

Université Ibn khaldoun – Tiaret /Faculté SNV

Niveau : Niveau : M1_Génétique moléculaire et amélioration des plantes

Corrigé d' Examen de Génomique et protéomique II –S2 – 2025

Question1 :

A)Définition(4p)

protéomique différentielle-

Il s'agit d'étudier l'expression des protéines de tissus ou d'organismes entre deux conditions différentes et de déterminer les variations d'expression protéique de manière qualitative et quantitative.

protéome-

la totalité des protéines exprimées par un génome dans l'espace et dans le temps.

Il s'agit donc, contrairement au génome, d'une image dynamique dépendant du tissu, du stade de développement et des conditions environnementales dans lesquelles l'organisme se situe.

protéomique structurale

Le but de la protéomique structurale est de déterminer la relation entre la structure et la fonction d'une protéine, en particulier par la résolution de sa structure tridimensionnelle.

B) les étapes de l'analyse protéomique(4p)

1) Extraction des protéines

La qualité de l'extraction protéique est un point majeur de toute analyse protéomique, elle doit être effectuée dans des conditions de travail strictement contrôlées de manière à minimiser les contaminations.

L'extraction a pour **but de solubiliser** le plus grand nombre possible de protéines

- 2) **Séparation** des protéines par **électrophorèse** sur gel **bidimensionnel** (cas particulier des protéines membranaires)

Afin d'étudier l'ensemble des protéines exprimées par un **organisme** ou un type cellulaire donné, il convient de mettre en œuvre des méthodes analytiques et reproductibles.

L'électrophorèse bi-dimensionnelle (2-DE) (ou 2D PAGE two dimensional polyacrylamide gel Electrophoresis")

Elle permet, à l'issue de deux migrations électrophorétiques successives, de visualiser un grand nombre de protéines de façon simultanée

- 3) **Révélation** des protéines dans les **gels** puis l'analyse **d'image** des gels
- 4) **Récupération** des **spots** de protéines et la **digestion** par des protéases

Obtention de **cartes** peptidiques massiques par des techniques de **spectrométrie** de masse

7) **Détermination** de la **séquence complète** des protéines par d'autres techniques de spectrométrie de masse

8) **Analyse** bio-informatique

Question2 (6p) les différentes étapes de **pyroséquençage**.

- ✓ Cette méthode est basée sur la détection du **pyrophosphate** lors de **l'incorporation** d'un nucléotide par une polymérase
- ✓ Cette méthode est basée sur la détection du pyrophosphate lors de l'incorporation d'un nucléotide par une polymérase

Le pyroséquençage se déroule en 5 étapes

Etape 1: Consiste à préparer le mélange réactionnel, avec les enzymes clefs et les différents substrats

Etape 2 : Ici, les nucléotides ne sont pas ajoutés tous ensemble comme dans une réaction de séquençage normale mais l'un après l'autre.

Si le Nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (d'élongation) et libère un Pyrophosphate.

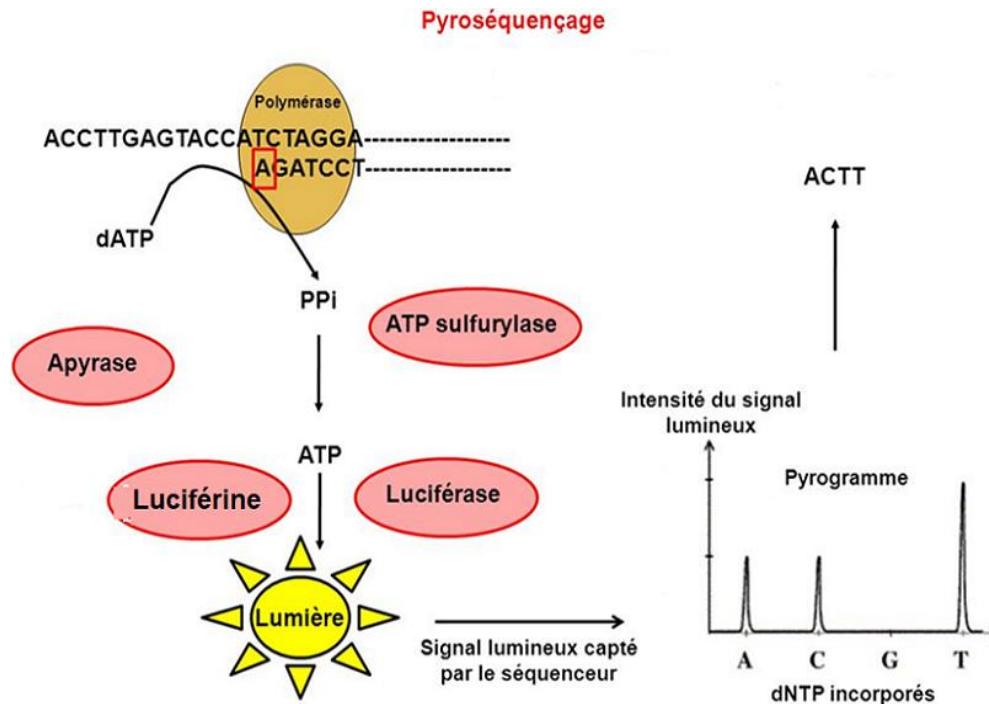
Etape 3 : L'ATP **sulfurylase** vient alors transformer ce Pyrophosphate (**PPi**) en **ATP** qui est alors utilisé, couplé à une **Luciférine**, par une **Luciférase**. On a alors production d'**Oxyluciférine** et d'un **signal Lumineux**

Etape 4 : Les nucléotides non incorporés sont **dégradés** entre chaque cycle par une **apyrase**, mais le temps de dégradation est plus long que celui de l'incorporation de façon à ne pas interférer avec la réaction de polymérisation.

Etape 5 : Le signal lumineux est **capté** par un capteur **CCD** (Charge-Coupled Device) puis reproduit sous forme d'un **pic** sur le Pyrogramme.

La hauteur de ce pic est **fonction** de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps

- ✓ -Une des difficultés est la lecture de domaines **homopolymériques** (par exemple si plusieurs T se suivent).
- ✓ En effet dans ce cas le signal est plus intense mais n'est pas directement proportionnel au nombre de bases.
- ✓ Cette méthode permet de séquencer uniquement des petits fragments, mais sa **simplicité** permet d'en séquencer un grand nombre en parallèle



Question3 (6p) les différentes étapes de séquençage Illumina/Solexa.

La spécificité de cette technologie repose sur une amplification en pont (bridge PCR) des fragments à séquencer.

Elle a lieu sur une surface de verre appelée flow cell (FC), similaire à une lame de microscope, divisée en huit lignes (à l'origine, une ligne par échantillon).

Les fragments de la librairie à séquencer possèdent des adaptateurs à leurs extrémités.

Ceux-ci vont leur permettre de se fixer de façon aléatoire sur la FC, par hybridation sur les amorces qui en couvrent la surface.

Objectifs

Le séquençage Illumina est une méthode qui permet le séquençage de plusieurs **centaines de millions** de fragments d'ADN. L'application de cette « Next generation sequencing » (NGS) permet d'étudier la diversité microbienne dans l'environnement, de séquencer des génomes entiers, ou d'analyser les interactions entre ADN et protéines

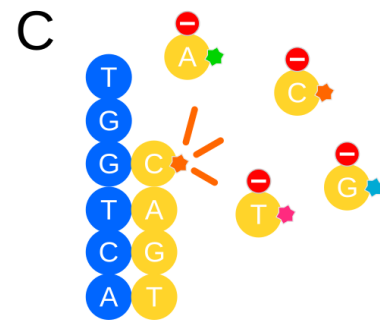
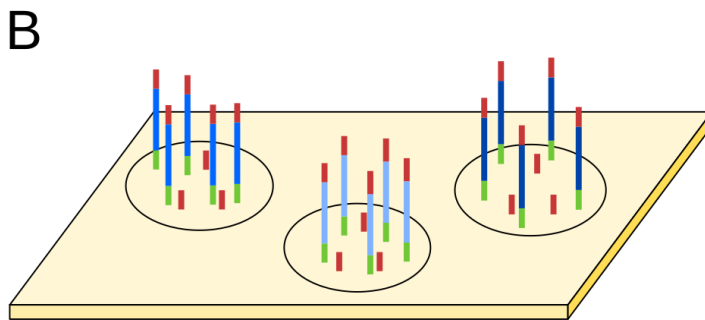
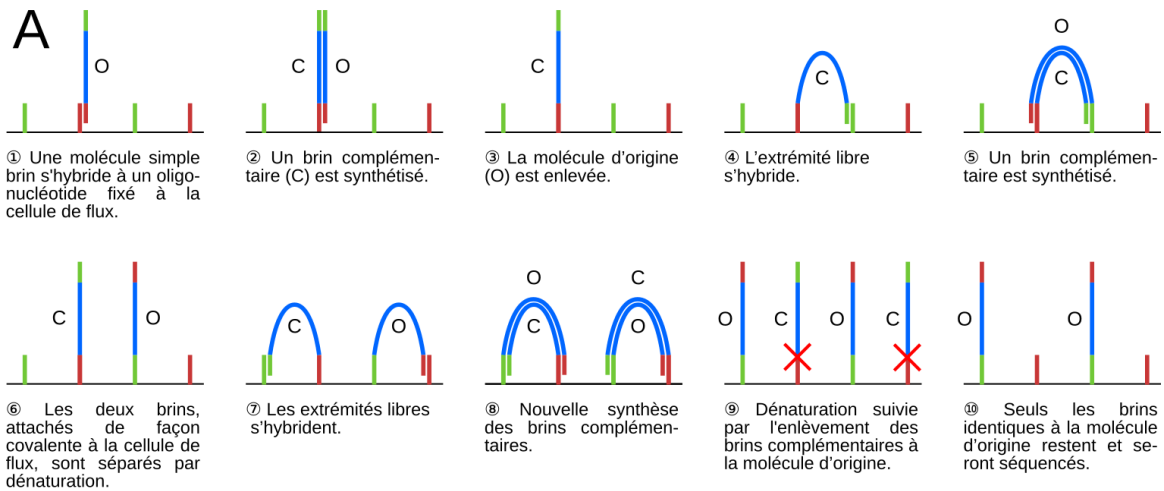
-Principe

Cette technologie se base d'abord sur l'acquisition d'une librairie

Les brins d'ADN sont fragmentés en segments de 100 à 500 pb et sont couplés à leurs extrémités à des séquences particulières (une séquence permettant la liaison, des séquences index et une région complémentaire aux oligonucléotides de la plaque). Ces fragments sont amplifiés en PCR « bridge » en phase solide

Le séquençage est réalisé grâce à un émetteur fluorescent fixé aux nucléotides (un type de nucléotide est associé à un type de longueur d'onde qui lui est propre) 3 .

La technologie Illumina s'appuie sur différentes techniques qui dont le SBS (sequencing by synthesis), la patterned flow cell technology et l'acquisition de données de plusieurs téraoctets



Comment fonctionne la technologie Illumina ?

les molécules d'une banque NGS contiennent des adaptateurs aux extrémités, qui ont deux fonctions principales : (1) l'accrochage et l'amplification sur une cellule de flux (*flow cell*), qui est une plaque en verre où les réactions de séquençage et la visualisation des nucléotides incorporés ont lieu, et (2) l'hybridation d'une amorce qui sert de point de départ pour le séquençage.

Les fragments d'ADN à séquencer sont d'abord dénaturés. Les molécules simple brin obtenues vont alors s'hybrider à différents endroits de la cellule de flux, grâce à la complémentarité de leurs adaptateurs avec les oligonucléotides attachés de façon covalente à la cellule de flux (①).

Suivons le devenir de l'une de ces molécules d'ADN. Un brin complémentaire au brin matrice est synthétisé par une polymérase (②). Ensuite, une étape de dénaturation sépare le brin matrice

d'origine et le brin complémentaire néosynthétisé. Après une étape de lavage, qui permet d'éliminer le brin matrice d'origine (③),

l'extrémité libre du brin complémentaire s'hybride à un oligonucléotide complémentaire fixé à proximité sur la cellule de flux (④). Cela permet une nouvelle synthèse d'un brin complémentaire (et donc identique au brin matrice d'origine, ⑤

), suivie par une nouvelle étape de dénaturation afin de séparer les deux brins. On a alors les deux brins côte à côte sur la cellule de flux (⑥).

Le même processus se répète un certain nombre de fois (⑦,⑧), ce qui aboutit à la formation d'un « **cluster** », un groupe d'un millier de molécules identiques au brin matrice d'origine. Ce processus est connu sous le nom d'**amplification en pont** (*bridge amplification*) dans la littérature

À d'autres endroits de la cellule de flux, se trouvent d'autres clusters correspondant à l'amplification d'autres fragments de la banque d'ADN à séquencer. Cette étape d'amplification est nécessaire à l'obtention d'un **signal** suffisamment important au moment du séquençage

À l'issue de cette étape, des amorces de séquençage s'hybrident à tous les brins de tous les clusters, et servent de point de démarrage du séquençage. Un seul nucléotide **marqué** est incorporé à chaque cycle, suivi par une étape d'imagerie afin de déterminer quel nucléotide a été incorporé dans chaque cluster

Au fil des années, Illumina a agrandi sa gamme de séquenceurs et propose aujourd'hui des machines qui peuvent générer de **4 millions à 20 milliards de** séquences par run, avec une longueur maximum de 150 à 300 pb