Introduction à la bioinformatique (UE SSV3U15)
Chapitre 3. Du gène au génome

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

Contenu du chapitre

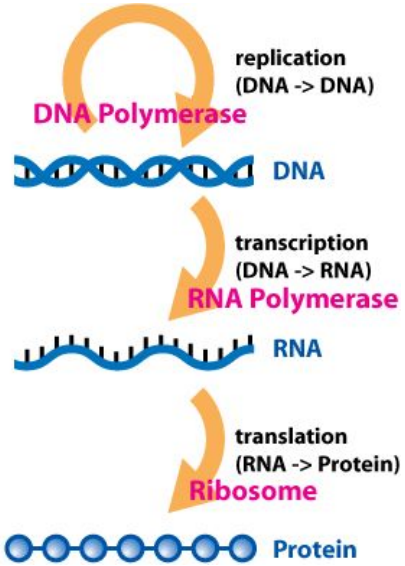
1. Les voies de l'information génétique
2. Structure d'un gène
3. Disponibilité des génomes
4. Composition et organisation des génomes
5. Annotation des génomes : où sont les gènes ?
6. Annotation des génomes : que font les gènes ?
    a. Assignation de fonction par similarité de séquences
    b. Un élément structurant des génomes: la régulation
    c. Génomique comparative
    d. Coupable par association
    e. La Gene Ontology – Définir et structurer les termes d'annotation des gènes et de leurs produits

Les voies de l’information génétique

DNA makes RNA makes protein

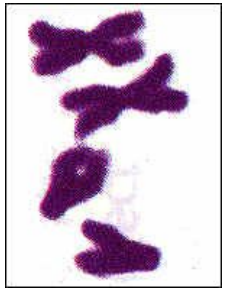
L'ADN est le support de l'information génétique, et ceci de deux façons

- **Hérédité**, via la réplication
- **Information fonctionnelle**
  - ADN –[transcription]⟶ ARN
  - ARN –[traduction]⟶ protéine
- Les protéines et certains ARN sont les effecteurs moléculaires des fonctions biologiques

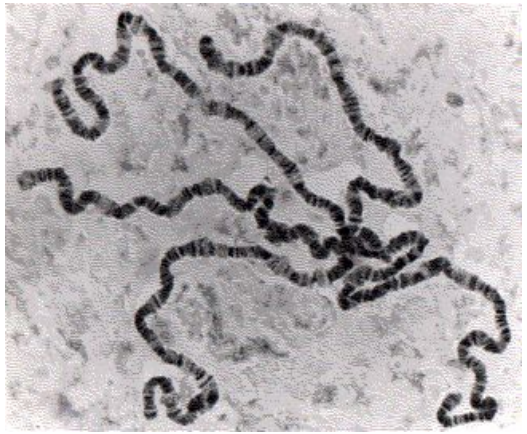


Les chromosomes constituent le support physique de l'hérédité

- En 1915, dans un livre intitulé Mécanismes de l'hérédité Mendélienne, Thomas Hunt Morgan formule la théorie chromosomique de l'hérédité.
- Ses observations
  - Les 4 groupes de liaison génétiques de la drosophile correspondent aux 4 chromosomes.
  - Les chromosomes sont porteurs des caractères transmis de façon héréditaire.
  - Sur chaque chromosome, les gènes sont ordonnés de façon linéaire.
- Il en déduit que les chromosomes sont le support physiques des caractères héréditaires.



http://news.bbc.co.uk/olmedia/440000/images/_443673_drosgene.jpg



http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Polytene.jpg

Caryotype humain

Chez l'humain, les noyaux des cellules somatiques comportent 23 paires de chromosomes.
Les cellules somatiques sont diploïdes: chaque cellule comporte 2 copies de chaque chromosome (1 maternelle et 1 paternelle).

Photo de chromosomes étalés

Ces mêmes chromosomes regroupés pour mettre en évidence les paires homologues

Les chromosomes sont essentiellement composés d'ADN

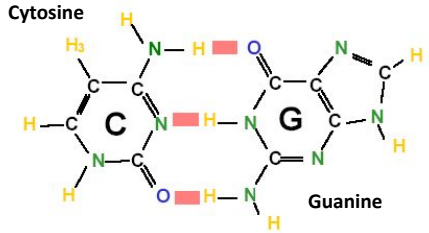
Chaque chromosome contient une chaîne extrêmement longue d'acide désoxyribonucléique (ADN).

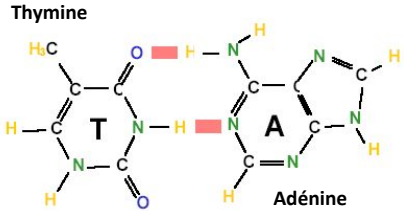
L'ADN est composé d'une double hélice, qui porte 4 types de bases azotées.

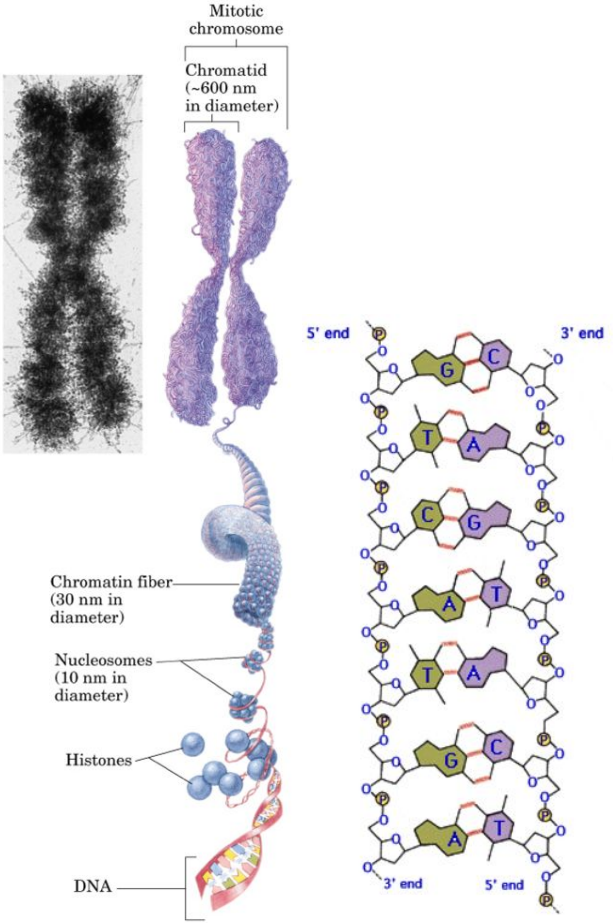
- A Adénine
- C Cytosine
- G Guanine
- T Thymine

L'information génétique réside dans la succession de ces bases azotées.

Ces bases azotées sont appariées de façon spécifique dans la structure en double hélice.



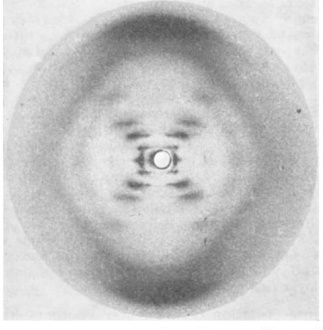




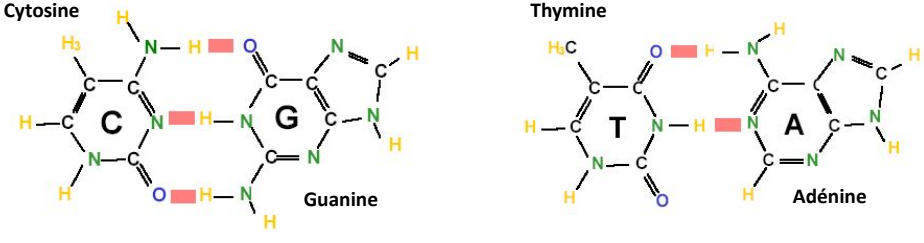
Structure de l'ADN - la double hélice

- En 1953, Watson et Crick proposent un modèle pour la structure B de l'ADN, inspiré par la structure cristallographique caractérisée par Rosalind Franklin.
- L'ADN est une double hélice, dont chacun des deux "montants" est formé d'une chaîne de désoxyribose (un sucre) unis par des groupes phosphate.
- Chaque "barreau" est formé par une paire de nucléotides liés par des ponts hydrogènes.
  - guanine ⟷ Cytosine (3 ponts hydrogène).
  - Adénine ⟷ Thymine (2 ponts hydrogène).

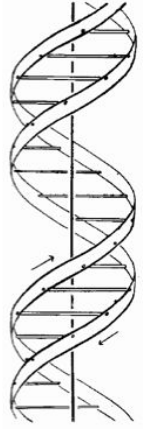
Image cristallographique l'ADN, par diffraction de rayons X
(R.E. Franklin and R. Gosling, 1953)

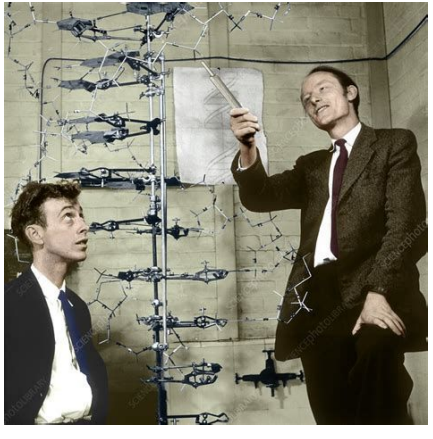


Sodium deoxyribose nucleate from calf thymus. Structure *B*



Modèle de la structure de l'ADN (Watson and Crick, 1953b)





- Franklin,R.E. and Gosling,R.G. (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. doi.org/10.1038/171740a0
- WATSON,J.D. and CRICK,F.H. (1953a) The structure of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 18, 123–131.doi.org/10.1101/sqb.1953.018.01.020
- Watson,J. and Crick,F. (1953b) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171, 737–738. doi.org/10.1038/171737a0
- WATSON,J.D. and CRICK,F.H. (1953c) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, 171, 964–967. doi.org/10.1038/171964b0

Implications de la structure de l'ADN

Dès 1953, Watson et Crick discutent de l'impact de leur modèle pour comprendre les mécanismes de réplication de l'information génétique.

- *Il n'a pas échappé à notre attention que l'appariement spécifique que nous avons postulé suggère immédiatement un mécanisme possible de copie pour le matériel génétique. (Watson & Crick, 1953b)*
- *Notre modèle d'acide désoxyribonucléique constitue en fait une paire de modèles, chacun étant complémentaire de l'autre. Nous imaginons qu'avant la duplication, les liaisons hydrogène sont rompues et que les deux chaînes se déroulent et se séparent. Chaque chaîne sert alors de modèle pour la formation, sur elle-même, d'une nouvelle chaîne complémentaire, de sorte qu'on obtient finalement deux paires de chaînes, alors que nous n'en avions qu'une auparavant. De plus, la séquence des paires de bases aura été dupliquée exactement. (Watson & Crick, 1953c)*

Watson,J. and Crick,F. (1953b) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171, 737–738. doi.org/10.1038/171737a0

GENETICAL IMPLICATIONS OF THE STRUCTURE OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID

By J. D. WATSON and F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge

THE importance of deoxyribonucleic acid (DNA) within living cells is undisputed. It is found in all dividing cells, largely if not entirely in the nucleus, where it is an essential constituent of the chromosomes. Many lines of evidence indicate that it is the carrier of a part of (if not all) the genetic specificity of the chromosomes and thus of the gene itself.

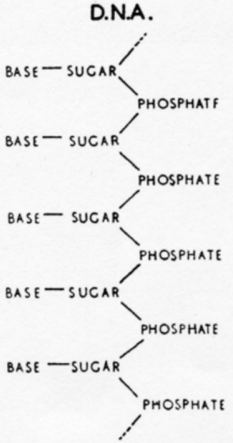


Fig. 1. Chemical formula of a single chain of deoxyribonucleic acid

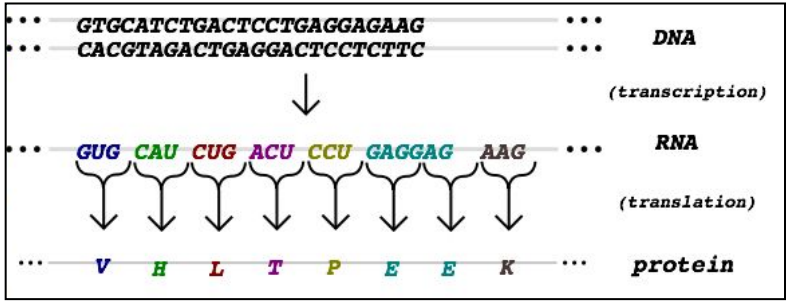
Fig. 2. This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis

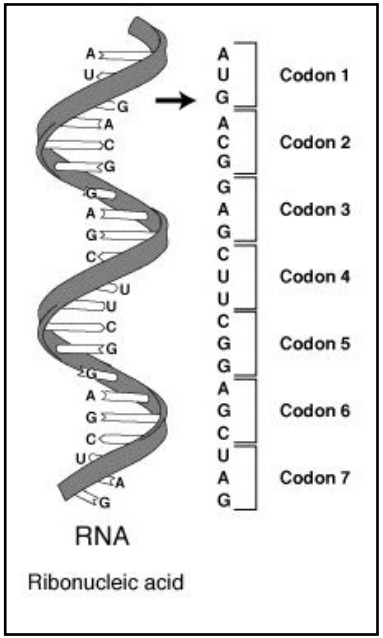
Reprinted by permission of Macmillan & Company, Ltd., from NATURE, 171, 964-969 (1953).

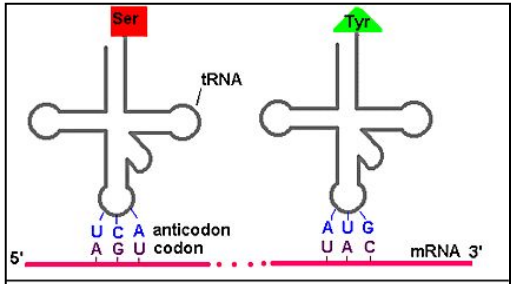
Le code génétique - Concepts de base

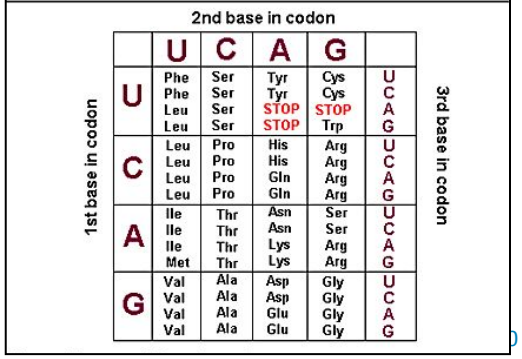
Bref rappel de concepts-clés vus lors des cours de biologie moléculaire

- Le **code génétique** a été élucidé en 1961.
- **Traduction:** les protéines sont synthétisées sur modèle de l'ARN.
- Contrairement à la transcription, il n'y a ***pas de correspondance de un à un*** entre nucléotides et acides aminés. En effet, l'ARN ne comporte que 4 nucléotides distincts (adénine, uracile, guanine et cytosine), tandis que les protéines sont formées de 20 acides aminés distincts.
- **Codons:** chaque acide aminé est spécifié par une succession de 3 nucléotides
- **Dégénérescence (redondance) du code:** Il y a 64 triplets de nucléotides possibles mais 20 acides aminés. ***Plusieurs codons spécifient le même acide aminé***.









Dégénérescence du code

GCA GCC GCG GCU	AGA AGG CGA CGC CGG CGU	GAC GAU	AAC AAU	UGC UGU	GAA GAG	CAA CAG	GGA GGC GGG GGU	CAC CAU	AUA AUC AUU	UUA UUG CUA CUC CUG CUU	AAA AAG	AUG	UUC UUU	CCA CCC CCG CCU	AGC AGU UCA UCC UCG UCU	ACA ACC ACG ACU	UGG	UAC UAU	GUA GUC GUG GUU	UAA UAG UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

Figure 7–24 **The nucleotide sequence of an mRNA is translated into the amino acid sequence of a protein via the genetic code.** All the three-nucleotide codons that specify a given amino acid are listed above that amino acid,

Le code est dit dégénéré (redondant) : plusieurs codons correspondent à un même acide aminé

Synonymie non-aléatoire: la synonymie n'est pas distribuée au hasard entre codons. La dégénérescence se manifeste essentiellement au niveau du troisième nucléotide de chaque codon.

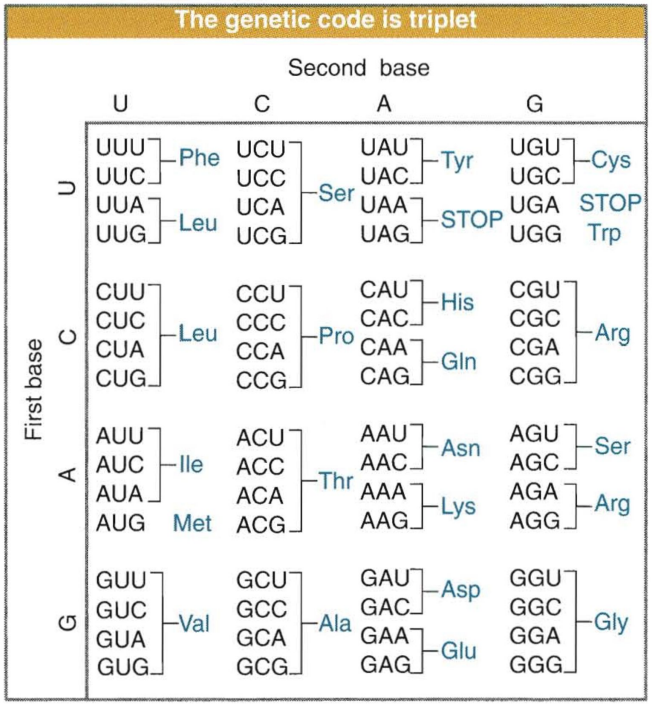


FIGURE 9.1 All the triplet codons have meaning: Sixty-one represent amino acids, and three cause termination (STOP).

Source: Genes IX

Le “dogme central”

- Le « dogme central » a été formulé en 1958 par Francis Crick. Je recommande également de lire cette discussion ultérieure (Crick, 1970).
- On le résume souvent de la façon suivante

  “DNA makes RNA makes protein”

  “L’ADN fait l’ARN fait la protéine”
- Cette phrase est très subtile (syntaxiquement et sémantiquement), mais souvent mal comprise. Le dogme ne se réduit pas à cette formule concise. Il énonce les transferts d’information qui sont possibles (schéma du haut) ou impossibles (schéma du bas) entre les séquences d’acides nucléiques et celles des protéines.
- Le “dogme” a souvent été critiqué par des gens qui n’avaient pas lu sa formulation exacte, en évoquant par exemple
  - La transcription réverse (“RNA makes DNA”)
  - Les modifications des prions (“protein changes protein”)
- La formulation de Crick est pourtant sans ambiguïté, et elle a conservé toute sa validité.
- Il ne s’agit pas d’un dogme mais d’une **théorie scientifique** rationnelle et logique. L’impossibilité de transfert de protéine à acide nucléique résulte directement de la dégénérescence du code.

Le dogme central *stipule que, une fois que l’ « information » est passée dans la protéine elle ne peut pas en ressortir.*
Plus précisément, le transfert d’information serait possible d’acide nucléique à acide nucléique, ou d’acide nucléique à protéine, mais le transfert de protéine à protéine, ou de protéine à acide nucléique est impossible. Information signifie ici la détermination précise de la séquence, soit des bases dans l’acide nucléique, soit des résidus aminoacides dans la protéine.
Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. Symp Soc Exp Biol 12, 138-63.

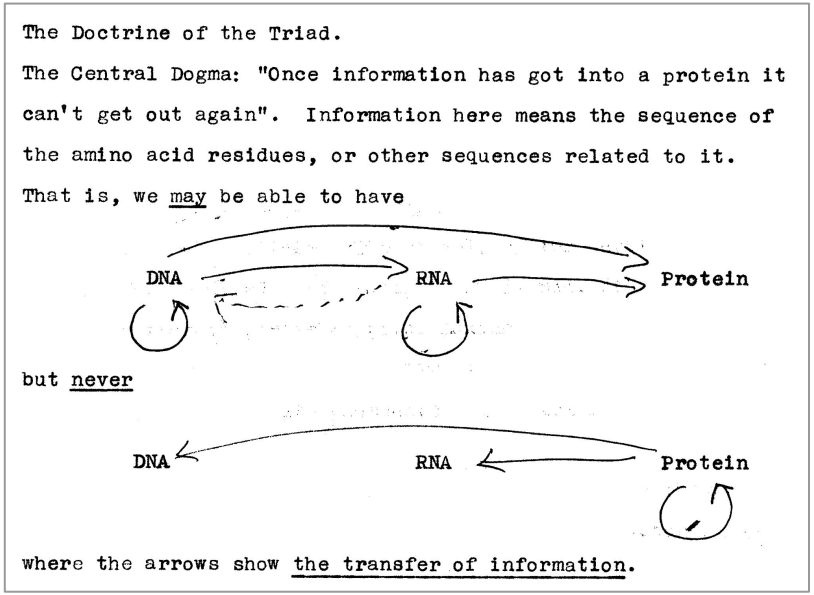


Schéma de 1956, préfigurant la publication du dogme central

Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. Symp Soc Exp Biol 12, 138-63.
Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. Nature 227, 561-3.

Le dogme central a-t-il été réfuté ?

On a à plusieurs reprise affirmé que le dogme central avait été réfuté :

- découverte de la transcription réverse.
- découverte du prion.

En 1970 Crick publie une clarification, pour rappeler ce que dit le dogme central, et explique pourquoi la réverse transcription ne le réfute pas.

Il distingue 3 classes de transfert d'information.

- Transferts pour lesquels on dispose d'indications directes ou indirectes (flèches pleines) : DNA → DNA, DNA → RNA, RNA → Protein, RNA → RNA.
- Possibles mais sans aucune indication d'existence (pointillés) : RNA → DNA, DNA → Protein.
- Très invraisemblables : Protein → Protein, Protein → DNA, protein → RNA.

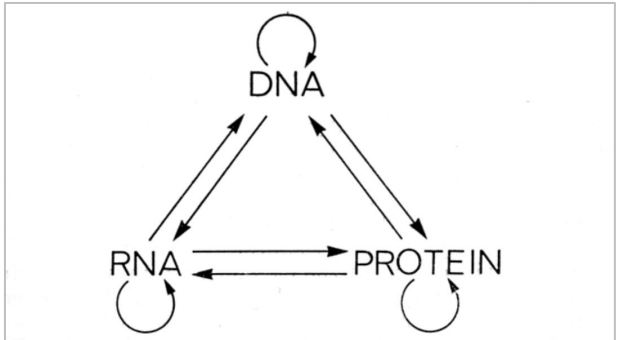


Fig. 1. The arrows show all the possible simple transfers between the three families of polymers. They represent the directional flow of detailed sequence information.

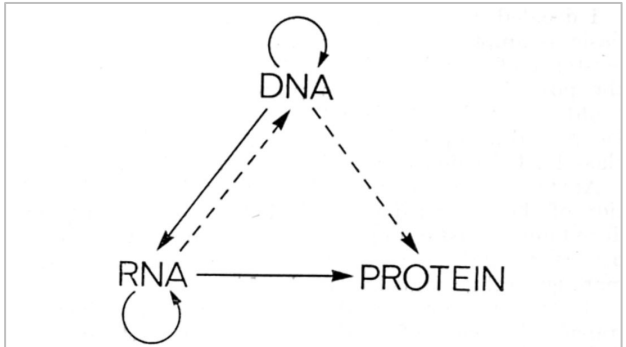


Fig. 2. The arrows show the situation as it seemed in 1958. Solid arrows represent probable transfers, dotted arrows possible transfers. The absent arrows (compare Fig. 1) represent the impossible transfers postulated by the central dogma. They are the three possible arrows starting from protein.

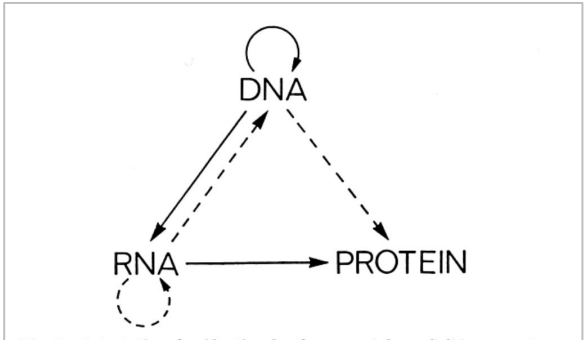
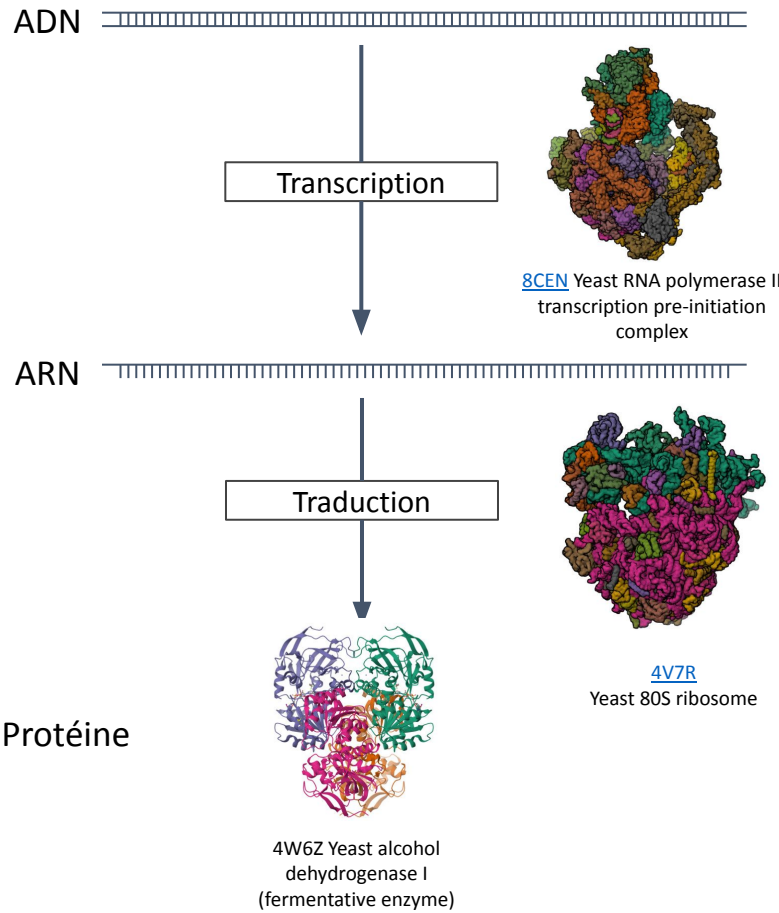


Fig. 3. A tentative classification for the present day. Solid arrows show general transfers; dotted arrows show special transfers. Again, the absent arrows are the undetected transfers specified by the central dogma.

Structure d’un gène

Le cas simple : l'ADN fait l'ARN fait la protéine

- Le modèle de base (et un peu trop simpliste) de l'expression des gènes repose sur une relation simple
  - **Transcription :** synthèse d'une molécule d'ARN sur modèle, à partir d'une région de l'ADN
  - **Traduction :** synthèse d'un polypeptide à partir de l'ARN messager (mRNA)

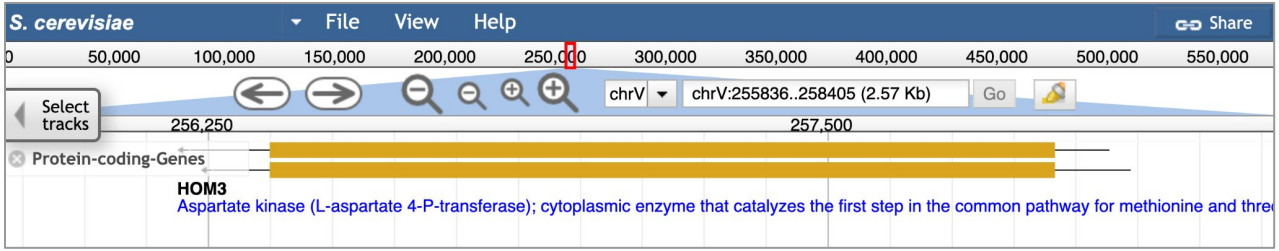


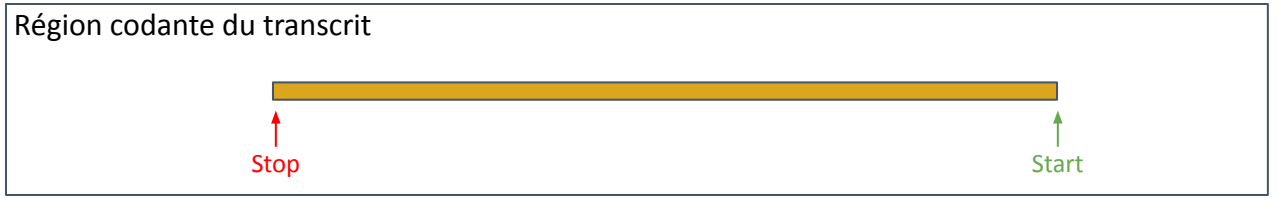
Transcripts alternatifs

Le navigateur de génomes yeastgenomes.org permet de visualiser des régions génomiques et leurs annotations (indication de tous les éléments qu'on y détecte).

Le gène **HOM3** code pour l'enzyme **aspartate kinase**, qui catalyse la première étape de la biosynthèse de l'homosérine.

- La ligne noire (partiellement marquée par la boîte ocre) indique l'étendue du transcrit.
- La flèche indique le sens de la transcription.
- Pour ce gène, il existe deux transcrits alternatifs, qui diffèrent par le site d'initiation de la transcription (Transcription Start Site, **TSS**) et par le site de terminaison (Transcription Termination Site, **TTS**)
- Le rectangle ocre indique la **région codante**, qui s'étend du **codon start** au **codon stop**.





https://jbrowse.yeastgenome.org/?loc=chrV%3A255836..258405&tracks=Protein-Coding-Genes%2CNon-coding-RNA-Genes

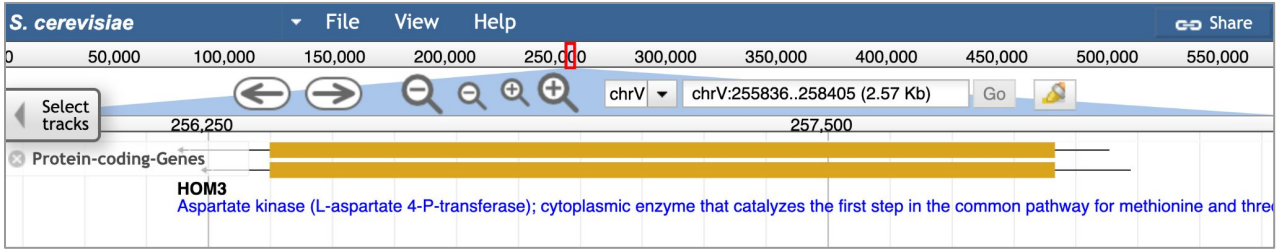
Disposition des gènes dans une région génomique de levure

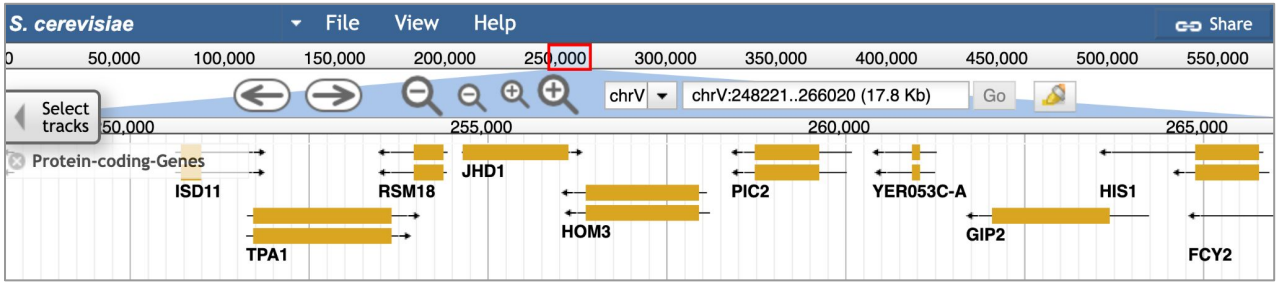
En dézoomant, on peut observer la disposition des gènes dans la région génomique avoisinante.

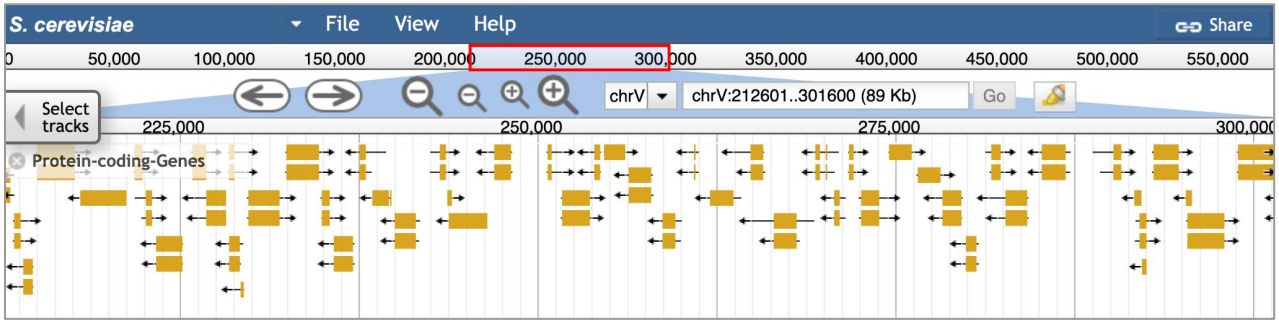
Orientation : sur l'un ou l'autre brin, sans logique apparente.

Notation des brins

- + = D (direct) = W (Watson)
- - = R (réverse) = C (Crick)





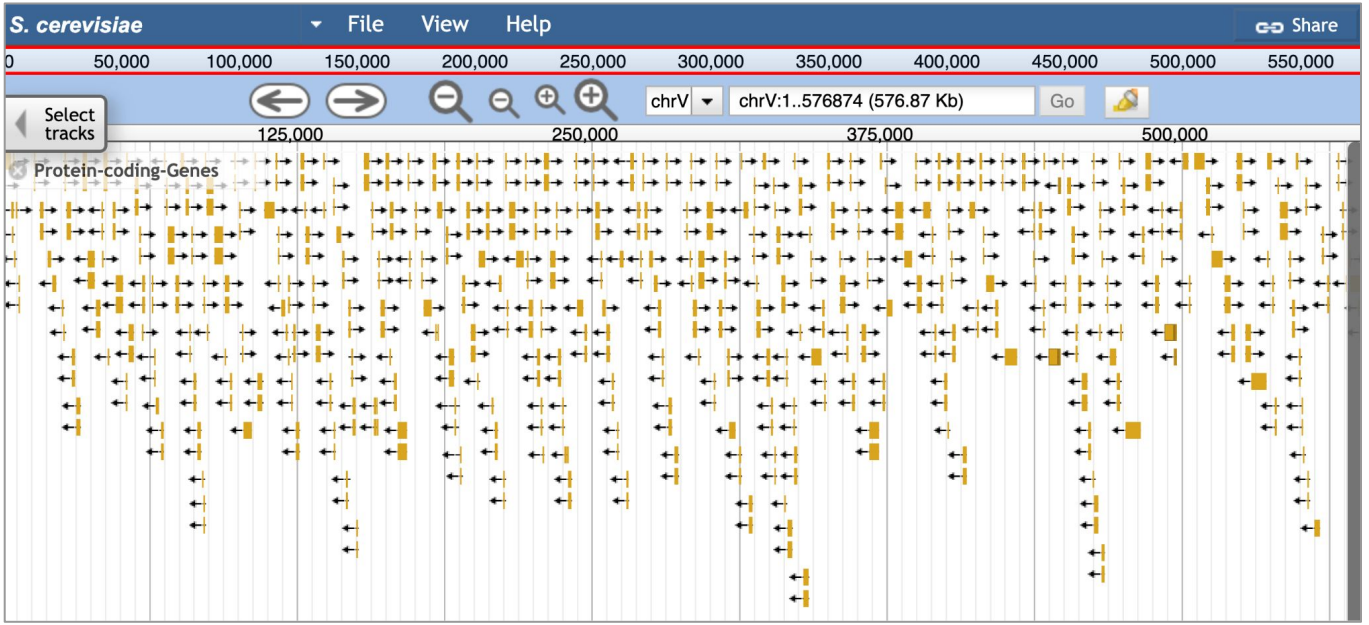


https://jbrowse.yeastgenome.org/?loc=chrV%3A255836..258405&tracks=Protein-Coding-Genes%2CNon-coding-RNA-Genes
https://jbrowse.yeastgenome.org/?loc=chrV%3A248221..266020&tracks=Protein-Coding-Genes%2CNon-coding-RNA-Genes
https://jbrowse.yeastgenome.org/?loc=chrV%3A212601..301600&tracks=Protein-Coding-Genes%2CNon-coding-RNA-Genes

Disposition des gènes sur un chromosome de levure

On voit ici la disposition des gènes codants sur l'ensemble du cinquième chromosome (chrV) de levure.

- Longueur totale du chromosome : 576 874 bases.
- Nombre de gènes codants: 289
- Densité moyenne : 1 gène / 2kb



Les gènes non-codants

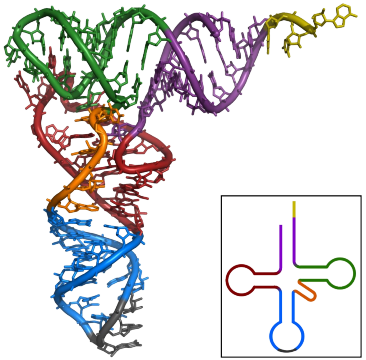
Eviter l'erreur fréquente qui consiste à ne prendre en considération que les gènes codants.

Les ARN ne font pas que servir de modèle à la synthèse des protéines.

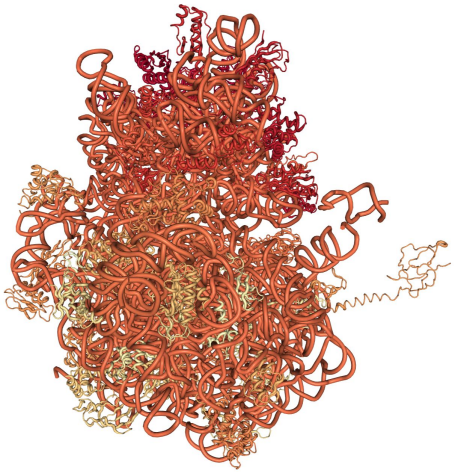
Il existe des gènes qui sont transcrits mais pas traduits.

- tRNA : ARN de transfert
- rRNA : ANR ribosomique
  - Le ribosome est un assemblage complexe d'ARN et de protéines
- lncRNA : long non-coding RNA (lncRNA)
- microRNA : petits ARN impliqués dans la régulation de l'expression des gènes

tRNA



Ribosome



PDB 4V6C. Crystal structure of the *E. coli* 70S ribosome in an intermediate state of ratcheting

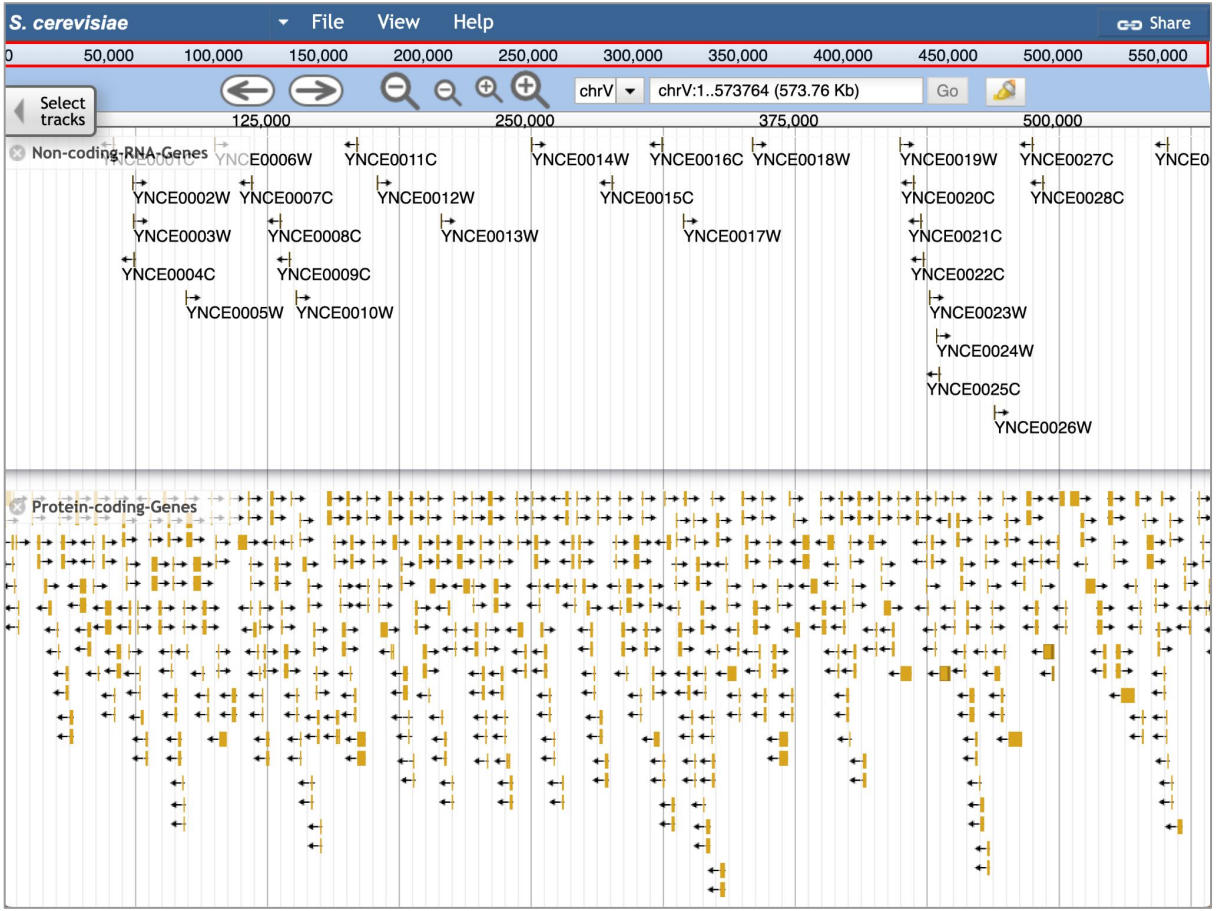
Les gènes non-codants

Le navigateur de génomes permet de sélectionner différentes **pistes d'annotation** (**annotation tracks**).

Le chromosome V de la levure inclut 28 gènes non-codants (haut de la figure).

Ces gènes sont transcrits, et produisent des ARN non codants avec différentes fonctions:

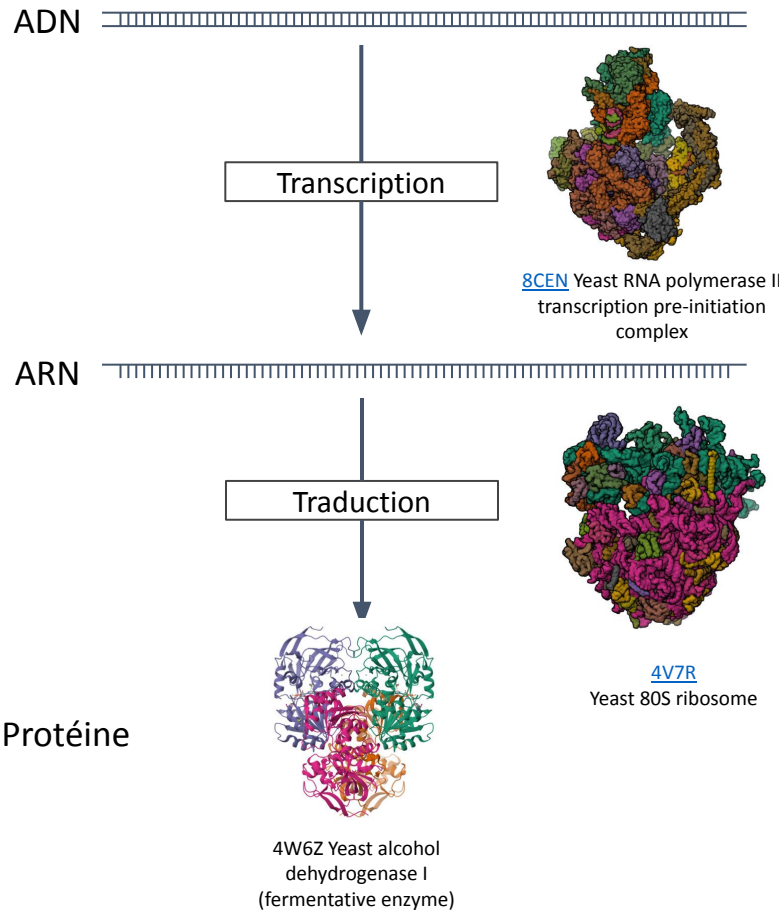
- ARN de transfert (**tRNA**), 20 gènes sur le chromosome V
- snRNA: small nuclear RNA
- régulation d'autres gènes



https://jbrowse.yeastgenome.org/?loc=chrV%3A1..573764&tracks=Non-coding-RNA-Genes%2CProtein-Coding-Genes

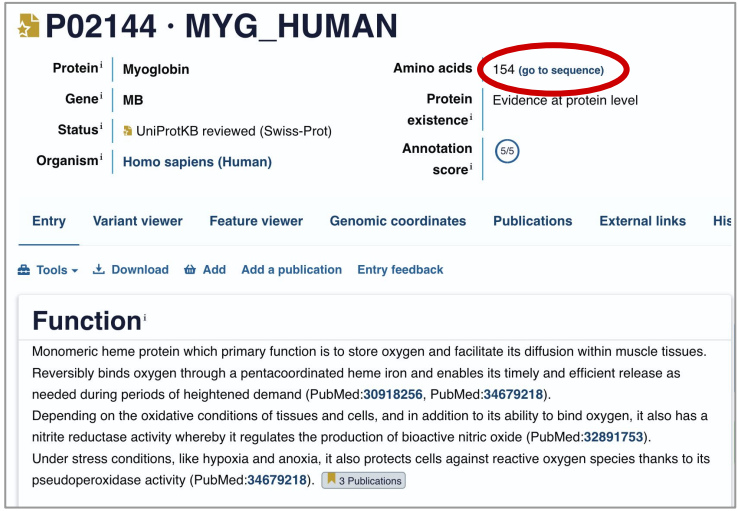
Revenons au cas simple : l'ADN fait l'ARN fait la protéine

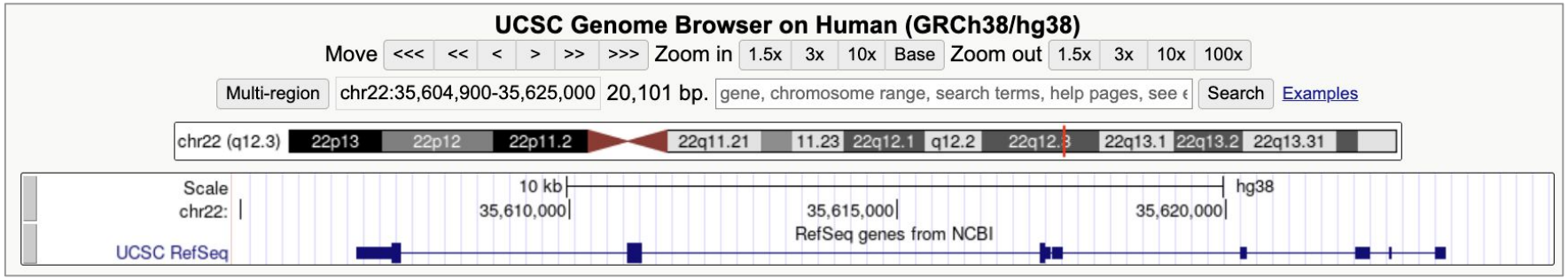
- Revenons au modèle de base (un peu trop simpliste)
  - **Transcription :** synthèse d'une molécule d'ARN sur modèle, à partir d'une région de l'ADN
  - **Traduction :** synthèse d'un polypeptide à partir de l'ARN messager (mRNA)



Pas si simple : l'ADN fait l'ARN primaire fait l'ARN mature fait la protéine

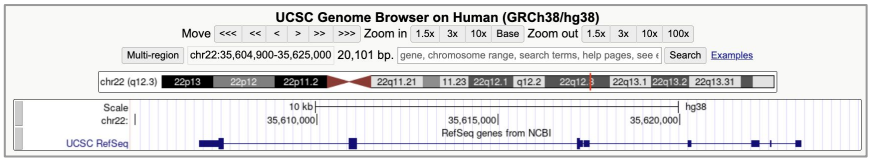
- D'après Uniprot, la myoglobine compte 154 acides aminés (Uniprot MYG_HUMAN).
- En principe il suffirait donc d'un ARN de 154 codons = 154 x 3 = 459 nucléotides pour fournir l'information nécessaire à la traduction.
- Cependant, le UCSC genome browser indique que le gène occupe ~17kb (piste **UCSC RefSeq**)
  - Comment expliquer la différence ?
  - Comment lire et interpréter les informations du navigateur de génome ?

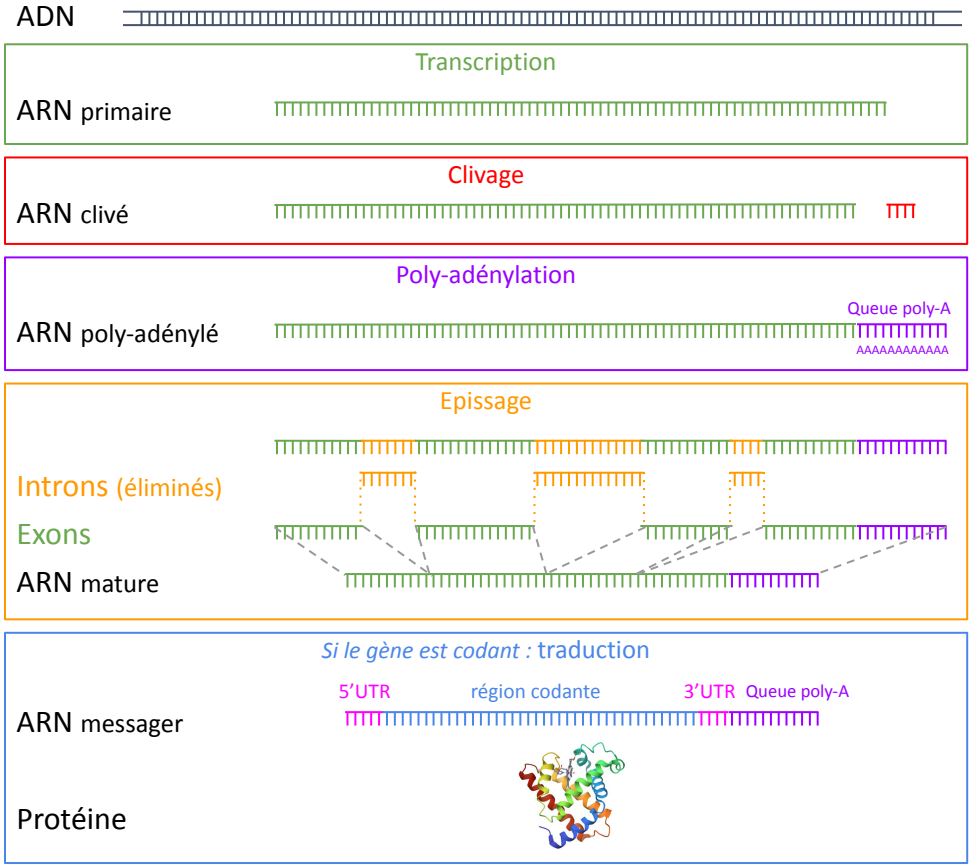




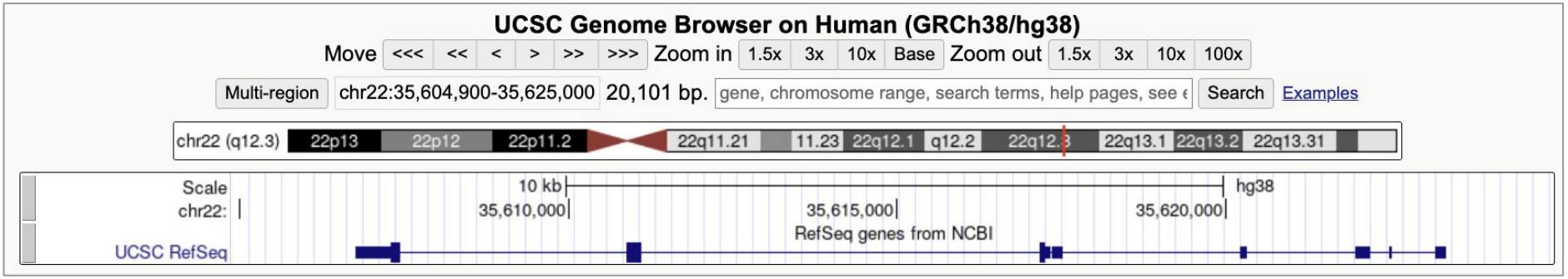
Pas si simple : l'ADN fait l'ARN primaire fait l'ARN mature fait la protéine

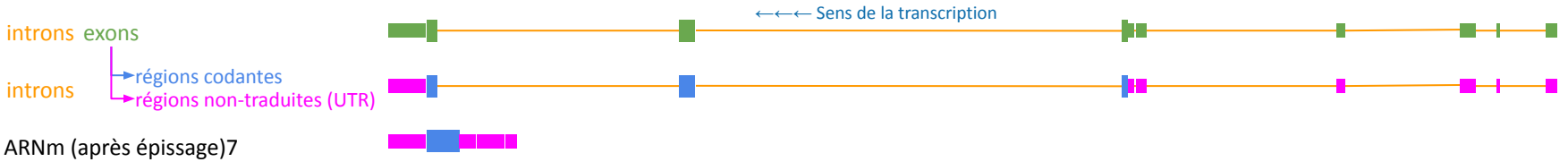
- Schéma adapté en incluant la **maturation de l'ARN**
- **Transcription :** synthèse d'une molécule d'ARN sur modèle, à partir d'une région de l'ADN.
  - Sites alternatifs d'initiation et de terminaison → transcrits multiples pour un gène
- **CLivage et poly-adénylation :** dans la région 3', l'ARN primaire est clivé (coupé), et une queue poly-A y est ajoutée (stabilisation de l'ARN). Cette queue polyA stabilise l'ARN.
- **Epissage :** élimination de certains segments de l'ARN ("introns") et raboutage des autres segments ("exons").
  - Sites alternatifs d'épissage → transcrits multiples pour un gène
- **Traduction :** synthèse d'un polypeptide à partir de **la** partie codante de l'ARN messager (mRNA).
- Note: les régions non traduites (untranslated regions, UTR) aux extrémités 5' et 3' de l'ARNm jouent un rôle dans la stabilité de l'ARN et dans la régulation de la traduction.



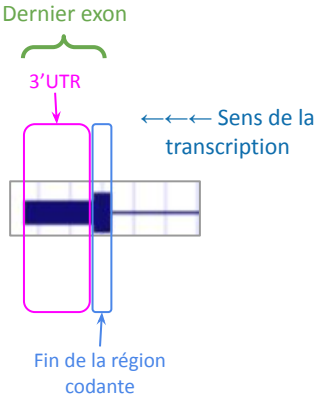


Pas si simple : l'ADN fait l'ARN primaire fait l'ARN mature fait la protéine





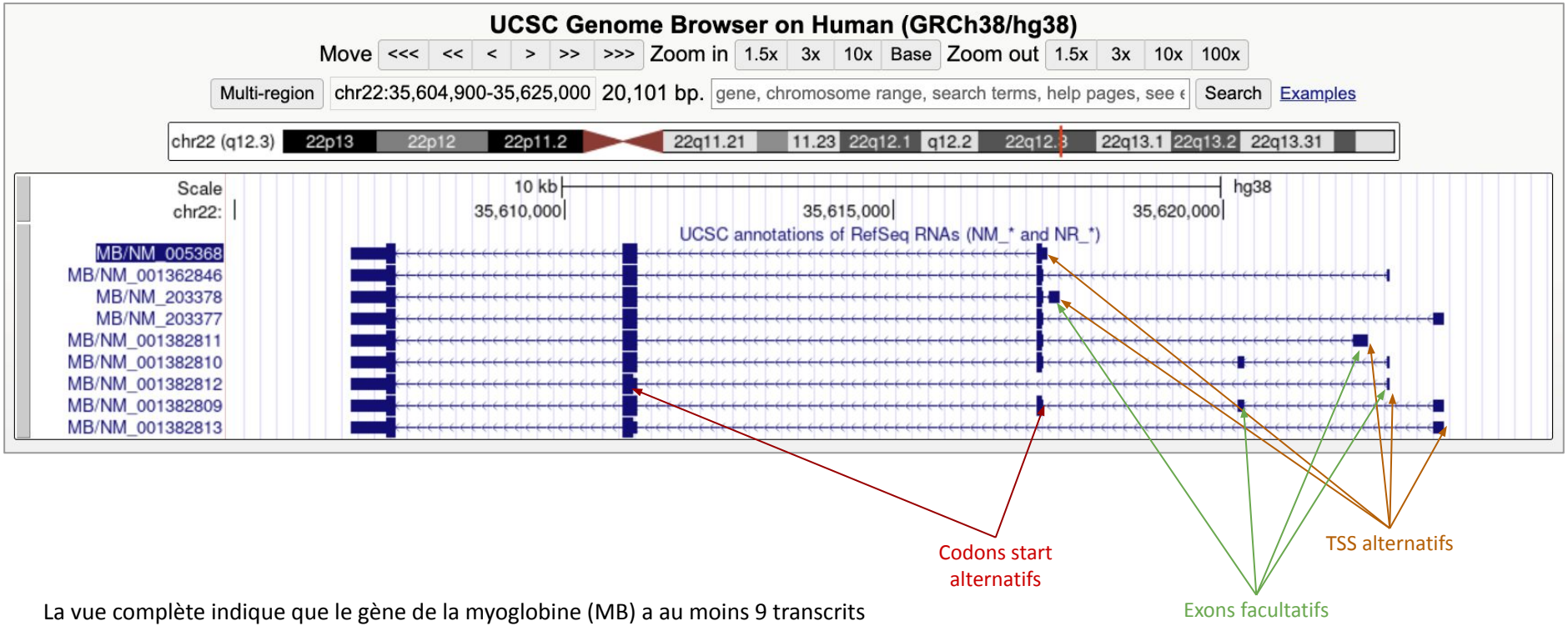
Cette figure montre la représentation "dense" du gène MB, codant pour la myoglobine (vue complète diapo suivante). Nous avons recoloré le schéma pour indiquer les différents types de régions géniques.



Remarques

- Ce gène est transcrit sur le brin réverse (de droite à gauche)
- Le dernier exon (le plus à gauche) inclut la fin de la région codante suivie du 3' UTR
- Le 5' UTR s'étend sur plusieurs exons (les 5 exons les plus à droite + la moitié du 6ème)
- L'ARN messager est beaucoup plus petit que le transcrit primaire
- La partie codante de cet ARNm couvre moins de la moitié de sa longueur

Pas si simple : transcrits alternatifs



La vue complète indique que le gène de la myoglobine (MB) a au moins 9 transcrits alternatifs.

- TSS alternatifs (sites d'initiation de la transcription, transcription start sites)
- Exons facultatifs (présents dans certains échantillons, absents dans d'autres)
- Codons start alternatifs

Le transcrit du haut est majoritaire.

Transcription et traduction simultanées chez les bactéries

- Chez les eucaryotes, la transcription et la traduction se font séparément: dans le noyau pour la traduction, et dans le cytoplasme pour la traduction.
- Chez les prokaryotes, la transcription et la traduction se passent au même endroit, et simultanément.
- Figure: photo en microscopie électronique d'un morceau de génome bactérien (DNA) avec
  - plusieurs sites de transcription active (RNA),
  - sur chaque ARN, plusieurs sites de traduction active (ribosomes)

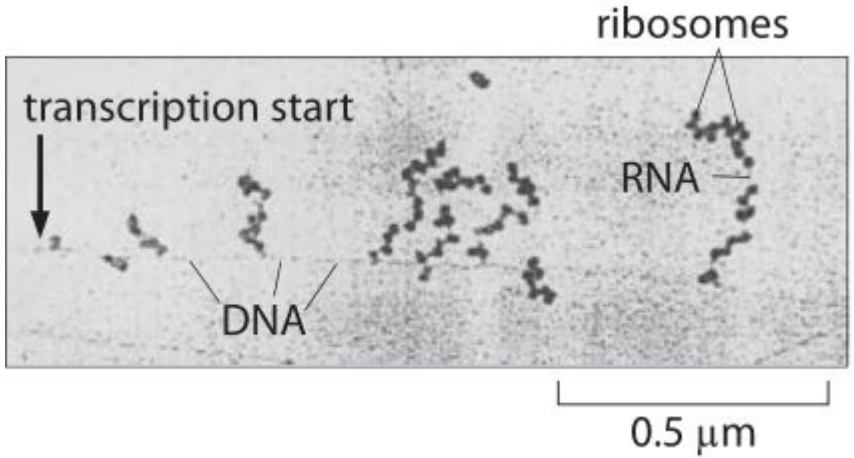
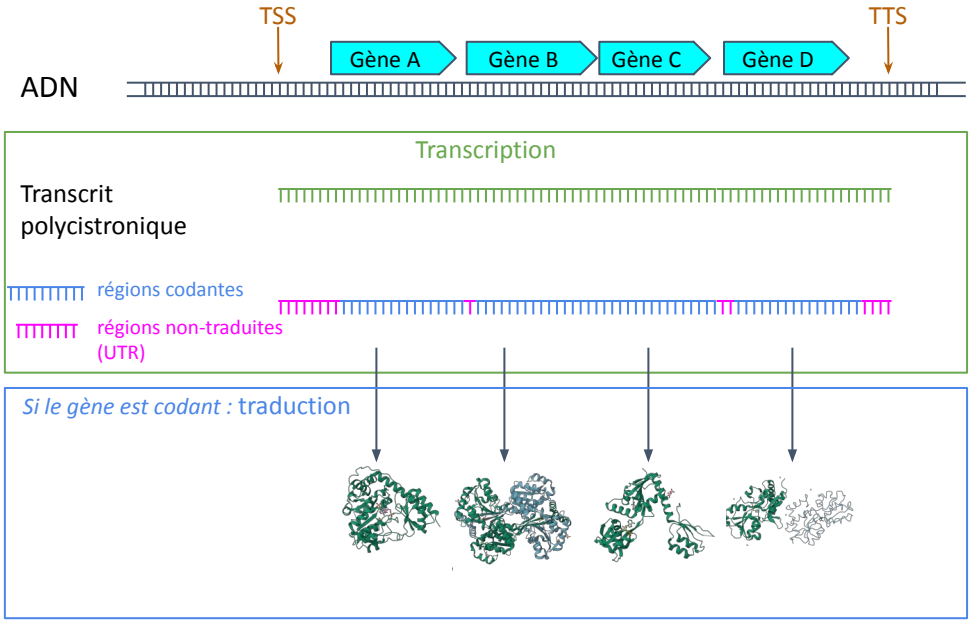


Figure extraite de la page Web "What is faster, transcription or translation?"
https://book.bionumbers.org/what-is-faster-transcription-or-translation/

Génomes bactériens – Opéron

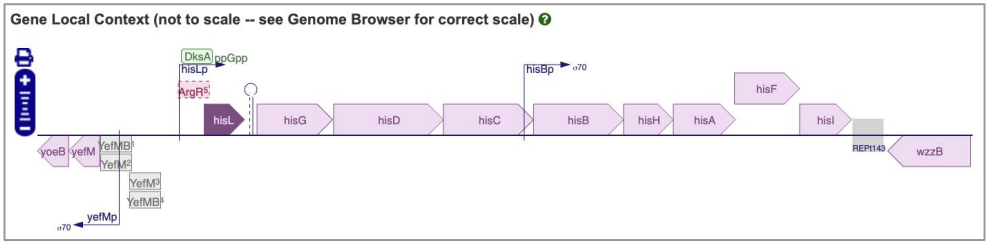
- Chez les prokaryotes, une unité de transcription peut couvrir un ou plusieurs gènes.
- **Opéron**: transcrit incluant plusieurs gènes

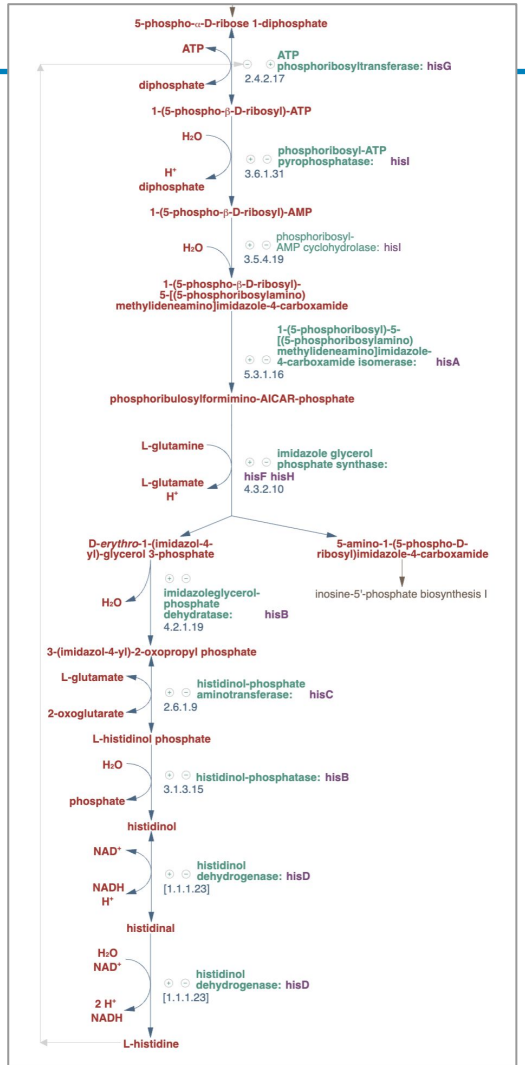


Exemple: l'opéron histidine d'*Escherichia coli*

Figure ci-dessous : structure de l'opéron histidine d'*Escherichia coli* extraite de la base de connaissances EcoCyc (ecocyc.org).

Figure de droite: voie métabolique de biosynthèse de la L-histidine





- Ecocyc histidine operon: ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG11269#TU

Exemple: l'opéron histidine d'*Escherichia coli*

Figure du haut: structure d'un opéron d'*Escherichia coli* extraite de la base de connaissances EcoCyc (ecocyc.org).

Figure du bas: localisation (mapping) des fragments de lecture d'ARN (RNA-seq transcriptomique) dans la région génomique correspondante.

- La hauteur des profils est proportionnelle au nombre de fragments de lecture localisés à chaque position.
- La couleur et l'orientation verticale indiquent le brin de lecture direct (vert, haut) ou réverse (violet, bas).
- On note un continuum de lectures sur toute la longueur de l'opéron (avec des disparités quantitatives).
- Noter aussi le gène b3207 (yrbL), transcrit séparément.

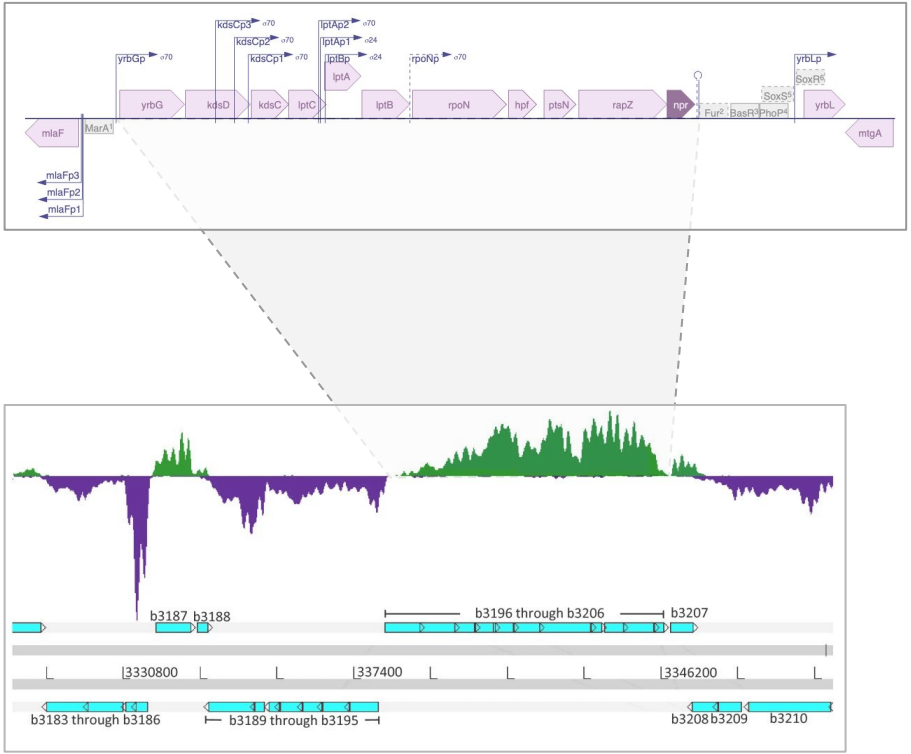


Figure de Giannoukos et al. (2012). doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-r23

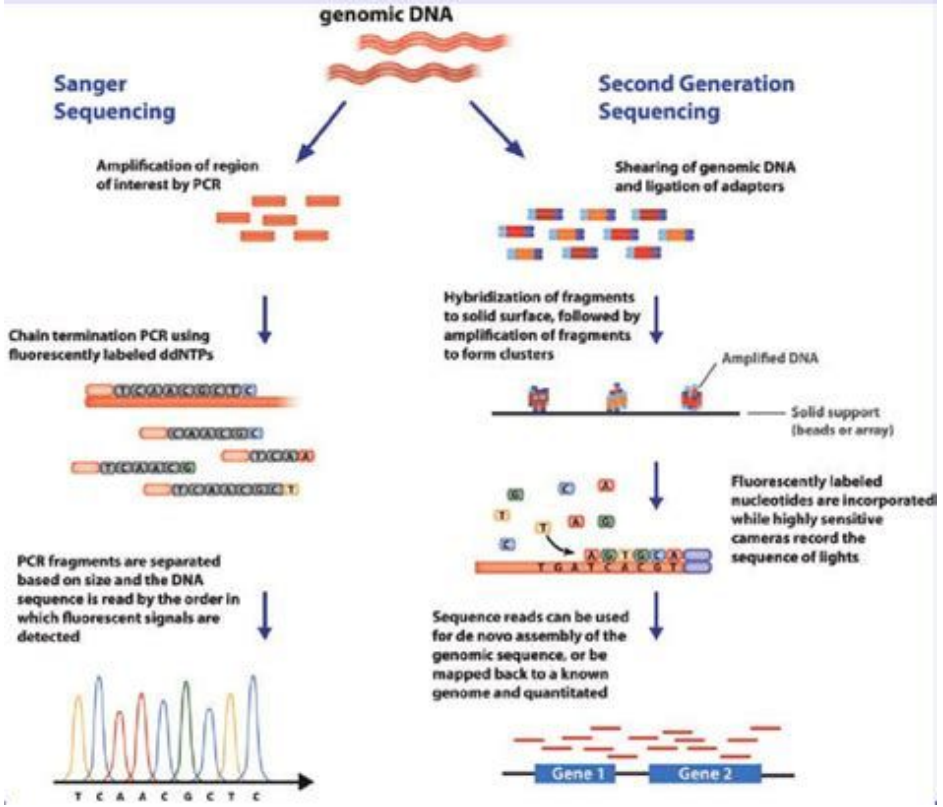
- Vert: régions transcrites sur le brin positif
- Violet: régions transcrites sur le brin négatif
- Cyan: gènes (la flèche indique l'orientation)
- "b#### à b####" : identifiants des gènes délimitant un opéron

- Ecocyc : https://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG12147#TU
- Giannoukos, G. et al. Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. Genome Biol 13, r23 (2012). doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-r23

Disponibilité des génomes

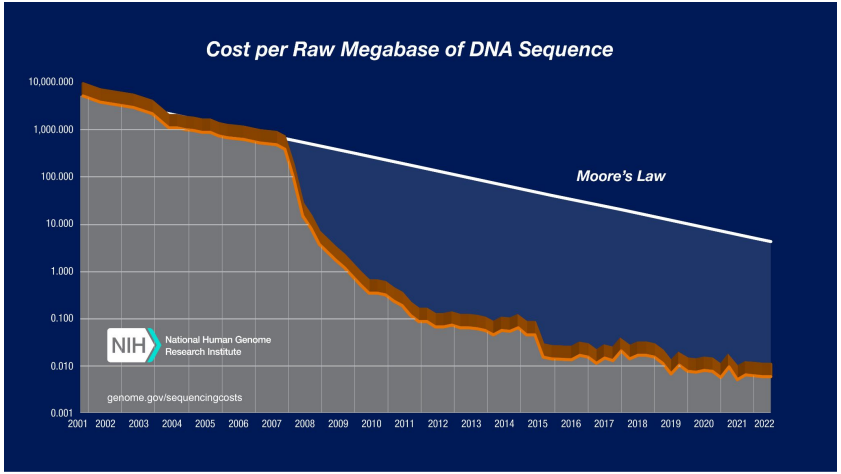
Séquençage massivement parallèle

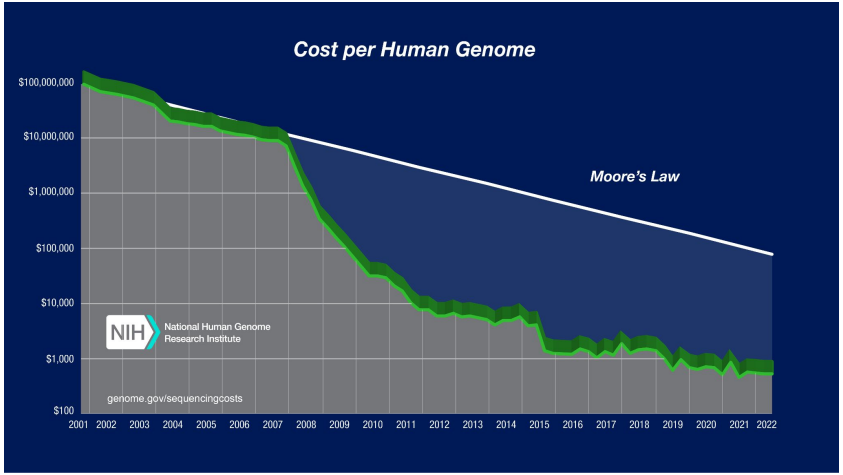
- De 1977 à 2007, la méthode de Sanger était la seule façon de séquencer l'ADN (partie gauche de la figure)
- Durant les annéeds 1990-2000, cette méthode a été utilisée pour les premiers projets de séquençage génomique, qui ont suscité des améliorations techniques (robotisation, informatisation)
- En 2007, plusieurs compagnies proposent une stratégie radicalement différente: le ***séquençage massivement parallèle***.
- Cette approche produit des millions de petits fragments de séquences (typiquement 36 à 300bp), qu'il faut ensuite analyser, avec différentes approches possibles
  - Localisation sur un génome de référence s'il existe
  - Assemblage de novo s'il n'y a pas de génome de référence



Du gène au génome

- 1990-2000 : premiers projets de séquençage du génome d'organismes modèles: bactéries, levure du boulanger, drosophile, nématode, arabette, et … "le" génome humain
- 2001 : première publication d'un génome humain
- 2007 : technologies de séquençage massivement parallèle ("Next Generation Sequencing", NGS)
  - De 2001 à 2007: les coûts diminuent en suivant la loi de Moore (décroissance exponentielle)
  - 2008; diminution brutale des coûts du séquençage
  - Depuis 2011: réduction plus modérée des coûts

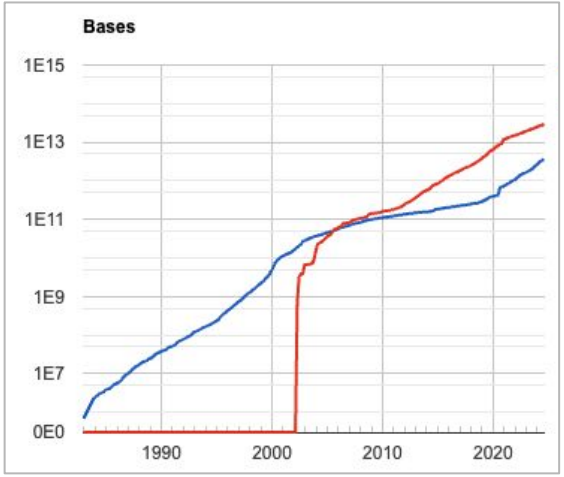


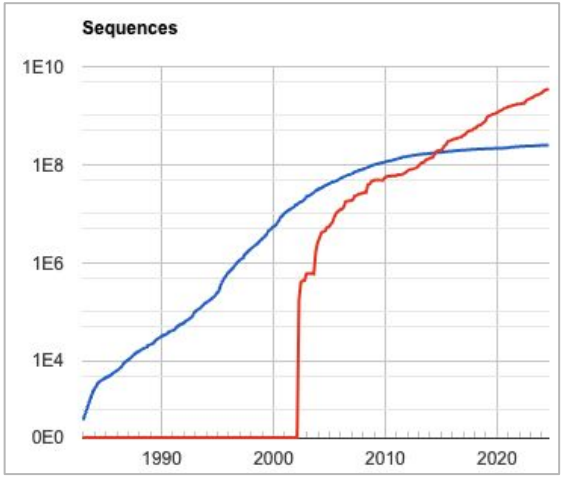


Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) Available at: www.genome.gov/sequencingcostsdata. Accessed 2024-09-04.
https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data

Disponibilité des séquences d'ADN

- Les séquences de macromolécules qui font l'objet de publications scientifiques sont systématiquement déposées dans des entrepôts de données internationaux, et rendues accessibles au public
  - Une exception: les séquences génomiques associées à des échantillons humains (voir cours sur la médecine génomique)
- Le nombre de séquences disponibles depuis 1980 montre une croissance exponentielle (linéaire sur un axe logarithmique).
  - Taux d'augmentation: de 1990 à 2020, x 1.48/an
- Avant 2002, il s'agissait de séquences individuelles de gènes ou de fragments génomiques (courbe bleue, Genbank).
- A partir de 2002, le séquençage de génomes complets prend le pas (courbe rouge).





Séquençage génomique complet

Genbank

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/

Disponibilité des génomes

- Avant les années 1990, le séquençage de l'ADN représentait un travail important. Un doctorant pouvait passer une partie significative de sa thèse à séquencer quelques kilobases afin de caractériser un seul gène.
- Les « projets génomes » ont stimulé le développement de méthodes de séquençage automatique, qui ont suscité des progrès technologiques impressionnants.
- Nous disposons aujourd'hui (septembre 2024) de plusieurs centaines de milliers de génomes complètement séquencés, en libre accès.

Remarques

- Le degré de finition de ces génomes varie d'un groupe à l'autre
- Un grand nombre de génomes additionnels ont été séquencés par des compagnies, et ne sont pas accessibles au public.

Génomes complets disponibles au NCBI

Date 31/07/2024

Source https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/

Nombre	Groupe
367 675	Bactéries
14 975	Virus
2 171	Archées
588	Fungi (levures, champignons)
404	Métazoaires – Invertébrés
399	Métazoaires – Autres vertébrés
220	Métazoaires – Mammifères
171	Plantes
83	Protozoaires
386 686	**Total**

Composition et organisation des génomes

De la génomique à la génomique fonctionnelle

Le séquençage ne constitue qu'une toute première étape pour l'analyse des génomes.

Au terme d'un projet de séquençage, on obtient un "texte" formé des 4 lettres A, C, G, T (une par nucléotide), et il reste un énorme travail de décryptage pour pouvoir interpréter ce texte.

L'exemple ci-dessous montre un fragment de 1000 nucléotides du génome humain.

```
....CGATGCTCAAACATTTCAATTTTTTAGGTCAAAAATGCCTTAGGTTTAGCACAGCAATGTAGGTGCCAAACTC
ATCGCAGTGAATTGCAGGCGGGAGCAACAAGGACGCCTGCCTCCTTTCTGCCTGCTTTTTGCAATAGTCCGATTTGA
GAAGGGGACCCACGAGAGACACAAAATGCACGCCCCCACGCCACATCCTTTTTACCCCGCAATGGGTTAAGACTGTC
AACAGGCAGGCCACCTCGCAGCGTCCGCGGAGTTGCAGGCCCGCCCCCGCCAGGGTGTGGCGCTGTCCCCCTGGCGC
TGGGCGGGGGAGGAGGGGCGCGCGGCGGCCGAGGAGGGGCGCGCGGCGGCCGGGCGGGGCGAGCGGAGGCGAGTGGA
GGACGCGTAGACGCGCCGCGGTCCCCGCCTGCCGCTGCTCCGCCGCAGTCGCCGCTCCAGTCTATCCGGCACTAGGA
ACAGCCCCGAGCGGCGAGACGGTCCCCGCCATGTCTGCGGCCATGAGGGAGAGGTTCGACCGGTTCCTGCACGAGAA
GAACTGCATGACTGACCTTCTGGCCAAGCTCGAGGCCAAAACCGGCGTGAACAGGAGCTTCATCGCTCTTGGTGGGT
GGCCGGGGGTCGCCGCCGCTGGTAGGGCCACGGGAGCCGCCGCTGCCCCAGCTGCTGGGGAAGGAAGCAGGGAGAGG
ACTCGGGAAAGGTGGAGTCGGAGACAGACGGGACAAGCAGCATATTCAGGGATCAGGCTGGCCTCCCGGAAAGCGTG
GGCATCGGAGGACCCCGCGGGGGCTGCCCAGGCTGAGGGTCGCGGGGCTGGAGGGCAGCTGCGGCGCCGGGCGCTGG
CAGCTGGAAGGGCCAGCGCTGACGTATGTCTGCCCCGCGGCCCGGCGCCCTATTCCTGCTGTCCTGCGCGGTGGGCG
CGGACGGCGGGGCCCCTGCGGGCGGGCGCGTTGACGGAGGTACCCGGTCCTACCCGACCCTCCGTGGAGCTCCGCCC
GGAG....
```

Le génome complet comporte 3 milliards de nucléotides, 3 millions de fois plus grand.

Les premières questions qui se posent au terme du séquençage =

1. **Où sont localisés les gènes ?**
2. **Quelle est la fonction de ces gènes ?**

Drew Sheneman, New Jersey -- The Newark Star Ledger

Annotation des génomes : où sont les gènes ?

Méthodes mises à contribution pour localiser les gènes dans un génome

A partir de la séquence « brute » d'un génome comment prédire la position des gènes ?

- Présence de **phases ouverte de lecture** (**longues régions sans codon stop**) indiquent des régions vraisemblablement codantes.
- **Fréquences de codons** sont caractéristiques des régions codantes.
- Fréquences des oligonucléotides.
  - Par exemple, les fréquences d'hexanucléotides diffèrent entre régions codantes et non-codantes.
- Présence de **signaux**
  - Chez les procaryotes: juste avant une région codante, on trouve parfois un motif appelé « boîte de Shine-Delgarno » (AGGAGGU), qui favorise la liaison du ribosome à l'ARN
  - Chez les eucaryotes, on peut détecter des signaux d'épissage qui indiquent les débuts et fins des exons
- **Recherche de similarité** avec des gènes connus.
  - Comparaison d'une séquence génomique avec tout ce qui a été préalablement séquencé → détection de correspondances avec séquences déjà connues.
- **Génomique comparative :** comparaison entre génomes entiers
- **Transcriptome :** localisation ("mapping") de toutes les régions génomiques transcrites dans différents tissus

Cadres ouverts de lecture (open reading frame)

Une séquence nucléique (ADN ou ARN) peut être parcourue en avançant de triplet en triplet de nucléotide, selon trois **cadres de lecture**, ou **phases de lecture**, selon qu'on parte du premier, du deuxième ou du troisième nucléotide de la séquence.

Pour les séquences d'ADN, il y a donc 6 cadres de lecture (3 sur chaque brin).

Un **cadre de lecture ouvert** (**open reading frame**, ***ORF***) est un segment de séquence nucléique qui n'est pas interrompu par un **codon stop** (TAG, TGA ou TAA) dans une phase de lecture donnée, et est donc "ouvert" à la traduction (Sieber et al. 2018).

Quand on dispose d'un génome ou d'un fragment de génome, les séquences codantes (***coding sequences***, ***CDS***) peuvent être identifiées en cherchant le cadre ouvert de lecture le plus long à partir d'un **codon start** potentiel (ATG) et du prochain codon stop.

Difficultés

- Tous les codons ATG ne sont pas des codons start, il existe des méthionines internes aux protéines. On prend donc généralement en compte le plus long cadre de lecture (depuis le codon start le plus éloigné en amont du codon stop)
- Chez les eucaryotes, les introns n'ont pas forcément une longueur multiple de 3, une protéine peut donc combiner des cadres ouverts de lecture situés sur différentes phases de la séquence génomique.
- Il existe des codons start alternatifs (exemple, chez Escherichia coli, ATG=85%, GTG=7,6%, TTG=1.2%, …)

```
1. ATG CAA TGG GGA AAT GTT ACC AGG TCC GAA CTT ATT GAG GTA AGA CAG ATT TAA
2. A TGC AAT GGG GAA ATG TTA CCA GGT CCG AAC TTA TTG AGG TAA GAC AGA TTT AA
3. AT GCA ATG GGG AAA TGT TAC CAG GTC CGA ACT TAT TGA GGT AAG ACA GAT TTA A
```

Sieber, P., Platzer, M. & Schuster, S. The Definition of Open Reading Frame Revisited. Trends in Genetics 34, 167–170 (2018). https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.009

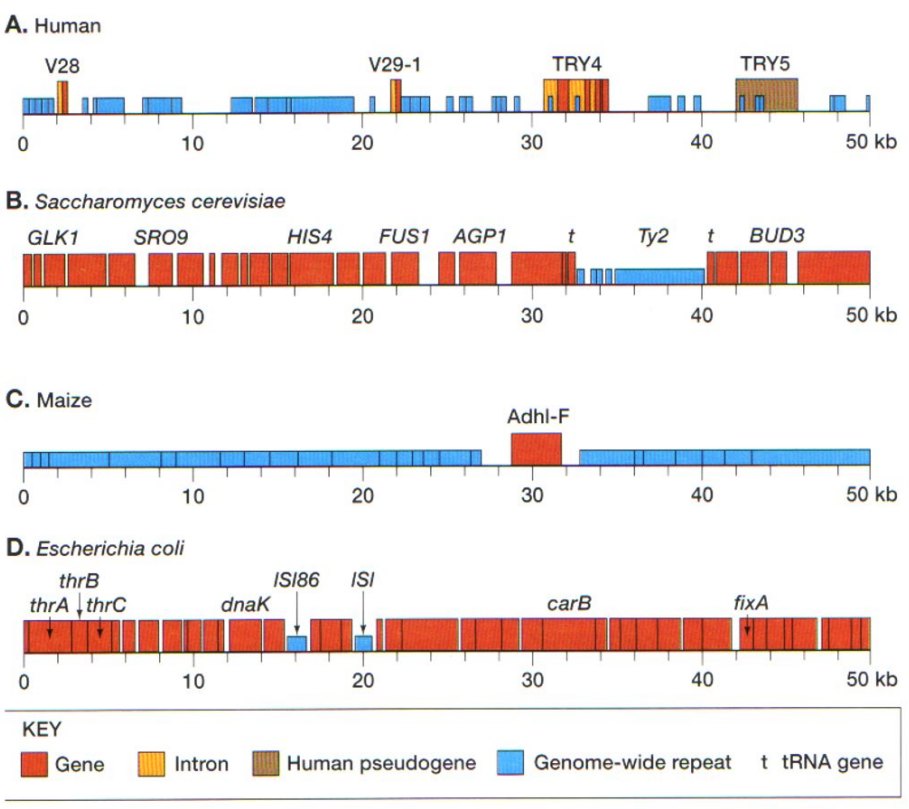
Taille et composition des génomes

Nom d'espèce	Nom commun	Année de publication	Taille du génome Mb	Nombre de gènes	Distance moyenne Kb	Fraction codante %	Fraction non-codante %	Fraction répétitive %	Fraction transcrite %
Bactérie									
Mycoplasma genitalium	*Mycoplasma*	1995	0,6	481	1,2	90	10		
Haemophilus influenzae		1995	1,8	1 717	1,0	86	14		
Escherichia coli	*Entérobactérie*	1997	4,6	4 289	1,1	87	13		
Levures									
Saccharomyces cerevisiae	*Levure du boulanger*	1996	12	6 286	1,9	72	28		
Animaux									
Caenorhabditis elegans	*Ver nématode*	1998	97	19 000	5	27	73		
Drosophila melanogaster	*Mouche à vinaigre*	2000	165	16 000	10	15	85		
Ciona intestinalia			174	14 180	12				
Danio rerio	*Poisson zèbre*		1 527	18 957	81				
Xenopus laevis	*Xénope (amphibien)*		1 511	18 023	84				
Gallus gallus	*Poule*		2 961	16 736	177				
Ortnithorynchus anatinus	*Ornithorynque*		1 918	17 951	107				
Mus musculus	*Souris*	2002	3 421	23 493	146				
Pan troglodytes	*Chimpanzé*		2 929	20 829	141				
Homo sapiens	*Humain*	2001	3 200	21 528	149	2	98	46	28
Plantes									
Arabidiopsis thaliana	*Arabette*	2001	120	27 000	4	30	70		
Oryza sativa	*Riz*		390	37 544	10				
Zea mais	*Maïs*		2 500	50 000	50			50	
Triticum aestivum	*Blé*		16 000						
Lilium	*Lys*		120 000						
Psilotum nudum			250 000						

Structuration des génomes

La structure des génomes dépend fortement du groupe taxonomique

- Bactéries (Escherichia coli)
  - génomes compacts
  - majorité codante
  - Organisation en opérons
- Levures (*Saccharomyces cerevisiae)*
  - Régulation séparée pour chaque gène
  - Exons / introns occasionnels ou fréquents selon espèce
- Métazoaires – animaux pluricellulaires (ex: humain)
  - Majorité non codante
  - Éléments répétitifs
  - Structure complexe des gènes (exons / exons, éléments de régulation)
- Plantes (ex: maïs)
  - Même type de complexité que chez les métazoaires



Mount, D. W. Bioinformatics: sequence and genome analysis. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004). ISBN: 978-0-87969-687-0

Annotations fonctionnelles : que font les gènes ?

Assignation de fonction par similarité de séquences

Alignements globaux (Needleman-Wunsch) versus locaux (Smith-Waterman)

- Alignement global
  - +Approprié, par exemple, pour les protéines homologues qui sont conservées sur toute leur longueur.
  - L'alignement final inclut obligatoirement les deux séquences complètes.

```
LQGPSKTGKGS-SRSWDN
|----|-|||---|--|-
LN-ITKAGKGAIMRLGDA
```

  - Algorithme: ***Needleman-Wunsch*** (1970).
  - Outil web EMBOSS : ***needle*** (nucleic acids (nucleic acids or proteins).
- Alignement local
  - Approprié, par exemple, pour les protéines qui partagent un domaine commun, restreint à un segment de chaque séquence.

```
LQGPSSKTGKGS-SSRIWDN
      |-|||
LN-ITKKAGKGAIMRLGDA
```

  - L'alignement final est restreint aux segments conservés.

```
KTGKG
|-|||
KAGKG
```

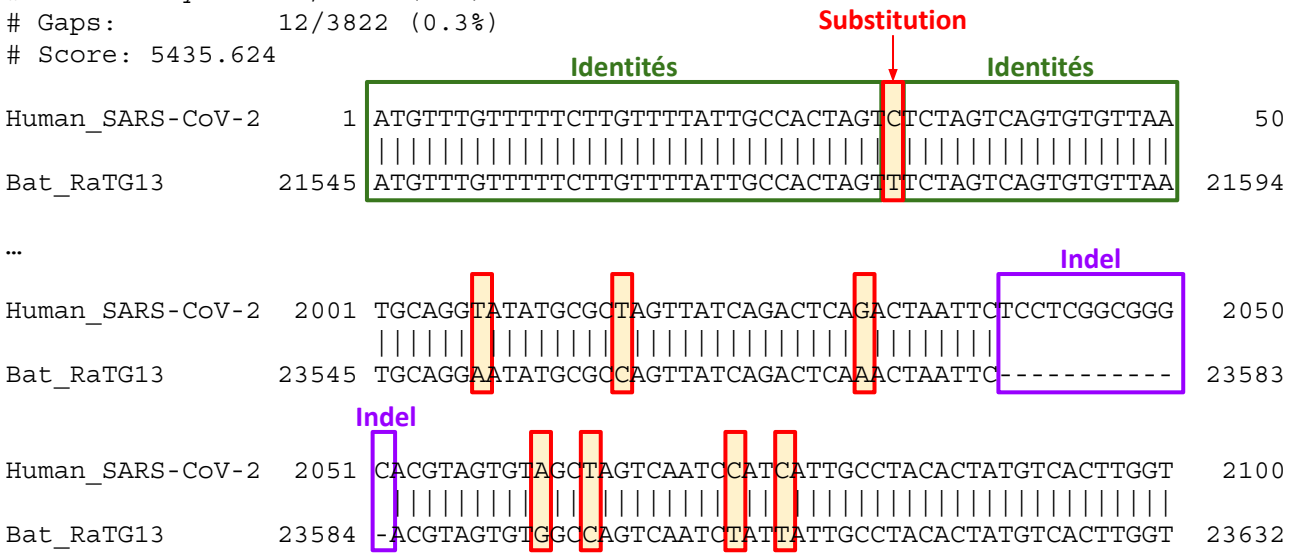
  - Algorithme: ***Smith-Waterman*** (1981).
  - Outil Web EMBOSS : ***water*** (nucleic acids(nucleic acids or proteins)

Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J Mol Biol 48, 443-53. doi.org/10.1016/0022-2836(70)90057-4

Smith, T. F. & Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. J Mol Biol 147, 195-7.

Alignement de séquences – Gènes S de SARS-CoV-2 et RaTG13

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: Human_SARS-CoV-2_BetaCoV/Wuhan/IPBCAMS-WH-01/2019
# 2: Bat_RaTG13
#
# Length: 3822
# Identity:    3549/3822 (92.9%)
# Similarity:    NA/3822 (NA%)
# Gaps:           12/3822 (0.3%)
# Score: 5435.624
```



Note

- "**Indel**" signifie "Insertion ou délétion"
- Sur base de ce seul résultat, one ne peut pas déterminer si la différence observée provient d'une insertion chez un ancêtre de SARS-CoV-2, ou d'une délétion chez un ancêtre de RaTG13

Alignement d'une paire de séquences protéiques

- Protéines metL et thrA d'E.coli
- Algorithme : Needleman-Wunsch.
- Barres verticales « | »
  - **Identité**: les deux résidus alignés sont identiques.
- Doubles points « : »
  - **Substitution « conservative »**
  - Les deux résidus alignés sont différents mais ***similaires*** (la paire de résidus a un score positif dans la matrice de substitution utilisée (ici, BLOSUM62). Voir plus loin pour comprendre ces matrices.
- Points « . »
  - **Substitution non-conservative**
  - Cette paire de résidus (distincts) a un score négatif dans la matrice de substitution.
- Espace: « »
  - **Gap**: les résidus d'une des deux séquences ne correspondent à aucun résidu sur l'autre.
  - Le gap peut provenir soit d'une délétion, soit d'une insertion, on parle donc d'***indel,*** pour désigner l'événement évolutif d'où provient ce gap.

```
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
# Length: 867
# Identity:     254/867 (29.3%)
# Similarity:   423/867 (48.8%)
# Gaps:         104/867 (12.0%)
# Score: 929.0

metL               1 MSVIAQAGAKGRQLHKFGGSSLADVKCYLRVAGIMAEYSQPDDM-MVVSA     49
                       .::.||||:|:|:.:.:||||.|:...::...: .|:||
thrA               1           MRVLKFGGTSVANAERFLRVADILESNARQGQVATVLSA     39

metL              50 AGSTTNQLINWLK----------LSQTDRLSAHQVQQTLRRYQCDLISG     88
                     ....||.|:..::          :|..:|:.|            :|::|
thrA              40 PAKITNHLVAMIEKTISGQDALPNISDAERIFA-----------ELLTG     77

metL              89 LLPAEEADSL--ISAFV-SDLERLAALLDSGIN------DAVYAEVVGHG    129
                     |..|:....|  :..|| .:.:::..:| .||:      |::.|.::..|
thrA              78 LAAAQPGFPLAQLKTFVDQEFAQIKHVL-HGISLLGQCPDSINAALICRG    126

metL             130 EVWSARLMSAVLNQQGLPAAWLD-AREFLRAERAAQPQVD--EGLSYPLL    176
                     |..|..:|:.||..:|.....:| ..:.|.....:..||  |.......
thrA             127 EKMSIAIMAGVLEARGHNVTVIDPVEKLLAVGHYLESTVDIAESTRRIAA    176

metL             177 QQLLVQHPGKRLVVTGFISRNNAGETVLLGRNGSDYSATQIGALAGVSRV    226
                     .:::...|   .:::.||.:.|..||.|:||||||||||..:.|.......
thrA             177 SRIPADH---MVLMAGFTAGNEKGELVVLGRNGSDYSAAVLAACLRADCC    223

metL             227 TIWSDVAGVYSADPRKVKDACLLPLLRLDEASELARLAAPVLHARTLQPV    276
                     .||:||.|||:.|||:|.||.||..:...||.||:...|.|||.||:.|:
thrA             224 EIWTDVDGVYTCDPRQVPDARLLKSMSYQEAMELSYFGAKVLHPRTITPI    273
```

Matrice de substitutions

- Une ***matrice de substitution*** associe un score à chaque paire de résidus qu'on peut trouver dans un alignement.
  - Chaque ligne et chaque colonne représente l'un des résidus (4 nucléotides, 20 acide aminés).
  - La diagonale correspond aux identités.
  - Le triangle inférieur correspond à des substitutions.
  - Le triangle supérieur est symétrique au triangle inférieur, il n'est pas nécessaire d'indiquer les nombres.
- Les ***scores négatifs*** sont considérés comme des pénalités associées à certaines substitutions qu'on n'observe que rarement dans les alignements. Les algorithmes d'alignements tenteront donc d'éviter ces substitutions.
- Les ***scores positifs*** correspondent à des substitutions qu'on observe plus souvent que prévu, dans les alignements d'un grand nombre de séquences. Ceci suggère que ces substitutions particulières sont moins dommageable que d'autres, et on les qualifie donc de « ***substitutions conservatives*** » ou encore de « ***mutations ponctuelles acceptées*** » (***PAM***).
- Au sein d'un alignement, le terme ***similarité*** désigne les positions où se superposent des résidus ayant un score positif dans la matrice de substitution (identité ou substitution conservative).

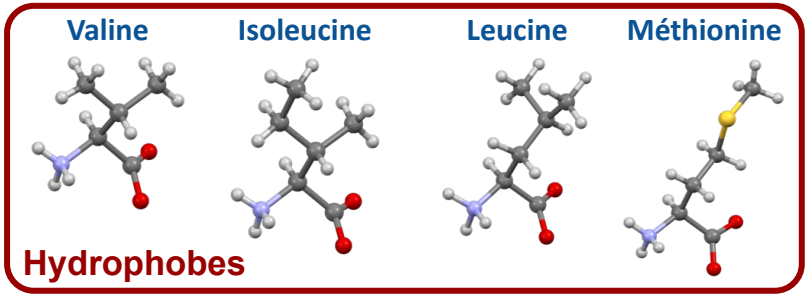
Matrice de substitutions entre nucléotides

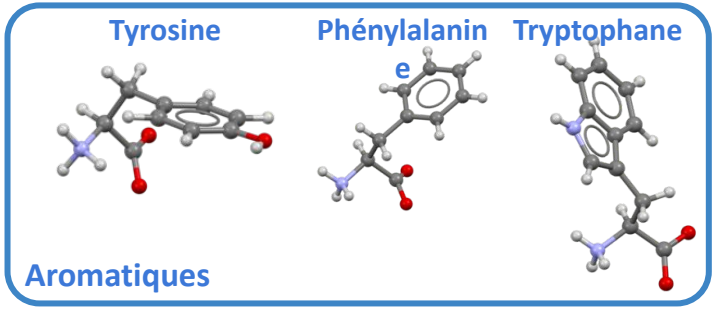
	A	C	G	T
A	2			
C	-2	2		
G	-2	-2	2	
T	-1	-2	-2	2

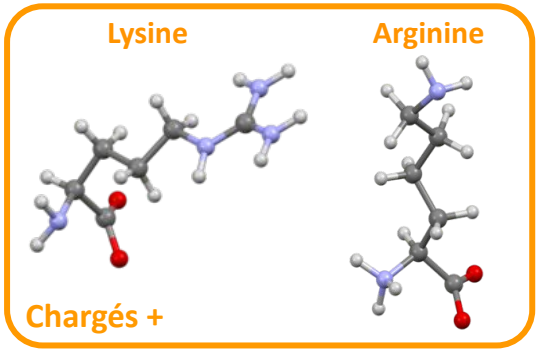
Matrice de substitutions entre acides aminés

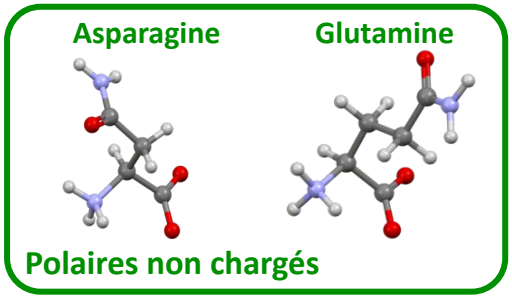
		Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
		A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
Ala	A	4																			
Arg	R	-1	5																		
Asn	N	-2	0	6																	
Asp	D	-2	-2	1	6																
Cys	C	0	-3	-3	-3	9															
Gln	Q	-1	1	0	0	-3	5														
Glu	E	-1	0	0	2	-4	2	5													
Gly	G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
His	H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
Ile	I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
Leu	L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
Lys	K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
Met	M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
Phe	F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
Pro	P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
Ser	S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
Thr	T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
Trp	W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Tyr	Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
Val	V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Similarités chimiques entre acides aminés









Matrice de substitutions entre acides aminés

		A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
Ala	A	4																			
Arg	R	-1	5																		
Asn	N	-2	0	6																	
Asp	D	-2	-2	1	6																
Cys	C	0	-3	-3	-3	9															
Gln	Q	-1	1	0	0	-3	5														
Glu	E	-1	0	0	2	-4	2	5													
Gly	G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
His	H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
Ile	I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
Leu	L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
Lys	K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
Met	M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
Phe	F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
Pro	P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
Ser	S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
Thr	T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
Trp	W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Tyr	Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
Val	V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4
		Ala A	Arg R	Asn N	Asp D	Cys C	Gln Q	Glu E	Gly G	His H	Ile I	Leu L	Lys K	Met M	Phe F	Pro P	Ser S	Thr T	Trp W	Tyr Y	Val V

Recherche de similarité dans les bases de données

- La ligne entre les séquences “Query” et “Sbjct” indique les correspondances entre acides aminés.
- Identités
- Substitutions “conservatives”: paires de résidus distincts mais dont la substitution est généralement moins délétère que pour d’autres paires de résidus.
- Substitutions non conservatives
- Positives: identités + substitutions conservatives.
- Gaps: lacunes insérées dans une séquence afin d’optimiser l’alignement des fragments avoisinants.

```
>gi|16127996|ref|NP_414543.1| bifunctional: aspartokinase I
          (N-terminal); homoserine dehydrogenase I (C-terminal)
          [Escherichia coli K12]
         Length = 820

 Score =  344 bits (882), Expect = 2e-95
Identities = 247/821 (30%), Positives = 410/821 (49%), Gaps = 44/821 (5%)

Query: 16   KFGGSSLADVKCYLRVAGIMAEYSQPDDMM-VVSAAGSTTNQLINWLKLSQTDRLSAHQV 74
            KFGG+S+A+ + +LRVA I+   ++    +  V+SA    TN L+  ++ + + + +   +
Sbjct: 5    KFGGTSVANAERFLRVADILESNARQGQVATVLSAPAKITNHLVAMIEKTISGQDALPNI 64

Query: 75   QQTLRRYQCDLISGLLPAEEADSL--ISAFVSDLERLAALLDSGIN------DAVYAEVV 126
               R +  +L++GL   A+     L  +  FV          +  GI+      D++ A ++
Sbjct: 65   SDAERIF-AELLTGLAAAQPGFPLAQLKTFVDQEFAQIKHVLHGISLLGQCPDSINAALI 123

Query: 127  GHGEVWSARLMSAVLNQQGLPAAWLDAREFLRAER---AAQPQVDEGLSYPLLQQLLVQH 183
              GE   S  +M+ VL  +G     +D  E L A       +   + E         ++   H
Sbjct: 124  CRGEKMSIAIMAGVLEARGHNVTVIDPVEKLLAVGHYLESTVDIAESTRRIAASRIPADH 183

Query: 184  PGKRLVVTGFISRNNAGETVLLGRNGSDYSATQIGALAGVSRVTIWSDVAGVYSADPRKV 243
              +++ GF + N  GE V+LGRNGSDYSA  + A        IW+DV GVY+ DPR+V
Sbjct: 184  ---MVLMAGFTAGNEKGELVVLGRNGSDYSAAVLAACLRADCCEIWTDVDGVYTCDPRQV 240

Query: 244  KDACLLPLLRLDEASELARLAAPVLHARTLQPVSGSEIDLQLRCSYTPDQ-----GSTRI 298
             DA LL  +   EA EL+   A VLH RT+ P++  +I   ++ +  P       G++R
Sbjct: 241  PDARLLKSMSYQEAMELSYFGAKVLHPRTITPIAQFQIPCLIKNTGNPQAPGTLIGASRD 300

Query: 299  ERVLASGTGARIVTSHDDVCLIEFQVPASQDFKLAHKEIDQILKRAQVRPLAVGVHNDRQ 358
            E  L      + +++ +++ +     P  +         +   + RA++  + +   +
Sbjct: 301  EDELP----VKGISNLNNMAMFSVSGPGMKGMVGMAARVFAAMSRARISVVLITQSSSEY 356

Query: 359  LLQFCYTSEVADSALKILDEA-------GLPGELRLRQGLALVAMVGAGVTRNPLHCHRF 411
```

Résultat de BLAST – Requête peptidique vs DB de peptides

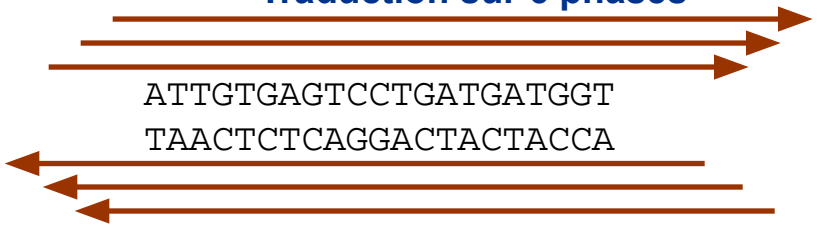
- Exemple de résultat de recherche par similarité de séquences.
- Requête (query): metA
- Protéine identifiée dans la base de données: (subject): thrA.
- Le premier critère d'évaluation d'un résultat de BLAST:
- La e-valeur (expect) indique le nombre de faux-positifs attendus au hasard, si l'on plaçait le seuil au niveau du score observé (344 bits dans ce cas-ci).
- Plus la e-valeur est faible, plus le résultat est fiable.
- Si la e-valeur est >= 1, le résultat est peu fiable (on aurait facilement obtenu un « aussi bon » alignement avec des séquences aléatoires.

```
>gi|16127996|ref|NP_414543.1| bifunctional: aspartokinase I
          (N-terminal); homoserine dehydrogenase I (C-terminal)
          [Escherichia coli K12]
         Length = 820

 Score =  344 bits (882), Expect = 2e-95
 Identities = 247/821 (30%), Positives = 410/821 (49%), Gaps = 44/821 (5%)

Query: 16  KFGGSSLADVKCYLRVAGIMAEYSQPDDMM-VVSAAGSTTNQLINWLKLSQTDRLSAHQV 74
           KFGG+S+A+ + +LRVA I+   ++   +  V+SA    TN L+  ++ + + + +   +
Sbjct: 5   KFGGTSVANAERFLRVADILESNARQGQVATVLSAPAKITNHLVAMIEKTISGQDALPNI 64

Query: 75  QQTLRRYQCDLISGLLPAEEADSL--ISAFVSDLERLAALLDSGIN------DAVYAEVV 126
               R +  +L++GL  A+    L  +  FV         +  GI+      D++ A ++
Sbjct: 65  SDAERIF-AELLTGLAAAQPGFPLAQLKTFVDQEFAQIKHVLHGISLLGQCPDSINAALI 123

Query: 127 GHGEVWSARLMSAVLNQQGLPAAWLDAREFLRAER---AAQPQVDEGLSYPLLQQLLVQH 183
             GE  S  +M+ VL  +G     +D  E L A      +   + E         ++   H
Sbjct: 124 CRGEKMSIAIMAGVLEARGHNVTVIDPVEKLLAVGHYLESTVDIAESTRRIAASRIPADH 183

Query: 184 PGKRLVVTGFISRNNAGETVLLGRNGSDYSATQIGALAGVSRVTIWSDVAGVYSADPRKV 243
              +++ GF + N  GE V+LGRNGSDYSA  + A        IW+DV GVY+ DPR+V
Sbjct: 184 ---MVLMAGFTAGNEKGELVVLGRNGSDYSAAVLAACLRADCCEIWTDVDGVYTCDPRQV 240

Query: 244 KDACLLPLLRLDEASELARLAAPVLHARTLQPVSGSEIDLQLRCSYTPDQ-----GSTRI 298
           DA LL  +   EA EL+   A VLH RT+ P++  +I   ++ +  P       G++R
Sbjct: 241 PDARLLKSMSYQEAMELSYFGAKVLHPRTITPIAQFQIPCLIKNTGNPQAPGTLIGASRD 300

Query: 299 ERVLASGTGARIVTSHDDVCLIEFQVPASQDFKLAHKEIDQILKRAQVRPLAVGVHNDRQ 358
           E  L      + +++ +++ +     P  +         +  + RA++  + +   +
Sbjct: 301 EDELP----VKGISNLNNMAMFSVSGPGMKGMVGMAARVFAAMSRARISVVLITQSSSEY 356

Query: 359 LLQFCYTSEVADSALKILDEA-------GLPGELRLRQGLALVAMVGAGVTRNPLHCHRF 411
```

Traduction d'une séquence nucléique sur les 6 phases de lecture

- Si l'on dispose d'une séquence nucléique, on peut facilement déduire la séquence de la protéine qui pourrait être produite par sa traduction, sur chacun des 6 brins.
- Si cette séquence n'est pas codante, on s'attend à trouver des codons stop (noté *) assez fréquemment (3 codons sur 64).
- Les similarités entre une séquence traduite à partir d'ADN et des protéines connues constituent des indices pour la localisation de régions codantes, et pour la fonction potentielle des nouvelles séquences.

Traduction sur 6 phases



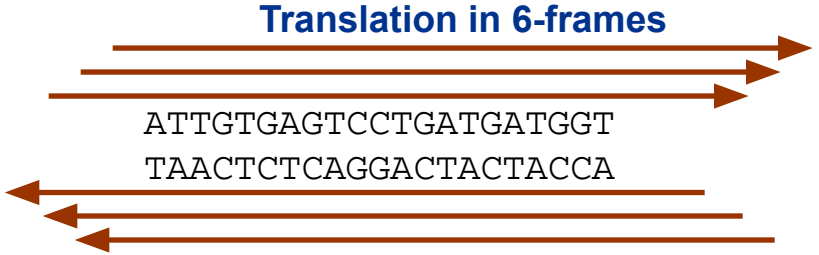
Résultat

```
F1       I  V  S  P  D  D  G
F2        L  *  V  L  M  M  V
F3         C  E  S  *  *  W  X
      1 ATTGTGAGTCCTGATGATGGT 21
        ----:----|----:----|-
      1 TAACACTCAGGACTACTACCA 21
F6        X  T  L  G  S  S  P
F5       X  Q  S  D  Q  H  H
F4         N  H  T  R  I  I  T
```

Modalités de BLAST

Le logiciel BLAST présente 5 modalités différentes en fonction du type des séquences (peptidique ou nucléotidique) de requête et de la base de données.

Pour les comparaisons entre séquences nucléotidiques et peptidiques, la séquence nucléotidique est traduite dans les 6 phases de lecture (3 par brin), et on lance ensuite une recherche de similarité “protéine *versus* protéine”.



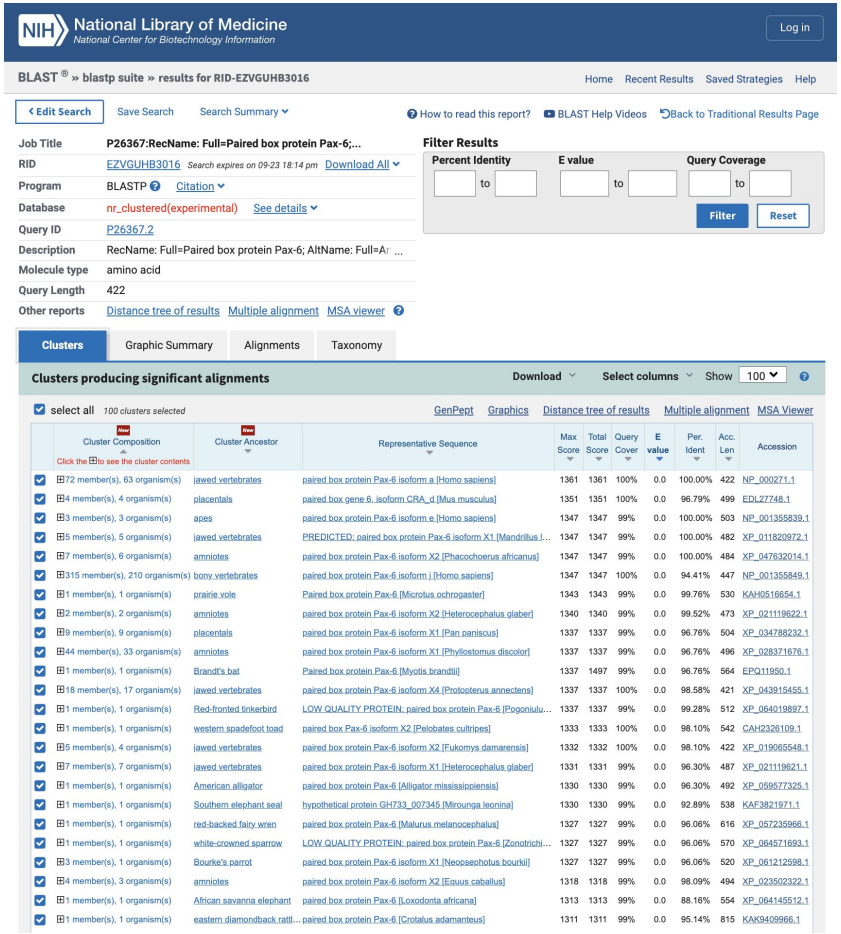
Query	Database	Program	Application examples	Study cases
protein	protein	blastp	Starting from a protein of known function detect putative homologs in the whole Uniprot database.	Collect sequences similar to the blue-sensitive opsin in all human proteins.
nucleic acid	nucleic acid	blastn	Match RNAi against a genome. Match mRNA (or EST) against a genome.	
nucleic acid (translated)	protein	blastx	After having sequenced a piece of DNA, search potentially coding fragments + their putative homologs without any prior knowledge of gene positions in the query sequence.	
protein	nucleic acid (translated)	tblastn	- Identify a genomic region likely to code for an homolog of a protein of interest. - Identify pseudo-genes (defective genes, with many stop codons) for a protein of interest in a genome.	Do cats see colors ? Get Human blue-sensitive opsin protein, connect UCSC genome browser, use BLAT to find similarities in Cat genome
nucleic acid (translated)	nucleic acid (translated)	tblastx		

Exemple de recherche de similarité : blastp (protéine vs DB de protéines)

BLAST permet de chercher, dans une base de données, toutes les séquences similaires à une séquence d'intérêt ("query", requête).

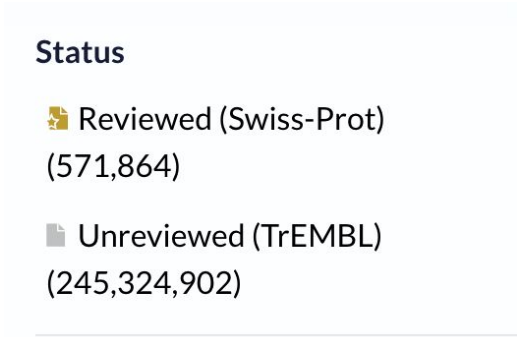
L'analyse peut se faire avec des séquences nucléiques (blastn) ou peptidiques (blastp).

La figure ci-contre affiche le début de la liste des résultats, triés par significativité statistique de la similarité de séquence (les séquences les plus similaires viennent en premier).



Assignation de fonction par similarité de séquences - intérêt et limitations

- L'assignation de fonction par similarité est la méthode principale d'annotation des génomes nouvellement séquencés.
- Elle est notamment mise à contribution pour l'annotation automatique des protéines dans la section Unreviewed (TrEMBL) d'Uniprot, qui continent l'énorme majorité des séquences connues (245 millions de séquences protéiques au 22 septembre 2024).
- Il s'agit cependant d'une inférence très approximative. On ne peut pas définir un seuil d'identité ou de similarité qui permettrait d'inférer sans ambiguïté que deux protéines ont la même fonction.
  - Exemple: quelques changements d'acides aminés dans le site actif d'une enzyme peuvent suffire à changer sa spécificité de substrat ou de produit, même si le taux global d'identité ou de similarité reste très élevé.
- On essaie donc de combiner cette première phase des annotations par des informations complémentaires fournies par d'autres approches.



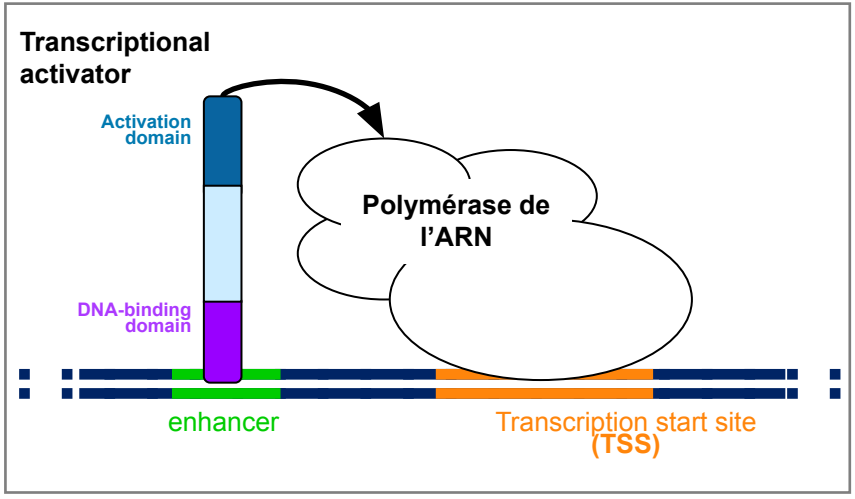
Un élément structurant des génomes: la régulation

Régulation génétique

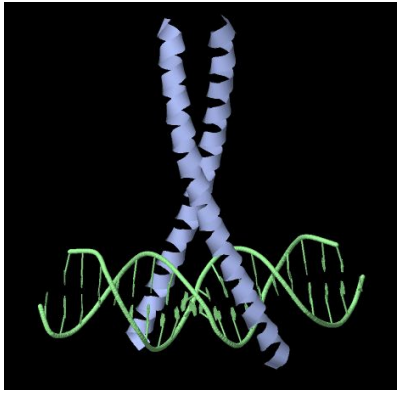
Pour pouvoir comprendre la structure des gènes et l'organisation des génomes, il est nécessaire de connaître quelques éléments concernant la régulation génétique.

Nous résumons ci-après les notions de base indispensables, sachant que ces concepts seront développés dans vos cours de génétique et de biologie moléculaire.

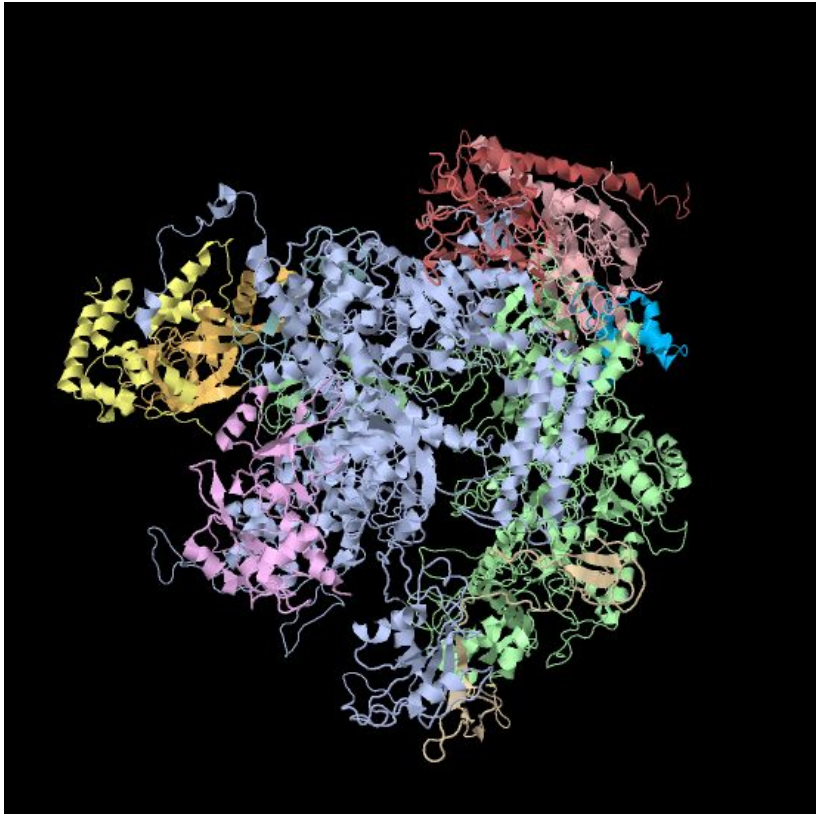
Activation de la transcription



Gcn4p from Saccharomyces cerevisiae
PDB 2DGC http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2DGC

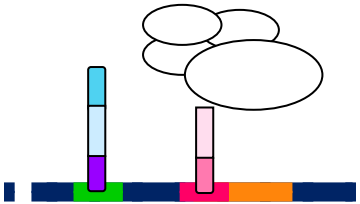


RNA polymerase II from Schizosaccharomyces pombe. (PDB 3H0G)
http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3H0G

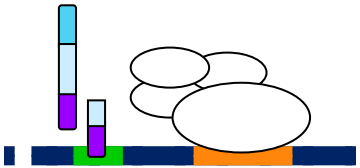


Répression transcriptionnelle

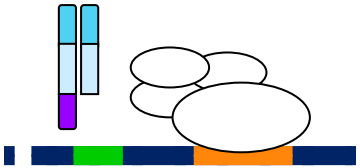
- The concept of transcriptional repression encompasses a variety of molecular mechanisms.



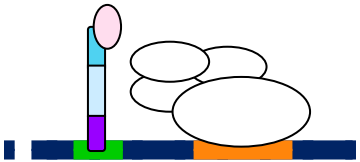
Promoter occupancy: prevent RNA polymerase from accessing DNA (e.g. many bacterial repressors)



Cis-regulatory element occupancy: competition for factor binding site (e.g. yeast GATA factors)



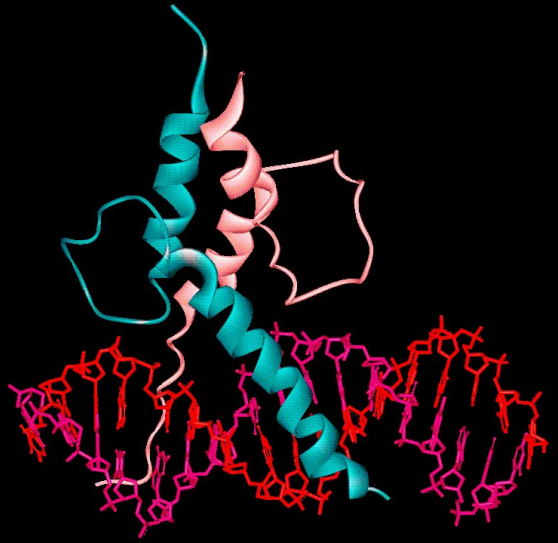
Titration of the activator: repressor forms dimer with activator, which prevents its binding to TFBS (e.g. Drosophila Helix-loop-helix)



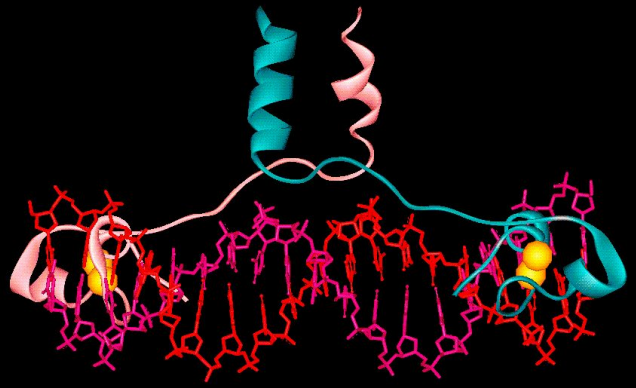
Allosteric regulation: repressor binds to activator, which alters activator conformation and prevents it from interacting with RNA-polymerase (e.g. yeast Gal80p)

Interfaces facteurs transcriptionnels / ADN

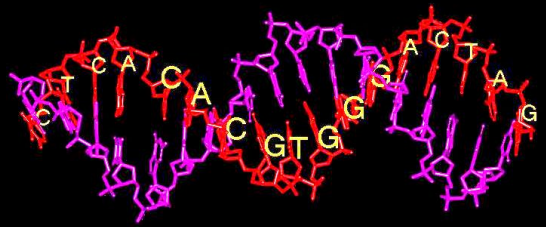
Pho4p (yeast)



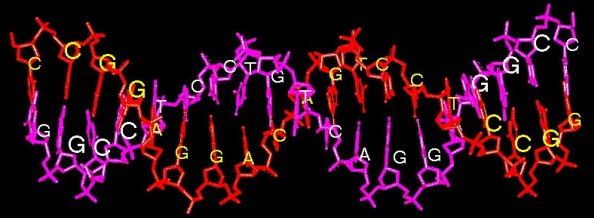
Gal4p (yeast)



Pho4p DNA binding site (oligonucleotide)



Gal4p DNA binding site (dyad)

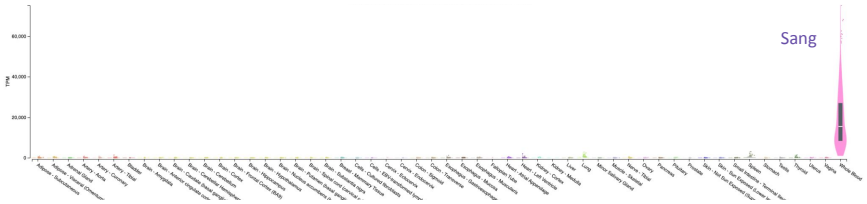


Dis-moi dans quels tissus tu t'exprimes, je te dirai qui tu es

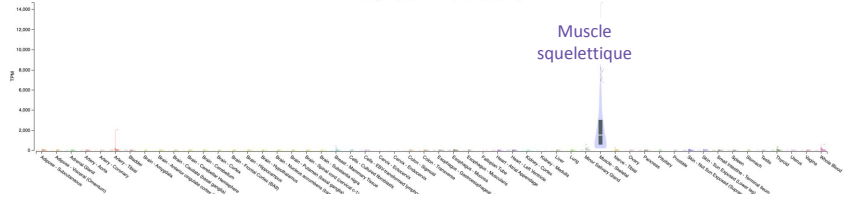
Le projet GTEX (Adult Genotype Expression)

- Collecte d'échantillons de 54 tissus chez 1000 individus
- Extraction de l'ARN
- Séquençage et quantification dans chaque tissu (RNA-seq)

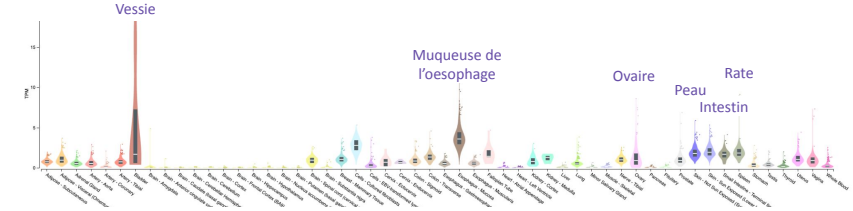
Exemples ci-contre: profils tissulaires d'expression pour quelques gènes illustratifs



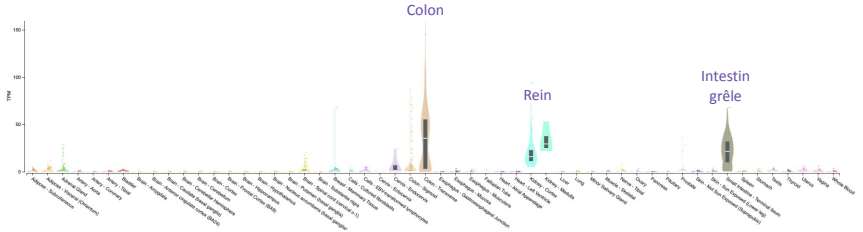
Gène HBA (chaîne alpha de l'hémoglobine)



Gène MYH1 (myoglobine)



HOX1A (gène de spécification segmentaire)



HOXB9 (gène de spécification segmentaire)

https://www.gtexportal.org/home/

Profil transcriptomique de la myoglobine

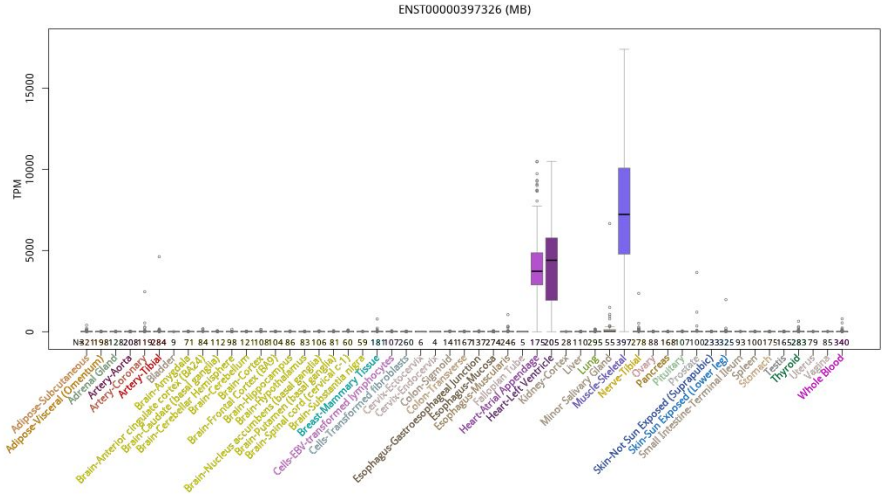
La base de données GTEx (gtexportal.org) contient les **profils transcriptomiques** (quantification de tous les ARN produits par un génome) à partir d'échantillons prélevés dans 54 tissus chez ~1000 individus.

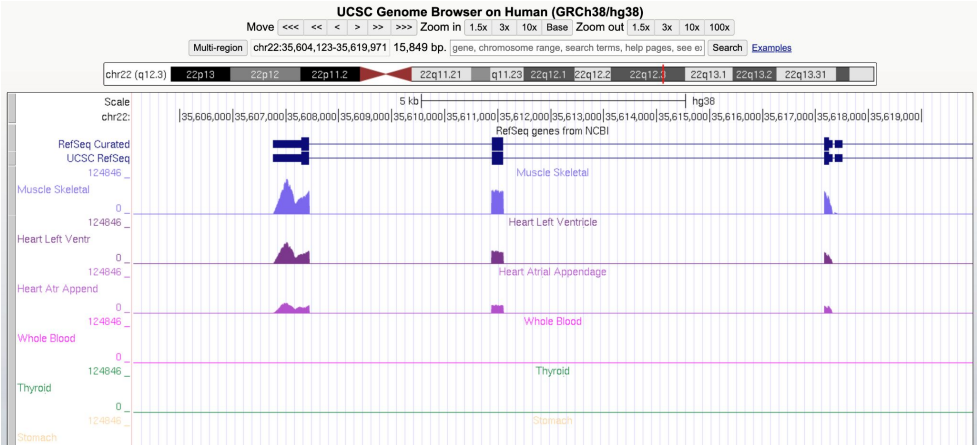
UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu) permet d'afficher les données de GTEx au regard des annotations génomiques.

- **Figure du haut:** la myoglobine est fortement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques. Ceci est parfaitement cohérent avec la fonction de l'hémoglobine.
- **Figure du bas:** dans ces tissus, la localisation génomique des fragments de lectures (short reads) correspond aux exons.

Intérêt des analyses transcriptomiques pour l'annotation des génomes : pour des gènes de fonction inconnue, les profils transcriptomiques peuvent apporter des indices concernant

- La localisation des exons
- Une fonction potentielle pour les gènes concernés

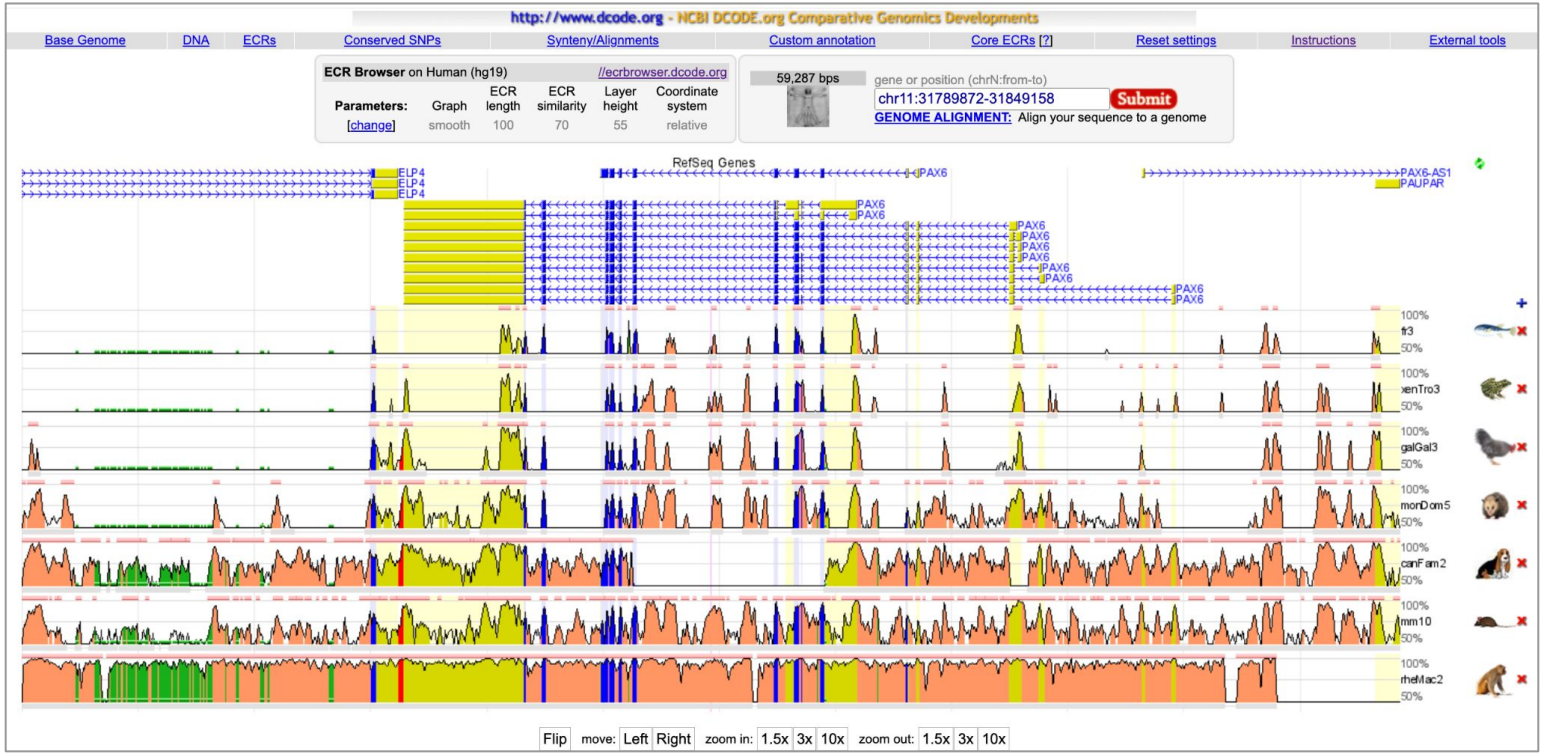


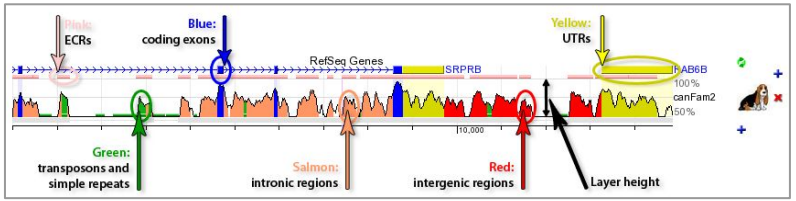


https://gtexportal.org/
https://genome.ucsc.edu/

Génomique comparative

Génomique comparative : ECR genome browser (eukaryotic conserved regions)

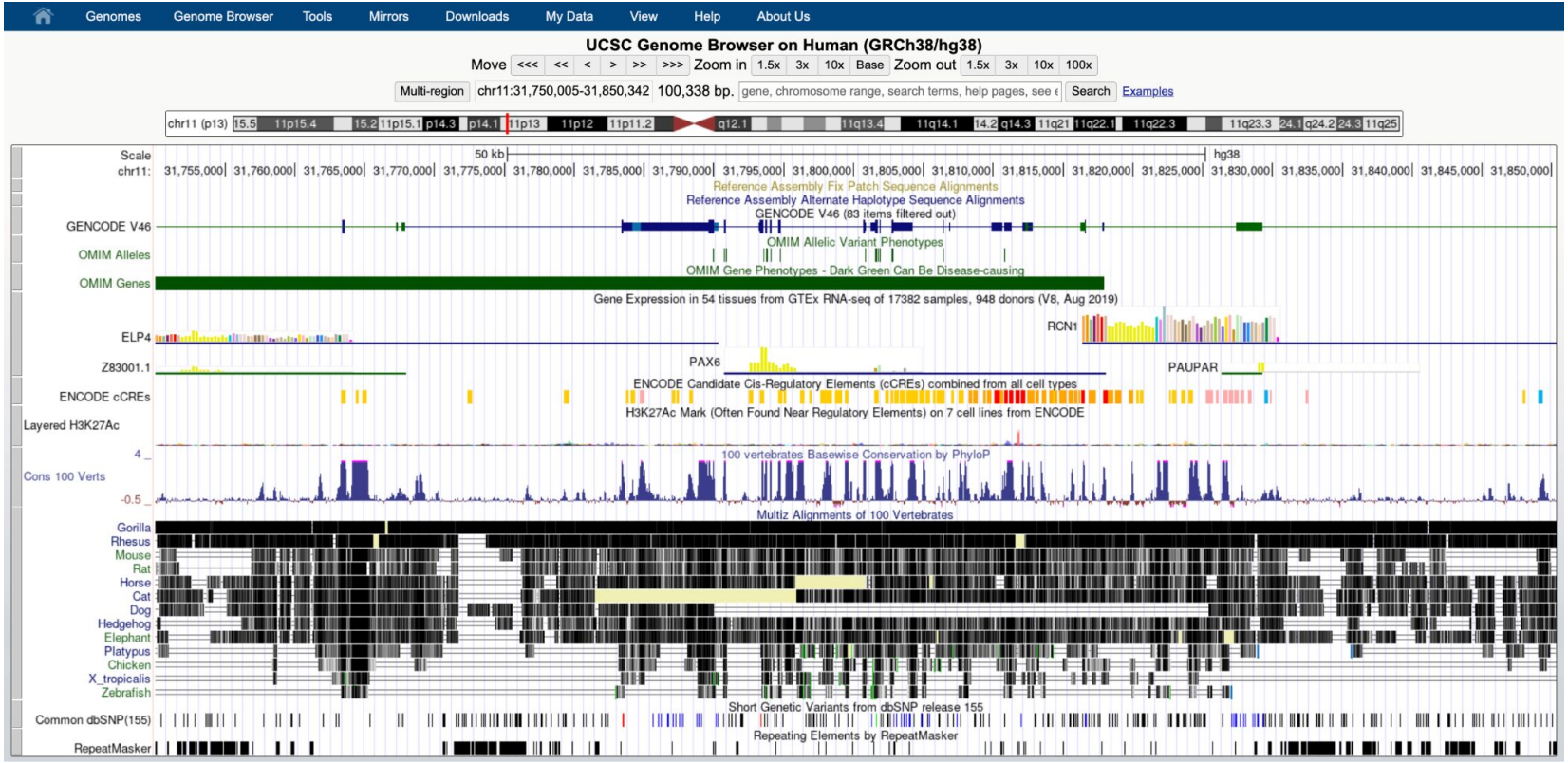




https://ecrbrowser.dcode.org/xB.php?db=hg19&location=chr11:31806340-31832690

Une vue sur le gène PAX6 – UCSC Genome Browser

Exemple “brut”: vue sur le gène PAX6 au UCSC Genome Browser. Un peu indigeste, nous le présenterons progressivement



https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr11%3A31750005%2D31850342&hgsid=2346774682_HANiLICODtNRhZ5qhQaHwIlcu7OR

Coupable par association

Des génomes aux transcriptomes

Chez tous les êtres vivants l'expression des gènes fait l'objet d'un contrôle moléculaire à différents niveaux: transcription, maturation de l'ARN, traduction, post-traduction.

Une indication importante concernant la fonction des gènes est de savoir dans quelles conditions ils sont exprimés.

- Microbes: substrats disponibles, conditions environnementales, …
- Multicellulaires: spécificité tissulaire, stades du développement, réponse aux conditions internes et externe de l'organisme

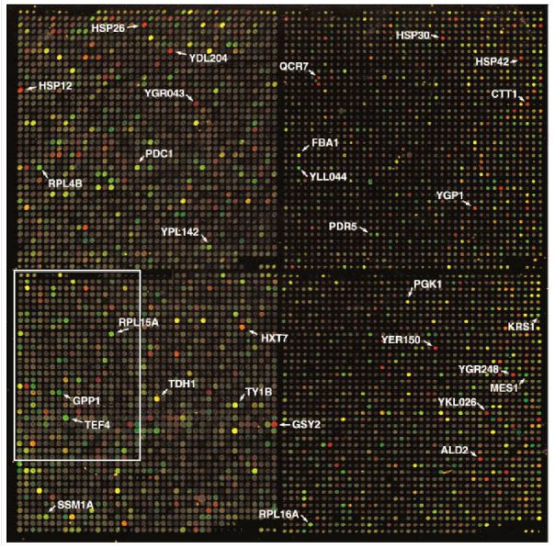
La transcriptomique consiste à mesurer simultanément l'expression de *tous* les gènes d'un échantillon prélevé sur un organisme dans des conditions particulières.

- 1997: premières approches de transcriptomiques par biopuces
- 2007: transcriptomique par séquençage massivement parallèle (RNA-seq)

La première biopuce transcriptomique (de Risi et al., 1997). Chacun des 6000 points lumineux correspond à un transcrit (ARN) de la levure du boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*.

- L'intensité lumineuse est proportionnelle au niveau d'expression
- La couleur indique le sens de la régulation
  - Rouge: gènes sur-exprimés par rapport à l'échantillon témoin
  - Vert: gènes sous-exprimés
  - Jaune: gènes fortement exprimés dans les deux échantillons.

DeRisi et al. (1997), 10.1126/science.278.5338.680



DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 278, 680-6. doi.org/10.1126/science.278.5338.680

Des protéomes aux interactomes

Une protéine n'agit généralement pas seule: les protéines interagissent

- De façon stable, en formant des complexes multimériques (plusieurs polypeptides)
- De façon transitoire, en établissant des liaisons temporaires qui modifient leur niveau d'activité

Au début des années 2000, plusieurs méthodes sont mises au point pour déterminer l'**interactome**, c'est-à-dire l'ensemble des interactions entre protéines d'un système biologique (organisme, tissu, échantillon).

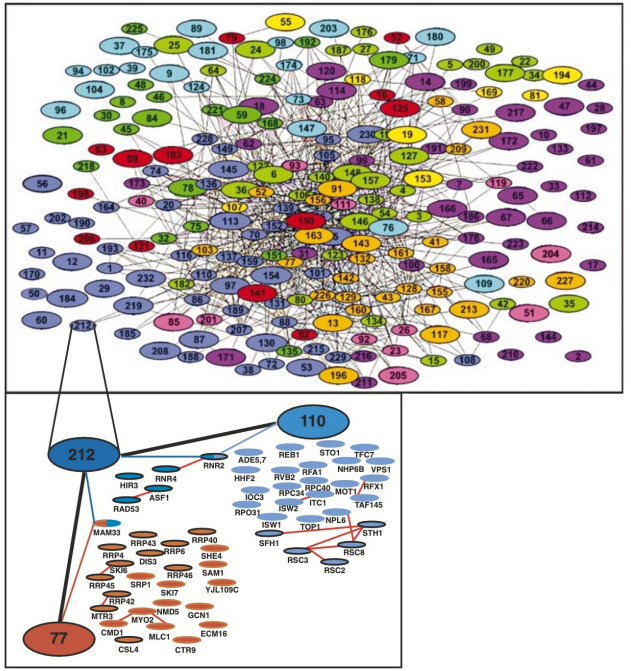


Figure 4 The protein complex network, and grouping of connected complexes. Links were established between complexes sharing at least one protein. For clarity, proteins found in more than nine complexes were omitted. The graphs were generated automatically by a relaxation algorithm that finds a local minimum in the distribution of nodes by minimizing the distance of connected nodes and maximizing distance of unconnected nodes. In the upper panel, cellular roles of the individual complexes (ascribed in Supplementary Information Table S3) are colour coded: red, cell cycle; dark green, signalling; dark blue, transcription, DNA maintenance, chromatin structure; pink, protein and RNA transport; orange, RNA metabolism; light green, protein synthesis and turnover; brown, cell polarity and structure; violet, intermediate and energy metabolism; light blue, membrane biogenesis and traffic. The lower panel is an example of a complex (yeast TAP-C212) linked to two other complexes (yeast TAP-C77 and TAP-C110) by shared components. It illustrates the connection between the protein and complex levels of organization. Red lines indicate physical interactions as listed in YPD[22].

1. Gavin, A.-C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature 415, 141–147 (2002). doi.org/10.1038/415141a

Le principe de culpabilité par association

- Le principe de culpabilité par association (*guilt by association*) en annotation fonctionnelle : si l'on ignore la fonction d'un gène ou d'une protéine, mais qu'on constate qu'elle est fréquemment associée à des gènes ou protéines de fonction connue, on suppose qu'ils peuvent participer à une même fonction.
- Les critères d'association peuvent être multiples
  - Interactions physiques entre protéines détectées dans les interactomes
  - Corrélation de présence / absence d'homologues dans les génomes / protéomes de différents organismes (profils phylogénétiques)
  - Corrélation entre profils transcriptomiques
  - Procaryotes: inclusion dans le même opéron
  - …
- La dénomination est ironique, car ce principe est bien entendu invalide en matière juridique : on ne peut pas condamner quelqu'un pour la seule raison qu'il a fréquenté des personnes qui ont commis un délit.

La Gene Ontology – Définir et structurer les termes d’annotation des gènes et de leurs produits

Gene Ontology (GO)

En 2000, Ashburner et collègues proposent à tous les projets de génomique d'adopter une "ontologie" pour annoter les fonctions des gènes (et des protéines qu'elles produisent).

Ils illustrent le concept avec trois organismes modèles.

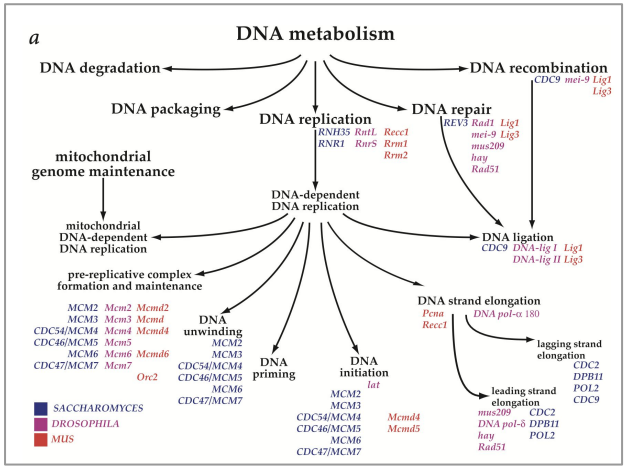
- *Saccharomyces cerevisiae* (levure du boulanger)
- *Drosophila melanogaster* (mouche à vinaigre)
- *Mus musculus* (souris)

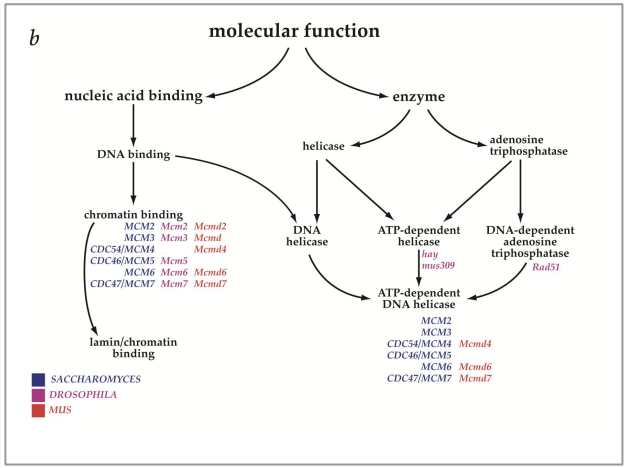
La Gene Ontology initiale définit 3 niveaux d'annotation

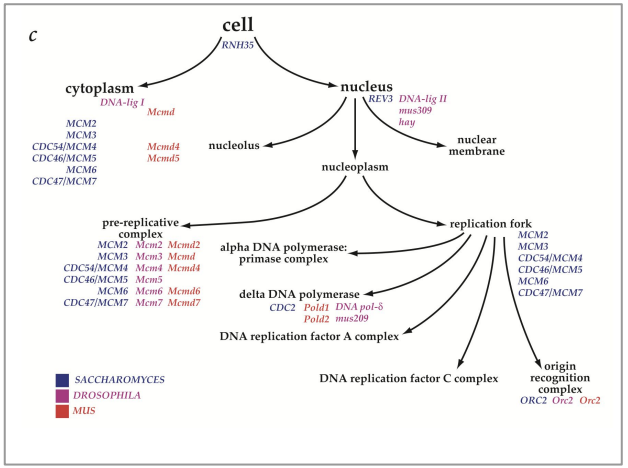
a. **Processus biologique** (figure de gauche)
b. **Fonction moléculaire** (milieu)
c. **Composante cellulaire** (droite)

Principes de l'ontologie

- **Vocabulaire contrôlé :** on définit une liste des **termes standards**, pour éviter les ambiguités liées à des formulations différentes des mêmes concepts (ex: cytoplasme = cytosol)
- **Vocabulaire structuré :** les relations hiérarchiques (flèches) sont établies entre ces termes.
- Les **relations ascendantes ou descendantes** peuvent être **multiples** (chaque noeud du graphe peut avoir plusieurs "parents" et plusieurs "enfants").
- Chaque gène est annoté en l'attachant à un ou plusieurs termes de l'ontologie (exemples colorés en bleu, rose ou rouge sur le graphe)







Ashburner, M., Ball, C., Blake, J. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nat Genet 25, 25–29 (2000). doi.org/10.1038/75556

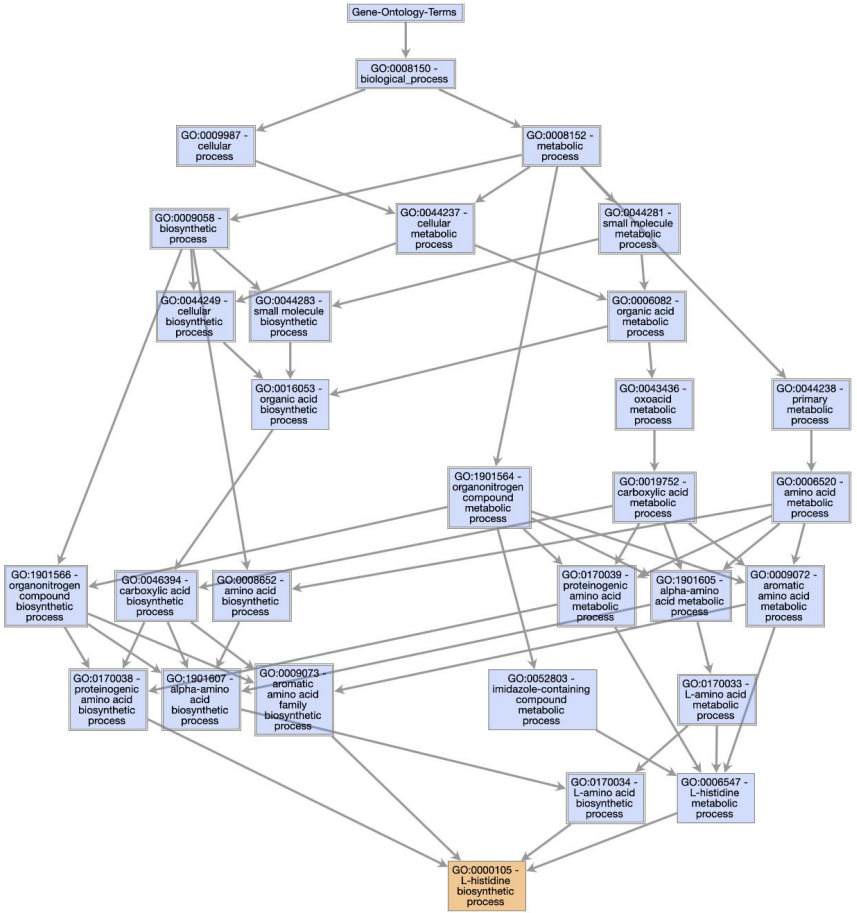
Exemple: diagramme GO du processus “biosynthèse de la L-histidine”

La voie métabolique de biosynthèse de l’histidine est rattachée à plusieurs processus parents :

- Métabolisme de la L-histidine
- Biosynthèse des acides aminés lévogyres
- Biosynthèse des acides aminés aromatiques
- Biosynthèse des acides aminés protéogéniques (impliqués dans la composition des protéines)

Ces classes ontologiques ont à leur tour des classes parentes, avec certains entrecroisements.

Cette structuration paraît complexe au premier abord, mais permet d’annoter chaque gène / protéine à un niveau plus ou moins détaillé de l’arborescence des termes de l’ontologie.



ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=ECOCYC-CLASS&object=GO:0000105

Evaluation pédagogique

Évaluation pédagogique du chapitre 3 : du gène au génome

A la fin de chaque chapitre, nous demandons à chaque étudiant de remplir un formulaire d'évaluation pédagogique.

Cette enquête est anonyme. Elle vous prendra quelques minutes, et pourra apporter aux enseignants des informations précieuses pour améliorer le cours.

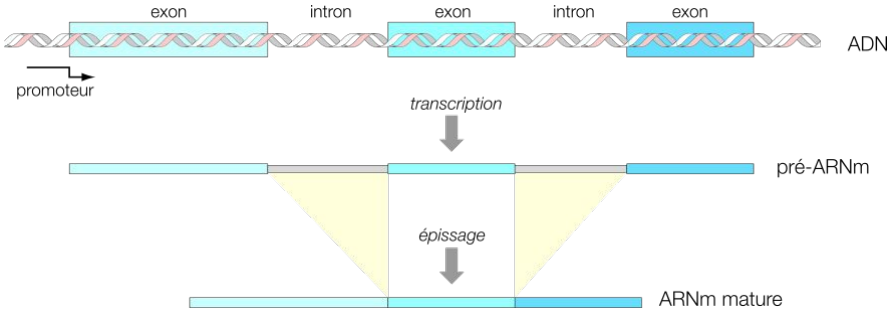
Merci pour votre participation.

https://app.wooclap.com/QOPRUG

Information complémentaire
(ne fait pas partie de la matière d'examen)

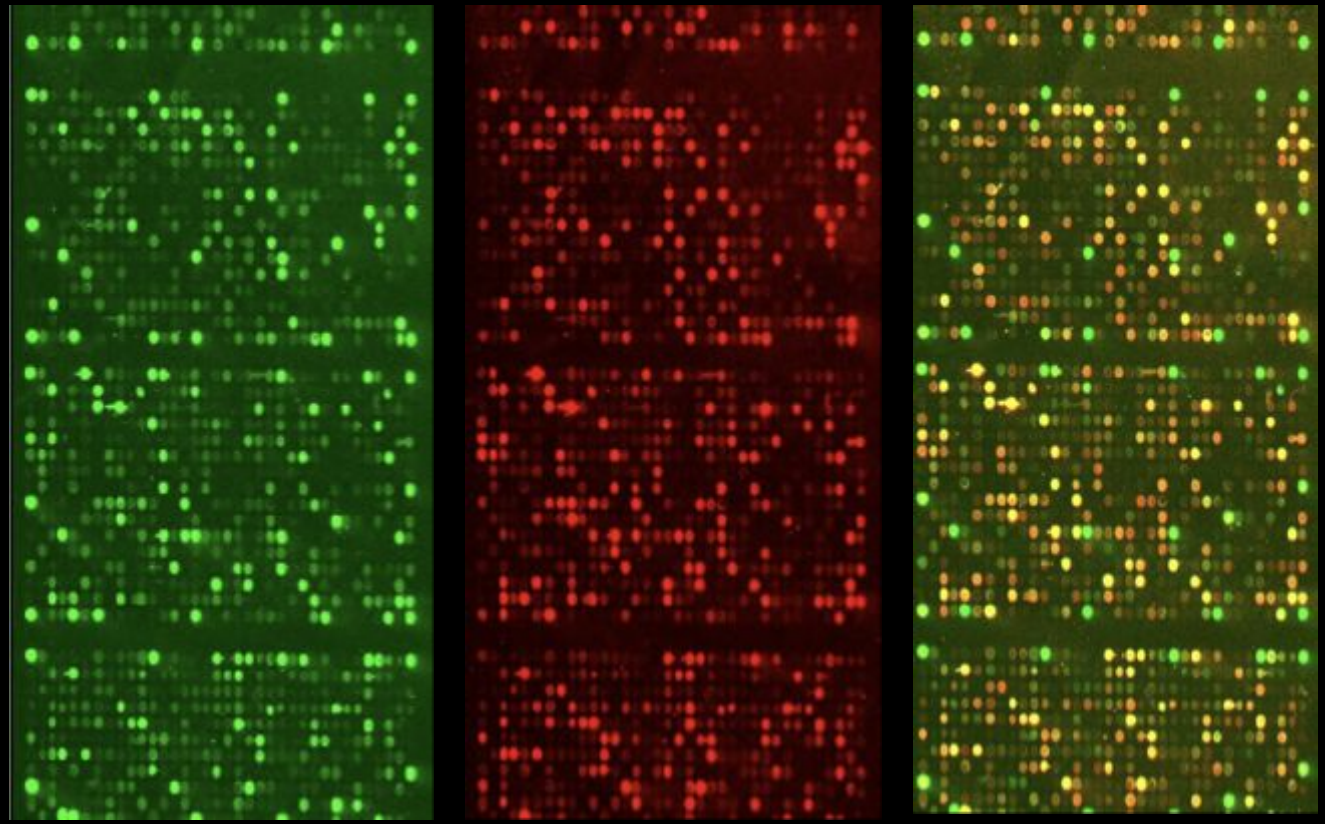
L'épissage

- Haut: ADN
- Milieu: pré-ARN = transcrit primaire
  - Principale composante de la fraction nucléaire de l'ARN (extraite du noyau cellulaire)
- Bas: résultat de l'épissage: les exons sont
  - Principale composante de la fraction cytoplasmique de l'ARN (extraite du cytoplasme)
- Exons: parties de l'ADN qui se retrouvent dans l'ARN mature
- Introns: parties de l'ADN qui sont excisées entre ARN primaire et ARN mature
- **Attention:** les exons ***ne correspondent pas*** aux parties codantes des gènes
  - Il existe des ARN non codants (ex: ARN de transfert, ribosomiques, …
  - Le concept d'**ARN messager** ne concerne donc que les gènes codant pour des protéines
  - Même pour les gènes codants, l'ARN messager inclut des parties non traduites à ses extrémités 3' et 5' (*UTR: untranslated regions*)



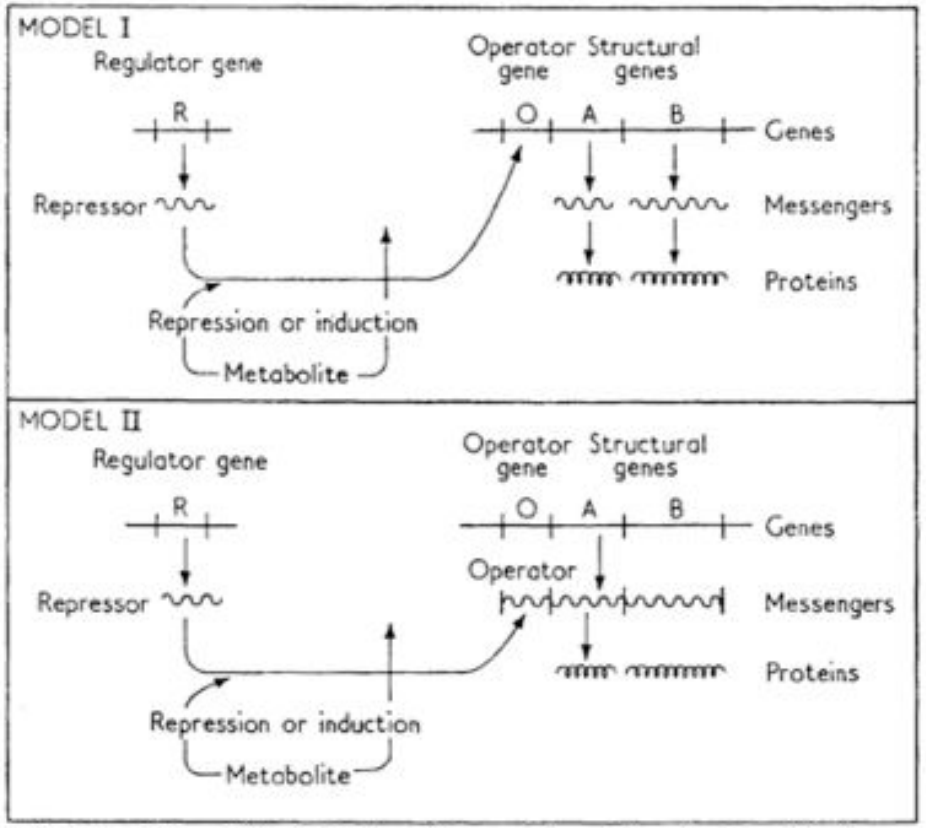
https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89pissage

Biopuces transcriptomiques - principe



Structuration des gènes bactériens - La découverte de l'opéron

- Depuis les années 40, Jacques Monod entreprend de comprendre les mécanismes de régulation métabolique chez la bactérie *Escherichia coli*
- 1960: François Jacob and Jacques Monod proposent deux modèles alternatifs pour lka régulation de l'opéron Lac
  - au niveau de la transcription
  - au niveau de l'ARN
- Le modèle de base sous-jacent à ces deux modèles est le contrôle négatif (répression) de l'expression des gènes.
- Dans les deux cas, ils soulignent l'importance des boucles de rétroaction



Jacob, F. and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J Mol Biol 3, 318-56.

- Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C. and Monod, J. (1960). [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator.]. C R Hebd Seances