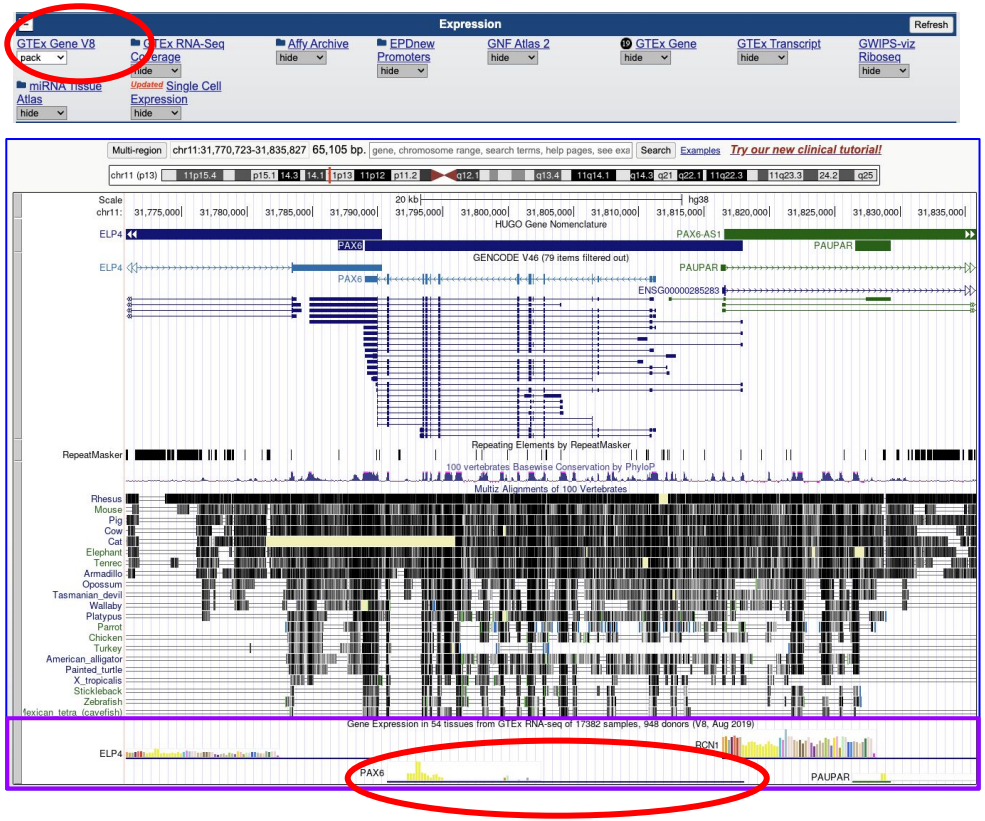
2. Sur la carte des profils par espèces, quel est l'ordre décroissant des degrés de conservation (une seule réponse)
   - Primates > Poissons > Mammifères non primates
   - Poissons > Mammifères non primates > Primates
   - Primates > Mammifères non primates > Poissons
   - Poissons > Primates > Mammifères non primates

Expression tissulaire du gène PAX6

Profils tissulaires de transcription dans GTEx (Genotype-Tissue Expression)

Nous allons maintenant ajouter à notre carte génomique une piste d'annotation de la base de données **GTEx** (Genotype-Tissue Expression). GTEx contient des données de transcriptome (mesure quantitative de tous les transcrits produits par un génome) dans des échantillons de 54 tissus prélevés chez 948 personnes adultes.

- Dans la catégorie **Expression**, activez l'affichage **pack** de **GTEX_Gene_V8.**
- **Cliquez sur l'icône** du gène PAX6 sur la piste GTEX_Gene_V8, et examinez le profil d'expression tissulaire.

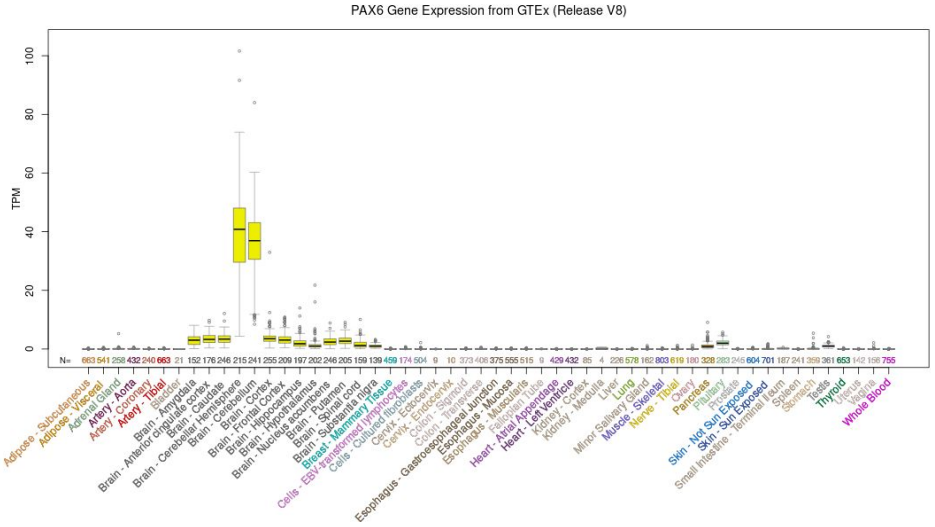


Profil d’expression tissulaire de PAX6

Interprétation du graphique

Les profils sont affichés sous forme de "boîte à moustaches" (box plot en anglais) pour chaque tissu.

- L’axe horizontal indique les tissus échantillonnés dans GTEx.
- L’axe vertical indique le taux de transcription.
- La barre horizontale épaisse indique le niveau médian (50% des échantillons ont un niveau inférieur, et 50% un niveau supérieur)
- Le bas du rectangle indique le 1er quartile (25% des échantillons ont un niveau inférieur)
- Le haut du rectangle indique le 3ème quartile (75% des échantillons ont un niveau inférieur)
- La barre verticale indique un intervalle de confiance
- Les points isolés sont des "outliers" (valeurs exceptionnellement hautes ou basses, non représentatives de l’ensemble des échantillons).

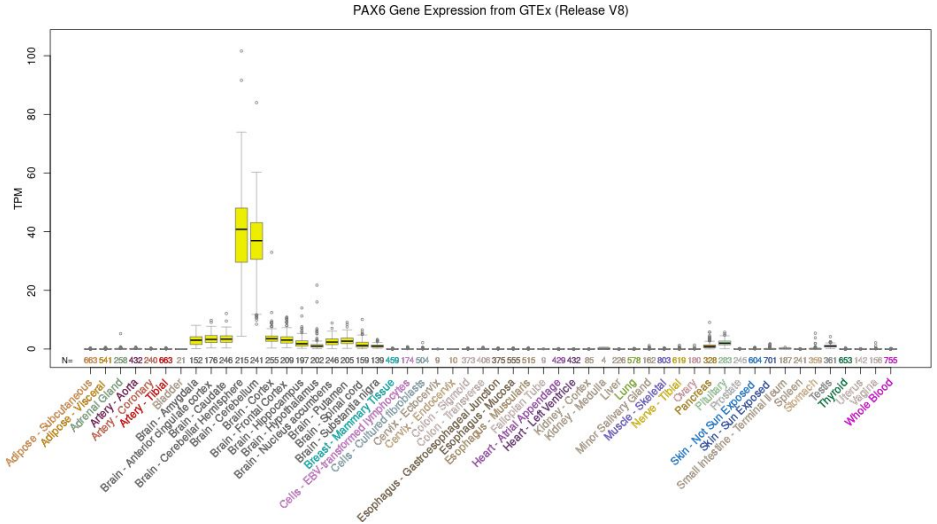


Exercice 3. Profil d'expression tissulaire de PAX6

Sur Ametice, ouvrez le questionnaire du TP3 et répondez aux questions de l'**Exercice 3**.

1. Indiquez le niveau d'expression de PAX6 dans les tissus suivants (fort/faible/indétectable)
   - ❑ Cervelet
   - ❑ Autres tissus du cerveau
   - ❑ Muscles
   - ❑ Poumons
   - ❑ Sang

2. GTEx se base sur des échantillons adultes. D'après la fonction de PAX6, on s'attend à observer également un profil d'expression très spécifique durant le développement embryonnaire. Vrai / Faux



Informations complémentaires

Pour aller plus loin (facultatif)

- **Page "training" de UCSC Genome Browser** (genome.ucsc.edu/training)
  - Guides d’utilisation (en anglais)
  - Courtes vidéos pour apprendre à manipuler les nombreuses fonctionnalités du site Web

Cas d’étude 2.
Annotation d’un fragment de séquence génomique bactérienne

Une séquence bactérienne à annoter

Nous disposons d'un fragment chromosomique bactérien, qu'on peut récupérer en cliquant ici.

seq_bact_a-annoter.fasta.txt

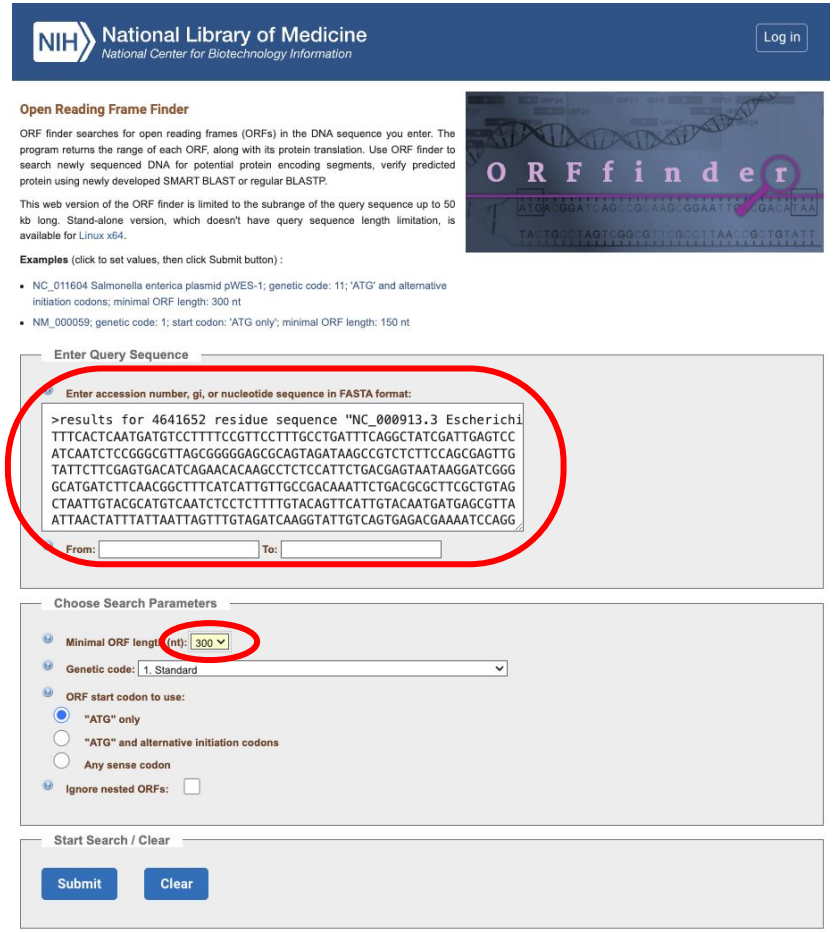
Ouvrez ce fichier dans un onglet séparé. Pour l'étape suivante, vous pourrez soit le copier à partir de cet onglet, soit le sauvegarder sur votre ordinateur et l'ouvrir avec un éditeur de texte de votre choix.

Nous allons utiliser quelques outils bioinformatiques pour annoter ce fragment d'ADN chromosomique. La première étape consiste à localiser les gènes sur ce fragment d'ADN. Il faudra ensuite essayer de trouver la fonction assurée par ces gènes.

Recherche de cadres ouvertes de lecture avec ORFfinder du NCBI

Afin de localiser les gènes sur ce fragment d'ADN chromosomique, nous allons effectuer une recherche de cadres ouverts de lecture (open reading frames, ORFs), en utilisant l'outil ORFfinder du NCBI.

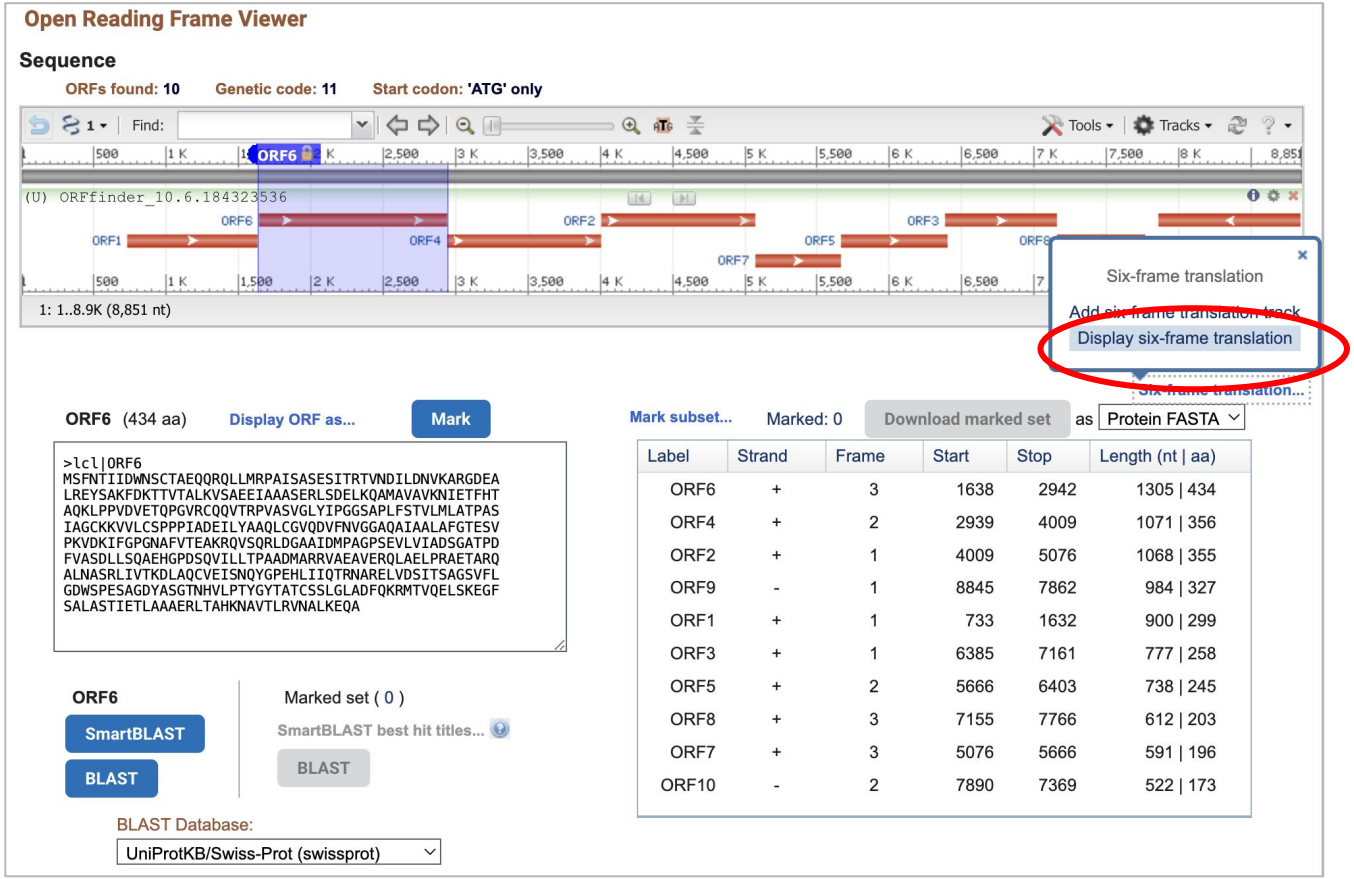
- Connectez-vous à l'outil **ORFinder du NCBI**.
- Collez la séquence du fragment chromosomique bactérien dans l'encadré **Enter Query Sequence**.
- Dans la section, **Choose Search Parameters** :
  - Fixez la longueur minimale des ORFs recherchés à **300 pb**
  - Laisse le **code génétique** à sa valeur initiale (**standard** *)
  - Pour le codon start à utiliser pour la recherche, choisissez **ATG only** *
- Cliquez **Submit**.



* ***Note :*** *le menu "Genetic code" permet de choisir des codes alternatifs spécifiques de bactéries, qui comportent des codons alternatifs. La prise en compte de ces codons est généralement pertinente quand on annote un génome entier. Cependant, ceci crée aussi des ORFS surnuméraires, qui n'apporteraient pas d'information pour ce segment-ci de séquences. Dans le cadre de ce TP, nous utilisons donc le code génétique standard, et n'acceptons comme codon start que la séquence ATG.*

Recherche des cadres ouverts de lecture

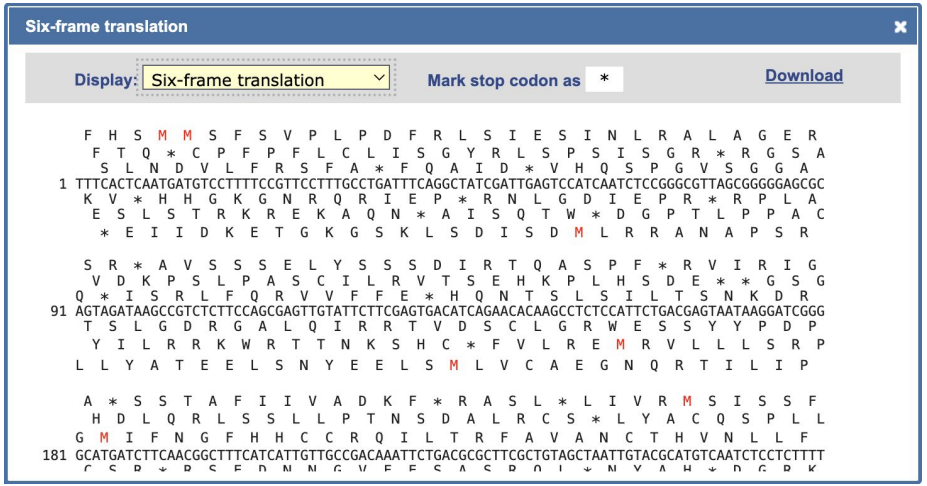
- Sur la fenêtre de résultats de la recherche d'ORFs, Cliquez sur **Six-frame translation**, puis sur **Display six-frame translation**.



Exercice 4. Traduction sur 6 phases

Questions

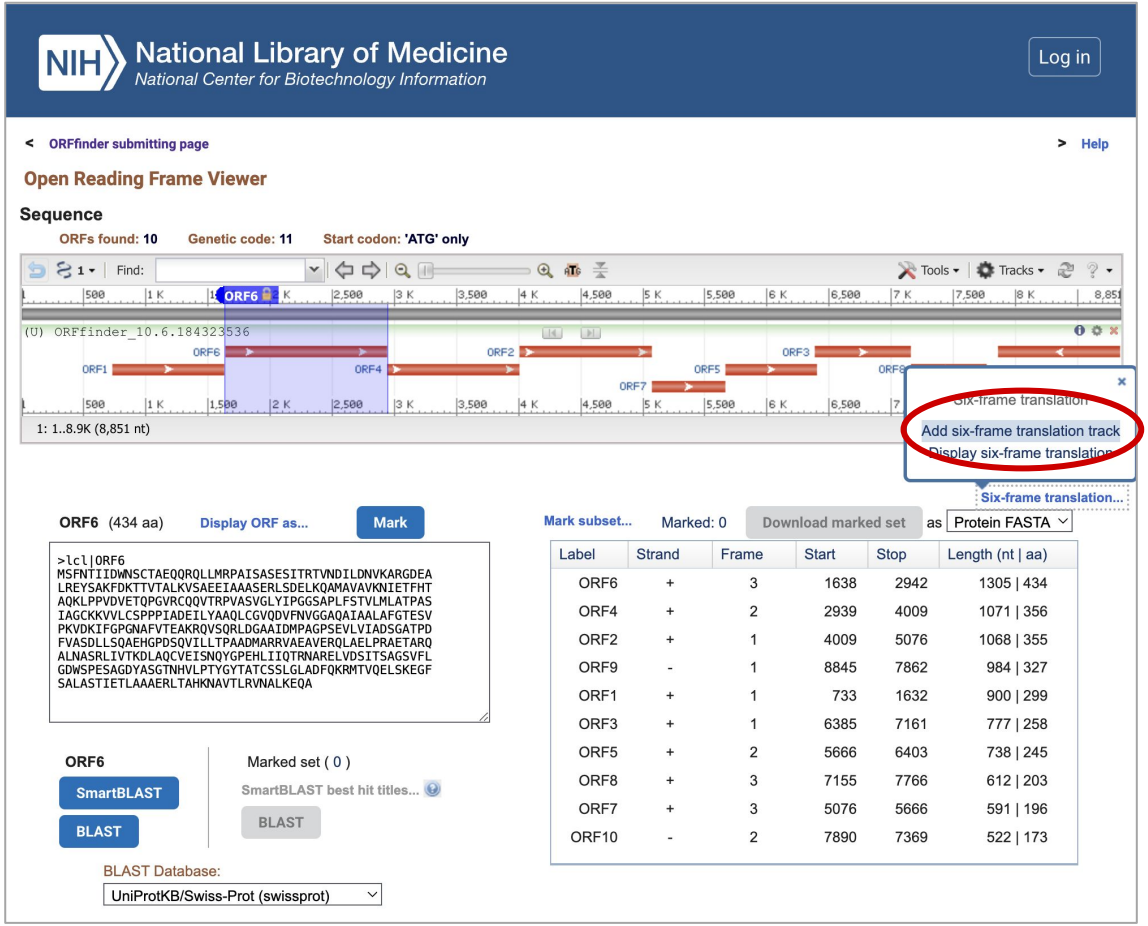
1. Parcourez la fenêtre de résultat de la traduction sur 6 cadres de lecture. Pourquoi y a-t-il 3 lignes de lettres décalées au dessus de la séquence d'ADN, et 3 en-dessous ? Cochez les affirmations correctes.
   - ❑ La place au-dessus ne suffit pas pour les 6 phases
   - ❑ La place au-dessous ne suffit pas pour les 6 phases
   - ❑ Les séquences protéiques au-dessus de la séquence d'ADN correspondent aux traductions sur les 3 phases directes
   - ❑ Les séquences protéiques au-dessous de la séquence d'ADN correspondent aux traductions sur les 3 phases réverse complémentaires
   - ❑ Les 3 séquences du dessus se lisent de gauche à droite
   - ❑ Les 3 séquences du dessus se lisent de droite à gauche
   - ❑ Les 3 séquences du dessous se lisent de gauche à droite
   - ❑ Les 3 séquences du dessous se lisent de droite à gauche
2. A quoi correspondent les lettres rouges?
   - UTR
   - Codons start
   - Introns
   - Exons
   - Régions codantes
   - Codons stop
   - Gaps d'alignement
3. A quoi correspondent les astérisques ? (mêmes options)
4. A quoi correspondent les lettres bleues (descendez dans la fenêtre pour les voir) (mêmes options)



Ajout de la traduction sur 6 phases de lecture

Fermez cette fenêtre, puis relancez la traduction sur 6 phases avec une option alternative:

- Cliquez sur **Six-frame translation** puis sur **Add six-frame translation track**.

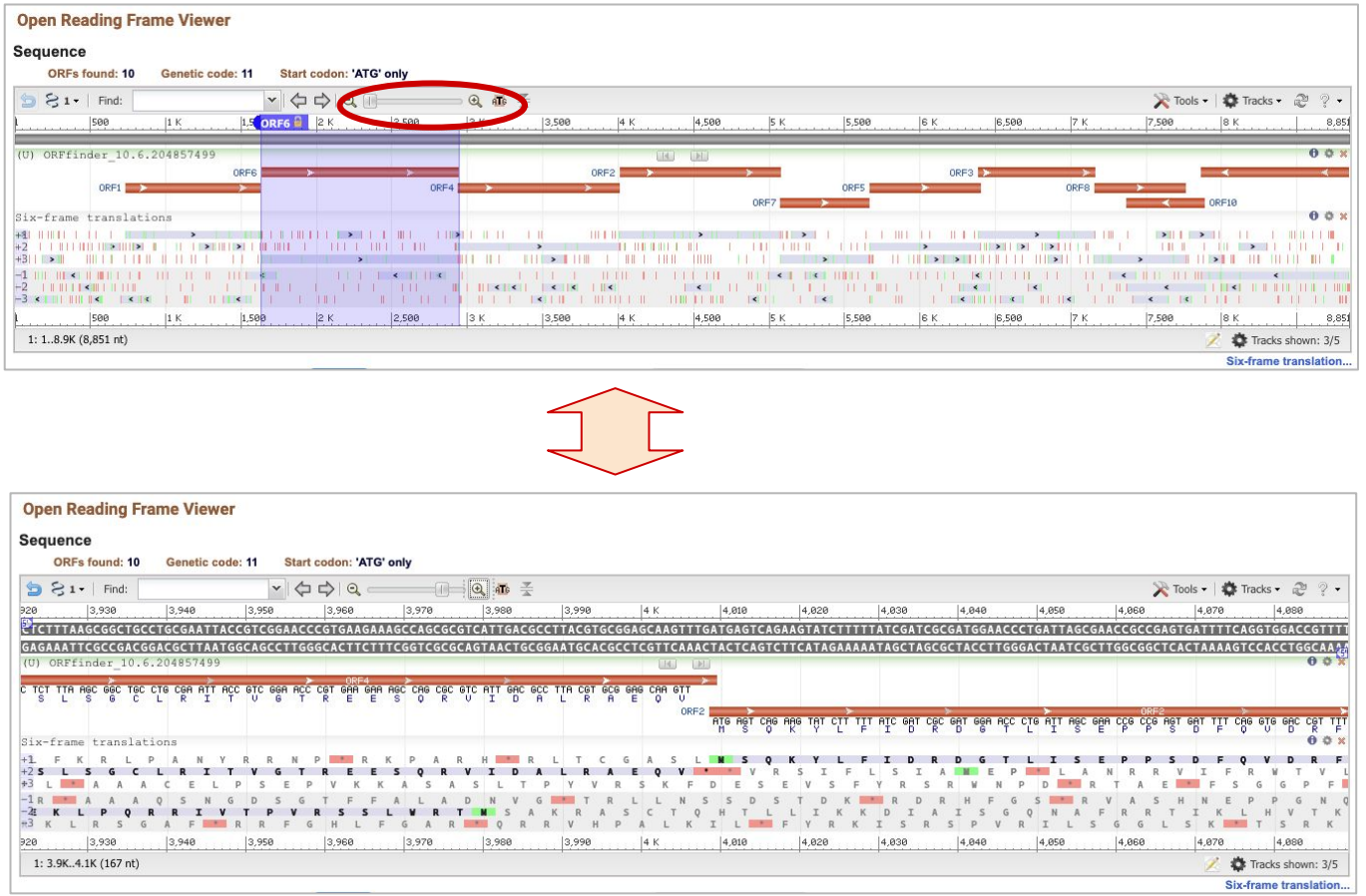


Exercice 5. Pistes de traduction sur les 6 phases de lecture

Qu'observez-vous dans la fenêtre qui s'affiche ?

Astuce : *pour répondre aux questions 2 et 3, zoomez sur la carte jusqu'à faire apparaître l'enchaînement des résidus (acides aminés et nucléotides).*

1. A quoi correspondent les pistes marquées +1, +2, +3, -1, -2, -3 ?
2. A quoi correspondent les traits verticaux verts ?
3. A quoi correspondent les traits verticaux rouges ?
4. A quoi correspondent les plages grises marquées d'une flèche ?
5. Y a-t-il le même nombre de plages grises que d'ORFs marqués en rouge dans la piste ORFinder ?
6. D'où vient la différence ?



Tailles des régions intergéniques

Vous allez maintenant déterminer la taille des **régions intergéniques** (**RI**) entre ces ORFs.

Astuce: *sous la carte des ORF, ORFfinder affiche un tableau indiquant les coordonnées génomiques et la taille des ORFs détectés. Vous pouvez récupérer les valeurs de ce tableau pour calculer la taille des régions intergéniques.*

- **Dézoomez** complètement.
- **Refermez la piste six-frame translation** en cliquant sur la petite croix rouge en haut à droite (attention, ne fermez pas la piste des ORFs produits par ORFfinder).
- Sur le tableau de coordonnées des ORFs, cliquez sur l'en-tête de colonne **Start** pour **trier les ORFs par position**.
- **Notez les positions** de fin de l'ORF1 et de début de l'ORF6.
- **Calculez la taille de la RI** entre ORF1 et ORF6.
- **Zoomez sur la région intergénique entre ORF1 et ORF6** et vérifiez si la taille calculée correspond à ce que vous voyez, au nucléotide près.
- Faites de même pour les autres ORFs, pour déterminer la taille des RI qui les séparent.

Mark subset... Marked: 0 Download marked set as Feature table

Label	Strand	Frame	Start	Stop	Length (nt | aa)
ORF1	+	1	733	1632	900 | 299
ORF6	+	3	1638	2942	1305 | 434
ORF4	+	2	2939	4009	1071 | 356
ORF2	+	1	4009	5076	1068 | 355
ORF7	+	3	5076	5666	591 | 196
ORF5	+	2	5666	6403	738 | 245
ORF3	+	1	6385	7161	777 | 258
ORF8	+	3	7155	7766	612 | 203
ORF10	-	2	7890	7369	522 | 173
ORF9	-	1	8845	7862	984 | 327

Exercice 6. Tailles des régions intergéniques

Questions (réponses numériques)

1. Quelle est la taille de la RI entre ORF1 et ORF6 ?
2. Quelle est la taille de la RI entre ORF2 et ORF7 ?
3. Quelle est la taille de la RI entre ORF5 et ORF3 ?

RI: région intergénique

QCM : que peut-on conclure de la taille de ces RI ?

1. Quelle structure serait présente sur ce fragment d'ADN chromosomique (une seule réponse) ?
   - UTR, intron, exon, opéron, site d'épissage
2. Quels ORFs seraient inclus dans cette structure (une ou plusieurs réponses) ?
   - ORF1, ORF6, ORF4, ORF5, ORF8, ORF10
3. Quels éléments vous permettent de conclure sur le nombre d'ORFs inclus dans cette structure (une ou plusieurs réponses) ?
   - Distances intergéniques courtes ou nulles
   - Chevauchements entre ORFs
   - Orientation des ORFs
   - Longueur des ORFs

Assignation de fonction par recherche de similarité

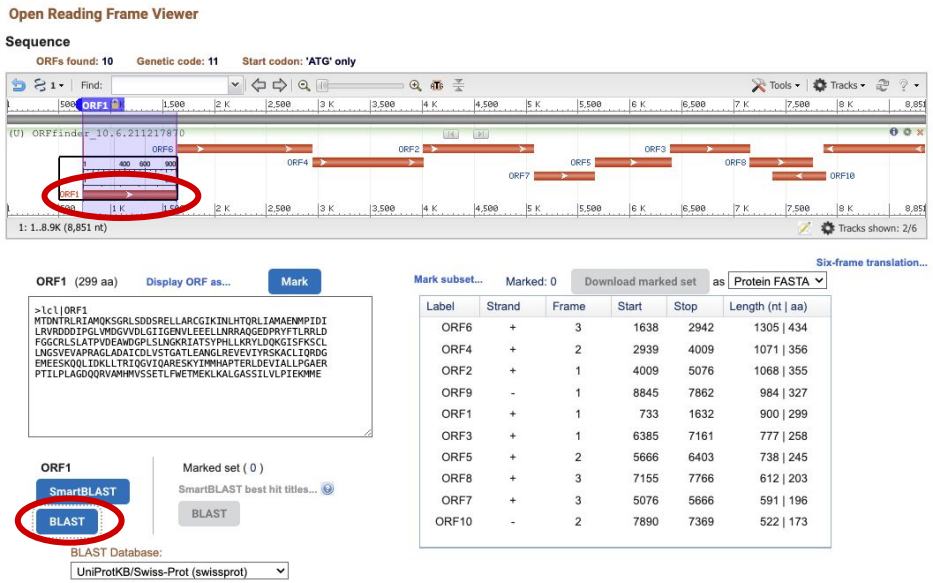
Vous allez maintenant vous intéresser à l'annotation fonctionnelle de ces ORFs détectés dans le fragment d'ADN chromosomique étudié.

Pour cela, le plus simple est de faire une recherche par similarité dans une base de données (outil BLAST), afin de comparer les ORFs identifiés aux séquences déjà connues et répertoriées dans les bases de données.

Vous allez ainsi vérifier à quel gène pourraient correspondre les ORF1 et 10.

- **Cliquez sur l'ORF1**. La traduction de l'ORF en protéine s'affiche dans l'encadré du dessous.
- Cliquez sur le bouton **BLAST**. Vous lancez ainsi une recherche de similarité en comparant la séquence protéique traduite de l'ORF1 avec chacune des séquences d'une base de données.

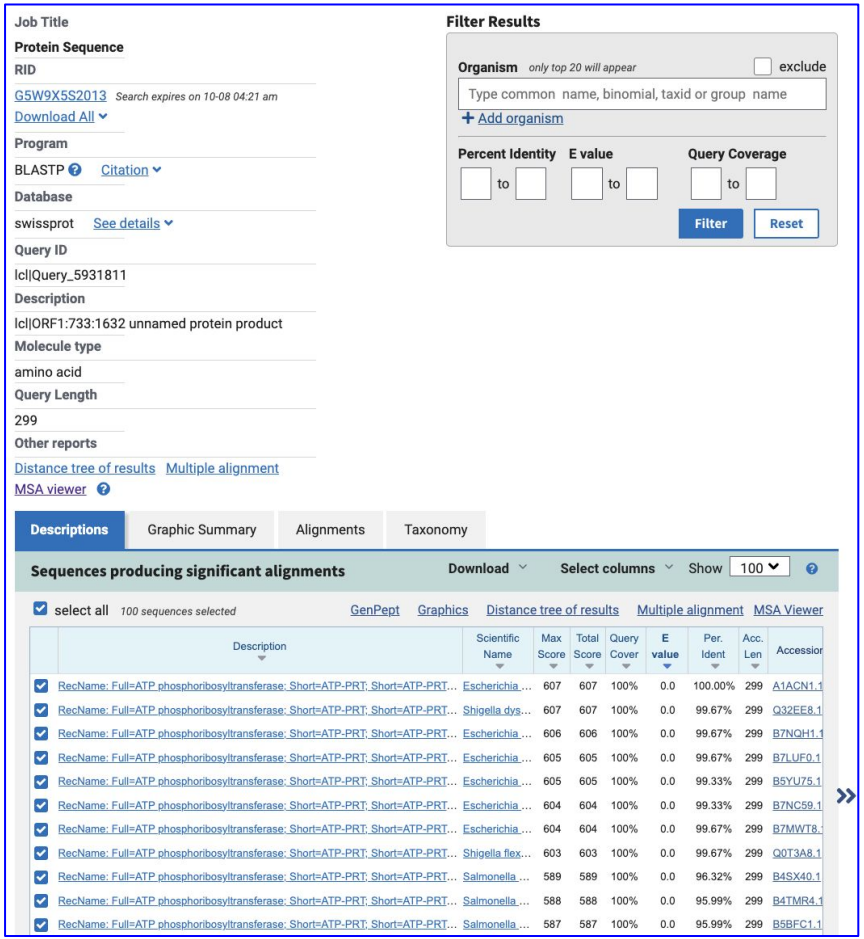
A partir de la page de résultats du BLAST, répondez aux questions suivantes



Exercice 7. Assignation de fonction par recherche de similarité

Questions

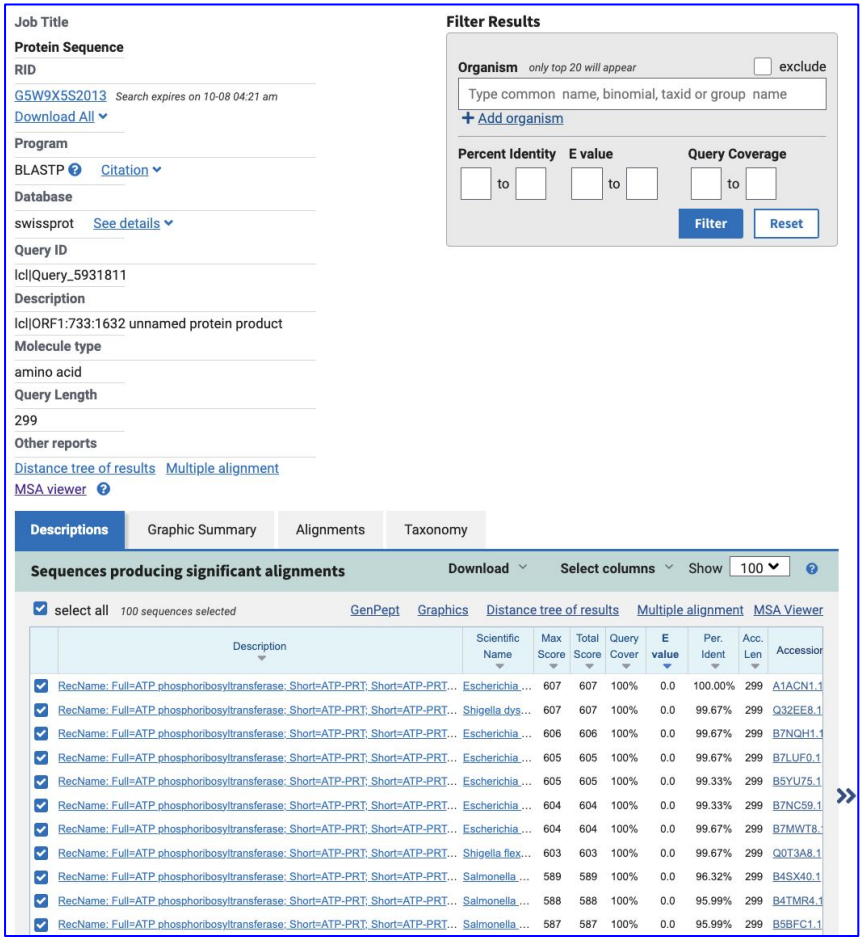
1. Quelle est la modalité de BLAST utilisée (une seule réponse) ?
   - blastn, blastp, blastx, tblastn
2. En quoi consiste une recherche par BLASTP (une seule réponse) ?
   - Requête protéine versus base de données de protéines
   - Requête nucléique versus base de données de protéines
   - Requête protéine versus base de données nucléique
3. Quelle base de données avez-vous interrogée lors de cette requête (une seule réponse) ?
   - UniprotKB TREMBL, UniprotKB complet, Swiss-prot
4. Combien de résultats obtenez-vous (réponse numérique) ?
5. Pour la séquence cible la plus similaire à la requête soumise, quel est le pourcentage d'identité obtenu (réponse numérique) ?
6. Quel est son pourcentage de couverture par rapport à la séquence requête (réponse numérique) ?



Exercice 7. Assignation de fonction par recherche de similarité

Questions (suite)

7. Quelle est la E-value obtenue (réponse numérique) ?
8. Que signifie une e-value de 0.0 (une seule réponse) ?
   - Similarité non significative
   - Ressemblance nulle
   - Similarité extrêmement significative
   - Impossibilité statistique d'obtenir un alignement aussi bon par hasard
9. Est-ce que ces deux séquences alignées sont vraisemblablement homologues ? (Oui / Non)
10. Quelle fonction peut-on ainsi associer à l'ORF1 (une seule réponse) ?
    - Histidinol dehydrogenase
    - ATP phosphoribosyltransferase
    - Histidinol-phosphate aminotransferase
    - ATP-PRT
    - Polysaccharide antigen chain regulator



Identification du gène correspondant à ORF1

Vous allez maintenant rechercher le nom du gène correspondant à l'ORF1.

- Dans la dernière colonne du tableau de résultats de BLAST, cliquez sur le "**numéro d'accession**" de la séquence la plus similaire à l'ORF1. Ceci ouvre dans un nouvel onglet la fiche de la séquence protéique correspondante.
- Dans la section "**FEATURES**" (annotations de la séquence), trouvez le premier objet de type gène, et consultez son nom (attribut "**/gene**" de 'l'objet "**gene**").

Exercice 7b : Identification du gène correspondant à ORF1

1. Quel est le nom du gène correspondant à l'ORF1 (une seule réponse) ?
   - HIS1_ECOK1
   - A1ACN1
   - Glycosyltransferase
   - hisG
   - HisG
   - ATP-PRT
   - ATP-PRTase
   - ATP phosphoribosyltransferase

RecName: Full=ATP phosphoribosyltransferase; Short=ATP-PRT; Short=ATP-PRTase

UniProtKB/Swiss-Prot: A1ACN1.1

Identical Proteins FASTA Graphics

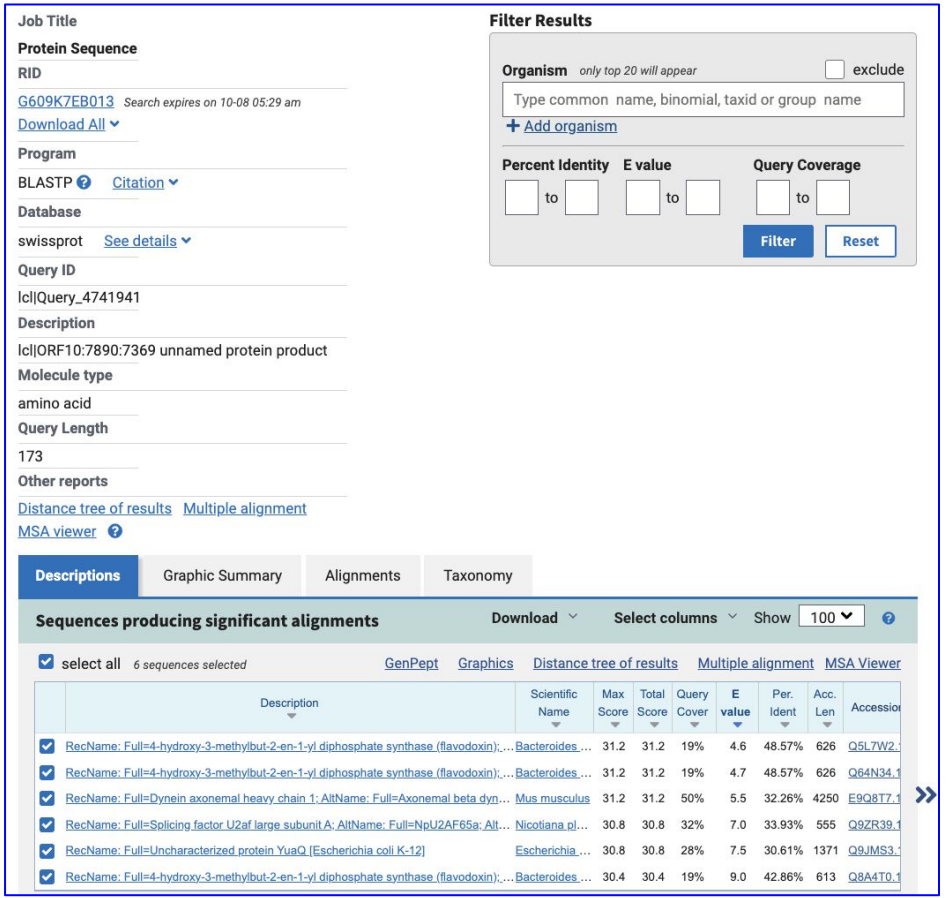
Go to:

```
LOCUS       HIS1_ECOK1              299 aa            linear   BCT 02-OCT-2024
DEFINITION  RecName: Full=ATP phosphoribosyltransferase; Short=ATP-PRT;
            Short=ATP-PRTase.
ACCESSION   A1ACN1
VERSION     A1ACN1.1
DBSOURCE    UniProtKB: locus HIS1_ECOK1, accession A1ACN1;
            class: standard.
            created: Jan 15, 2008.
            sequence updated: Jan 23, 2007.
            annotation updated: Oct 2, 2024.
            xrefs: CP000468.1, ABJ01421.1, WP_000131782.1
            xrefs (non-sequence databases): AlphaFoldDB:A1ACN1, SMR:A1ACN1,
            GeneID:86946973, KEGG:ecv:APECO1_1116, HOGENOM:CLU_038115_1_0_6,
            UniPathway:UPA00031, Proteomes:UP000000216, GO:0005737, GO:0005524,
            GO:0003879, GO:0000287, GO:0000105, CDD:cd13592,
            Gene3D:3.30.70.120, Gene3D:3.40.190.10, HAMAP:MF_00079,
            InterPro:IPR020621, InterPro:IPR013820, InterPro:IPR018198,
            InterPro:IPR001348, InterPro:IPR013115, InterPro:IPR011322,
            InterPro:IPR015867, NCBIfam:TIGR00070, NCBIfam:TIGR03455,
            PANTHER:PTHR21403:SF8, PANTHER:PTHR21403, Pfam:PF01634,
            Pfam:PF08029, SUPFAM:SSF54913, SUPFAM:SSF53850, PROSITE:PS01316
KEYWORDS    Amino-acid biosynthesis; ATP-binding; Cytoplasm;
            Glycosyltransferase; Histidine biosynthesis; Magnesium;
            Metal-binding; Nucleotide-binding; Reference proteome; Transferase.
SOURCE      Escherichia coli APEC O1
  ORGANISM  Escherichia coli APEC O1
            Bacteria; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE   1  (residues 1 to 299)
  AUTHORS   Johnson,T.J., Kariyawasam,S., Wannemuehler,Y., Mangiamele,P.,
            Johnson,S.J., Doetkott,C., Skyberg,J.A., Lynne,A.M., Johnson,J.R.
            and Nolan,L.K.
  TITLE     The genome sequence of avian pathogenic Escherichia coli strain
            O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal
            pathogenic E. coli genomes
  JOURNAL   J Bacteriol 189 (8), 3228-3236 (2007)
   PUBMED   17293413
  REMARK    NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE GENOMIC DNA].
            Erratum:[J Bacteriol. 2007 Jun;189(12):4554]
COMMENT     [FUNCTION] Catalyzes the condensation of ATP and 5-phosphoribose
            1-diphosphate to form N'-(5'-phosphoribosyl)-ATP (PR-ATP). Has a
            crucial role in the pathway because the rate of histidine
            biosynthesis seems to be controlled primarily by regulation of HisG
            enzymatic activity. {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
            [CATALYTIC ACTIVITY] Reaction=1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)-ATP +
            diphosphate = 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate + ATP;
            Xref=Rhea:RHEA:18473, ChEBI:CHEBI:30616, ChEBI:CHEBI:33019,
            ChEBI:CHEBI:58017, ChEBI:CHEBI:73183; EC=2.4.2.17;
            Evidence={ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
            [COFACTOR] Name=Mg(2+); Xref=ChEBI:CHEBI:18420;
            Evidence={ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
            ACTIVITY REGULATION: Feedback inhibited by histidine.
            {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
            [PATHWAY] Amino-acid biosynthesis; L-histidine biosynthesis;
            L-histidine from 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate: step 1/9.
            {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
            [SUBUNIT] Equilibrium between an active dimeric form, an inactive
            hexameric form and higher aggregates. Interconversion between the
            various forms is largely reversible and is influenced by the
            natural substrates and inhibitors of the enzyme.
            {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
            [SUBCELLULAR LOCATION] Cytoplasm {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
            [SIMILARITY] Belongs to the ATP phosphoribosyltransferase family.
            Long subfamily. {ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00079}.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..299
                     /organism="Escherichia coli APEC O1"
                     /db_xref="taxon:405955"
     gene            1..299
                     /gene="hisG"
                     /locus_tag="Ecok1_19270"
                     /gene_synonym="APECO1_1116"
     Protein         1..299
                     /product="ATP phosphoribosyltransferase"
                     /EC_number="2.4.2.17"
                     /note="ATP-PRT; ATP-PRTase"
                     /UniProtKB_evidence="Inferred from homology"
```

Fonction et identification de l'ORF10

L'ORF10 chevauche étonnamment l'ORF8 de manière importante, sur une grande partie de sa longueur. Afin de tenter de déterminer à quel gène pourrait correspondre cet ORF10, vous allez donc faire, pour l'ORF10, la même manipulation que celle faite pour l'ORF1.

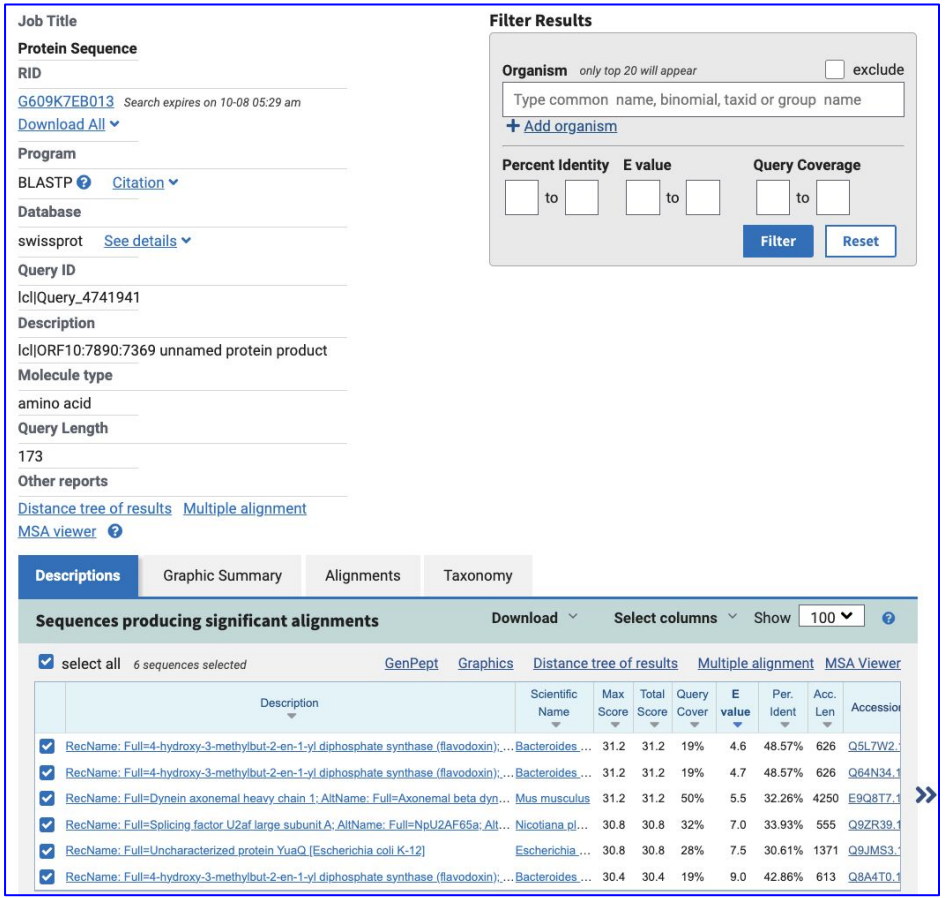
- Sur la page de résultat de la recherche d'ORF, commencez par trouver la taille en nt de l'ORF10, ainsi que la taille en aa de la protéine potentielle codée par cet ORF10. Pour cela, vous avez deux possibilités :
  1. Trouver ces informations dans l'encadré qui récapitule les ORFs trouvés sur le fragment d'ADN.
  2. Placer le curseur sur l'ORF10 (sans cliquer) : la fenêtre qui s'ouvre contient les caractéristiques de l'ORF10.
- Cliquez ensuite sur l'ORF10, afin de le sélectionner. La traduction de l'ORF en protéine s'affiche dans l'encadré du dessous.
- Cliquez sur le bouton BLAST pour lancer la recherche par similarité de séquences avec cette séquence protéique.



Fonction et identification de l'ORF10

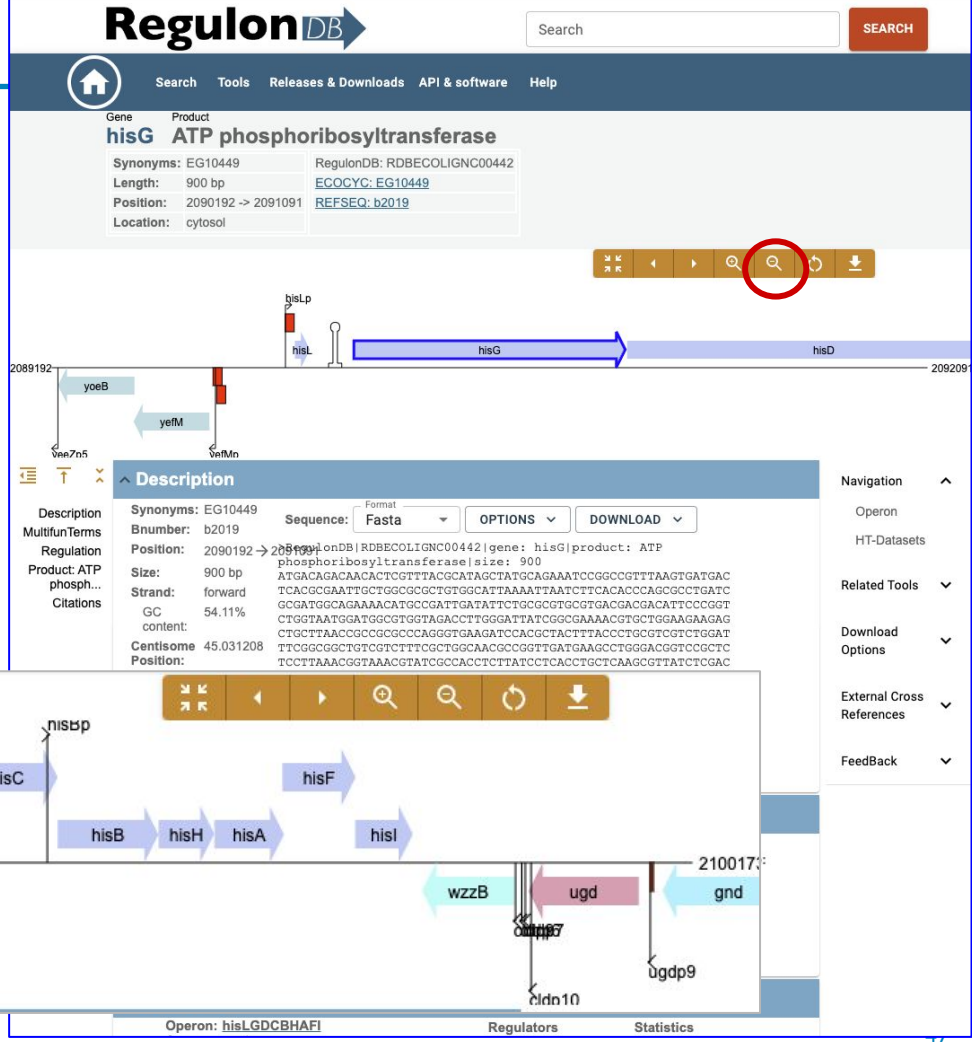
Exercice 7c : Fonction et identification de l'ORF10

1. Combien de résultats obtenez-vous (réponse numérique) ?
2. Quelle fonction pouvez-vous assigner à l'ORF10 sur base du résultat (une ou plusieurs réponses) ?
   - ❑ 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)
   - ❑ Dynein axonemal heavy chain 1
   - ❑ Splicing factor U2af large subunit A
   - ❑ Uncharacterized protein YuaQ
   - ❑ Aucune: les 6 résultats obtenus ne sont pas significatifs, car les e-values obtenues sont trop élevées (toutes > 1)
   - ❑ Aucune : ces 6 séquences cibles ne sont vraisemblablement pas homologues de l'ORF10
   - ❑ Aucune: l'ORF10 est vraisemblablement un faux positif, une fausse prédiction d'ORFfinder.



Recherche d'information sur RegulonDB

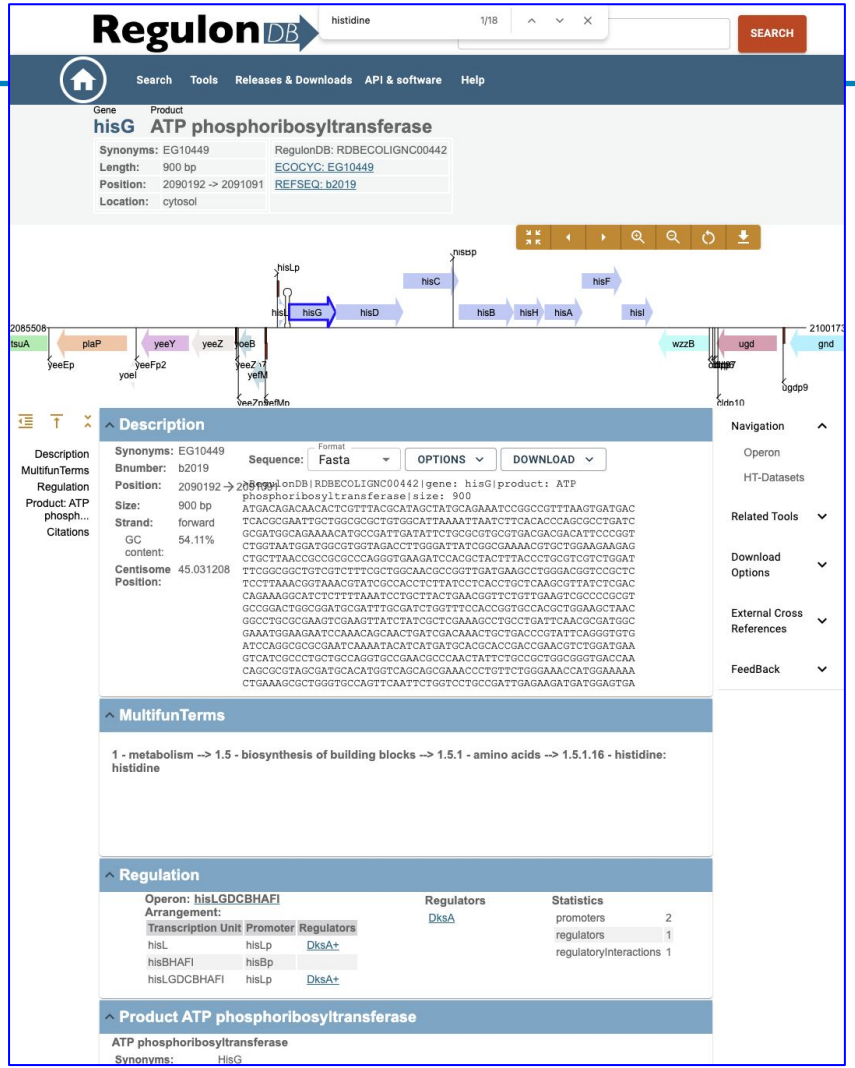
- Connectez-vous à la base de connaissances **RegulonDB**.
- Sur ce site, effectuez une recherche avec le nom de gène que vous avez trouvé précédemment pour l'ORF1. Pour cela, entrez simplement le nom de gène dans la barre de recherche.
- **Cliquez sur l'unique résultat** qui apparaît dans la section Gene.
- **Dézoomez** et **recadrez** la carte avec les flèches.



Exercice 8. Consultation de RegulonDB

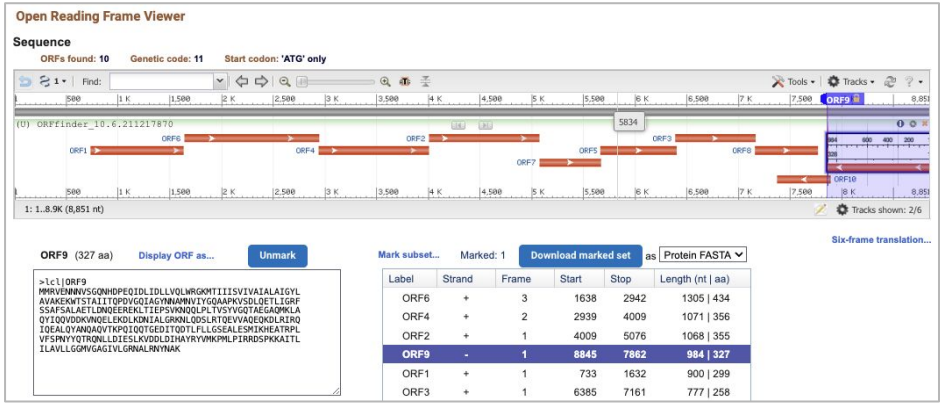
Questions

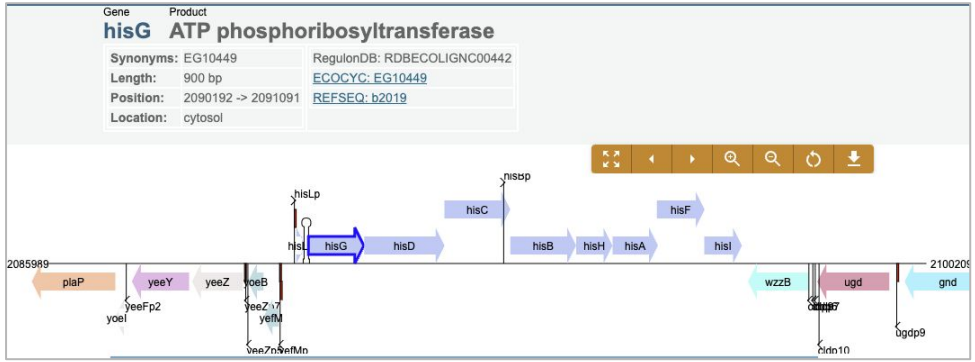
1. D'après la carte des gènes sur RegulonDB, le gène étudié se trouve-t-il bien dans la structure supposée précédemment ? (oui / non)
2. Dans les informations qui apparaissent sous la carte, trouvez le nom de l'opéron. Cliquez sur le nom de l'opéron, puis répondez aux questions suivantes. Sur quel brin ce trouve cet opéron ? (forward / reverse)
3. Combien y-a-t-il de gènes dans cet opéron ? 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
4. Combien y-a-t'il de promoteurs dans cet opéron ? 0, 1, 2, 3
5. Quel est le type de terminateur de la transcription présent dans cette unité de transcription ?
   - Dépendant de Rho
   - Indépendant de Rho
6. Quelle est la fonction de cet opéron ?
   - Catalyser la voie de biosynthèse de l'histidine
   - Réguler l'hystérie métabolique
   - Réguler la terminaison de la transcription
   - Activer en cascade la transcription d'une série d'autres gènes



Exercice 8. Consultation de RegulonDB

7. Comparez votre prédiction d'ORFs avec ORFfinder à la carte de l'opéron sur RegulonDB. Avez-vous détecté l'ensemble des gènes de l'opéron avec ORFfinder ? (oui / non)
8. Quel est le gène manquant dans votre résultat d'ORFfinder (une seule réponse) ?
    - yefM, hisLp, hisL, wzzB, hisA
9. Cliquez sur ce gène, puis trouvez sa taille (réponse numérique)
10. Pourquoi ce gène n'est-il pas détecté lors de la recherche avec ORFfinder (une ou plusieurs réponses) ?
    - Ce gène n'est pas codant
    - La taille minimale d'ORFfinder était de 75bp
    - La taille minimale d'ORFfinder était de 300bp
    - Ce gène est situé sur le brin complémentaire





Exercice 8. Consultation de RegulonDB

11. D'après la carte de l'opéron, à quel gène correspondrait l'ORF9 détecté avec ORFfinder (une seule réponse) ?
    - yeeZ, hisI, wzzB, ugd
12. Comment s'appelle le gène directement en amont de l'opéron ?
    - wzzB, ugd, hisL, hisLp, yefM
13. Pourquoi ce gène n'est-il pas détecté lors de la recherche avec ORFfinder (une seule réponse) ?
    - Il n'est pas codant
    - Il est situé sur le brin complémentaire
    - Il est en amont de la séquence fournie en début d'exercice.
    - La taille minimale d'ORFfinder était de 300bp