**Analyse du gène ddrO\_2545**

Le régulateur transcriptionnel DdrO est codé chez *D. radiodurans* par le gène drO\_2545. **Un motif RDRM est retrouvé dans la région promotrice du gène suggérant que ce régulateur régule l’expression de son propre gène.**

Le but de cette étude est d’analyser son profil transcriptionnel durant la cinétique et ce dans les deux souches W37 et D37. Afin de vous aider dans cette démarche, vous trouverez ci-dessous une série de questions dont les réponses sont dans les données que vous avez produites.

1- Reportez ci-dessous les données DEseq2 (Log2FC et pVal) que vous avez obtenu pour ce gène entre 1H et 6H dans la souche W37 (Deux chiffres après la virgule max)

Log2FC= 0,50 ; P-adj= 0,02

2- Reportez ci-dessous les données DEseq2 (Log2FC et pVal) que vous avez obtenu pour ce gène lors de la cinétique transcriptomique effectuée dans la souche D37

Log2FC= 3,66 ; P-adj= 3,14E-159

3- Quelle rôle décrit dans la littérature a la protéine DdrO sur l’expression des gènes qu’elle régule ?

répresseur

4- Les résultats transcriptomiques que vous avez obtenues dans la W37 et dans la D37 sont-elles cohérentes avec ce rôle ?

Si ddrO régule négativement l’expression de son propre gène.

Pour la W37 on s’attendait à ce que l’expression du gène ne soit pas modifiée, dans les faits il est downrégulé par rapport à 1 heure. Régulation positive ?

Pour la D37 Oui et Non :

- Oui s’il réprime l’expression de son propre gène car dans la D37 on s’attend à ce que la quantité d’ARN augmente puisque la quantité de protéine diminue dans la cellule (perte du plasmide) donc moins de répression transcriptionnelle.

-Non car la transcription du gène dans la D37 augmentant transitoirement (durée de la perte du plasmide), la quantité de la protéine devrait augmenter de façon identique (couplage transcription/traduction chez les bactéries), ce qui diminuerait la transcription puisque c’est un répresseur.

5- Quelle(s) hypothèse(s) pourriez-vous alors formuler pour expliquer ces résultats

- La diminution de la protéine dans la cellule est plus rapide que l’effet de dérépression produit par la diminution de sa quantité. La quantité de protéines alors un rôle clé dans la cellule en tant que régulateur.

- La disparition du répresseur ne suffit pas pour augmenter la transcription. Intervention d’un autre régulateur (activateur) pour augmenter le taux de transcription de ce gène.

- Blocage traductionnel de l’ARNm de DRO\_2545 (ARNas ou autre méthode), le taux d’ARN augmente mais pas celui de la protéine.

- Modification post-traductionnelle de la protéine DdrO qui ne reconnait plus son site opérateur donc ne bloque plus la transcription.

- Dégradation de DdrO par la protéase IrrE bien qu’aucun stress n’ait été appliqué : stress qui ne peut pas être sur le long terme la température car W37 cultivée également à 37°C

- Autres ?

**Creusons un peu l’ensemble des données que vous avez obtenues ainsi que les méthodes que vous avez utilisées.**

6- Reportez ci-dessous la moyenne des comptages de lecture pour ce gène et ce pour les temps 1H et 6H de la cinétique transcriptomique dans la souche W37

1H=

6H=

7- Reportez ci-dessous la moyenne des comptages de lecture pour ce gène et ce pour les temps 1H et 6H de la cinétique transcriptomique dans la souche D37 et comparer les données avec celles issues de la W37.

1H=

6H=

8- Quelle représentation graphique pourriez-vous faire pour comparer le taux d’expression du gène DRO\_2545 avec l’ensemble des autres gènes ? (Pensez à ce que vous avez fait lors du TP bioinfo du socle !). Vous représenterez les figures en annexe 1 pour ces deux temps et pour les deux souches W37 et D37

Une méthode possible : Pour la W37 et pour la D37

- Faire pour l’ensemble des gènes la moyenne des base means des 3 réplicats à 1H et à 6H.-Si on veut comparer le taux de lectures par temps pour une souche donnée il faudrait corriger ces données en fonction du nombre de séquences totales obtenues qui n’est pas la même à ces deux temps donc faire le ratio entre le total à 6H et celui à 1H et appliquer un coefficient correctif pour chaque gène. Puis

- Transformation des données corrigées en log2

- Création d’un histogramme avec l’ensemble des données en log2 et localisation de la classe d’intensité d’expression associée à ce gène (voir annexe1).

9- Quelle est la souche de *D. radiodurans* dont vous avez extrait la séquence du génome pour aligner avec Bowtie2 les séquences obtenues lors de la cinétique transcriptomique ?

Souche sauvage R1

10- En lisant le papier publié en 2021, comment a été construite la souche DddrO au locus génomique ? Comment ont été créées les deux souches D37 et W37 utilisées pour faire le transcriptome ? Quelles régions du gène DRO\_2545 sont présentes dans les deux souches ?

Dans les deux souches W37 et D37, **la CDS** du gène ddrO localisé sur le chromosome 1 a été délétée et remplacée par un gène de résistance au chloramphénicol exprimé à partir de son propre promoteur. Il reste néanmoins les séquences 5’UTR et 3’UTR du gène ddrO sur le chromosome, donc le promoteur du gène ddrO. Les deux souches expriment le gène complet sous le contrôle de son propre promoteur et de ses propres séquences de régulation à partir d’un vecteur dans lequel l’ensemble des séquences ont été clonées. Dans la souche D37 ce vecteur d’expression est à réplication thermosensible.

11- Quelle est alors l’origine des séquences RNA-seq que Bowtie2 a affecté à DRO\_2545 lors des alignements de séquence ?

12- Comment visualiser sous forme graphique les données de RNA-seq au locus DRO\_2545 ? Vous présenterez en annexe2 une capture d’écran de vos résultats pour la souche W37 et D37 aux temps 1H et 6H. N’oubliez pas de charger le fichier gff3 !

13- Qu’observez-vous sur cette figure ? (commentez uniquement la situation du gène DRO-2545). Est-ce que ces résultats vous paraissent cohérents ?

14- Ces données vous permettent-elles de mieux comprendre les résultats de comptage des séquences reportés aux questions 6 et 7

15- Si on repose la question de l’expression et de la régulation du gène DRO\_2545, par la protéine qu’elle produit que montre l’ensemble de ces résultats ?







