

	<p style="text-align: center;">ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 / 2020 SESSION 1</p> <p>PARCOURS / ETAPE : Master Bioinformatique/Agrosciences Code UE : 4TBI804U NGS Epreuve : Cours Date : 04/05/20 Heure : 14h00-16h00 Durée : 1h30 Documents : non autorisés Epreuve de M/Mme : P. Sirand-Pugnet et P. Thébault</p>	<p style="text-align: center;">Collège Sciences et technologies</p>
---	--	--

Ce sujet est basé sur la publication suivante:

Josi C, Bürki S, Vidal S, Dordet-Frisoni E, Citti C, Falquet L, Pilo P. Large-Scale Analysis of the Mycoplasma bovis Genome Identified Non-essential, Adhesion- and Virulence-Related Genes. Front Microbiol. 2019 Sep 13;10:2085.

Un des buts de cette étude est d'identifier les gènes de la bactérie *Mycoplasma bovis* (pathogène de ruminant) qui sont indispensables à sa croissance *in vitro*. Afin de les identifier, les auteurs ont réalisé une mutagenèse de la bactérie à l'aide d'un transposon (Tn4001). Ce transposon est un élément génétique mobile qui s'intègre aléatoirement dans le génome et les conditions sont telles qu'un seul transposon s'intègre par génome. L'intégration d'un transposon dans un gène conduit généralement à l'inactivation de celui-ci. Les mutants ayant intégré un transposon dans un gène essentiel à la vie de la bactérie sont contre-sélectionnés et disparaissent donc de la population. Une stratégie basée sur le séquençage NGS des sites d'intégration du transposon dans une banque d'environ 4000 mutants a été utilisée pour distinguer d'une part les gènes dont l'inactivation n'affecte pas significativement la croissance *in vitro* et d'autre part, les gènes essentiels à cette croissance.

Un extrait (adapté) du matériel et méthode est reporté ci-dessous :

DNA Library Preparation for Transposon Sequencing on the Illumina NextSeq Platform

DNA samples from the bacterial population of mutants were prepared for transposon sequencing on the Illumina NextSeq Platform. Two major steps were performed: (1) Enrichment of amplicons from the transposon-junctions and (2) Amplification of the library to add Illumina adapters. The method is briefly described here : A method for amplicon library preparation was set up involving biotinylated primers specific for the inserted transposon present in M. bovis mutants. Purifications of amplicons were done using streptavidin-coated magnetic beads in order to limit the amount of genomic DNA. Amplicons of the transposon-junction sequences were prepared using a non-restrictive linear amplification-mediated PCR (nrLAM-PCR) approach (Gabriel et al., 2009). Tn4001 junction sequences from the genomic DNA of the bacterial samples were enriched by linear PCR using the biotinylated transposon specific primer T1_Biotin. Briefly, Pfu polymerase (Genaxxon

bioscience GmbH, Ulm, Germany) was used and the extension time was adjusted to 35 sec (Paruzynski et al., 2010). To get more amplification product, 10 separate PCR reactions had to be performed.

- 1- Dans cette « PCR linéaire », les auteurs n'utilisent qu'un seul primer (T1_Biotin). Pourquoi ? (3 points)**
- 2- Pourquoi est-il nécessaire de réaliser 10 amplifications pour avoir assez de matériel, contrairement à une PCR classique ? (2 points)**

The first magnetic capture using Dynabeads M-280 streptavidin (Thermo Fisher Scientific) was performed following a previously established protocol with LiCl washing steps and a 15 h incubation step at room temperature (Paruzynski et al., 2010). After incubation, the DNA-beads complex was washed twice with 500 µL ddH₂O. A deoxycytosine homopolymer tail (C-tail) of controlled length using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Thermo Fisher Scientific) was added to the linear amplification products directly on the beads following a protocol described by Lazinski and Camilli (2013).

- 3- Représentez schématiquement les molécules obtenues à l'issue de ces étapes. (4 points)**
- 4- Pourquoi est-il indispensable d'ajouter une queue poly-C aux produits de l'amplification linéaire ? (2 points)**

Subsequent exponential PCR reactions were performed using TaKaRa Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France) (Dawoud et al., 2014). Elongation time of the exponential PCRs was adjusted to 10 sec compared to the protocol published by Paruzynski et al. (2010). The first exponential PCR was performed using a nested biotinylated transposon specific primer (T3_Biotin) and a C-tail specific linker primer (PolyG_Linker).

The combination of nrLAM-PCR with homopolymer tail-mediated ligation PCR (HTML-PCR) was previously published (Dawoud et al., 2014). Amplicon library was sent to Microsynth (Microsynth AG, Balgach, Switzerland) for adding Illumina adapters. The library was gel purified, quantified, and sequenced with Illumina NextSeq 1 × 75 bp high-output.

- 5- Les auteurs ont utilisé la technologie Illumina pour le séquençage. Que pensez-vous de ce choix ? Pensez-vous qu'une autre technologie de séquençage aurait été plus adaptée ? Justifiez votre réponse ? (3 points)**

La qualité des lectures obtenues est analysée avec l'outil FASTQC. Des extraits du compte-rendu d'analyse sont représentés ci-dessous.

- 6- Que pensez-vous de la qualité globale des séquences ? Justifiez votre réponse. (2 points)**
- 7- Comment interprétez-vous le graphique « Per base sequence content » ? Comment expliquez-vous la différence flagrante entre les 35 premières positions et les suivantes ? (4 points)**

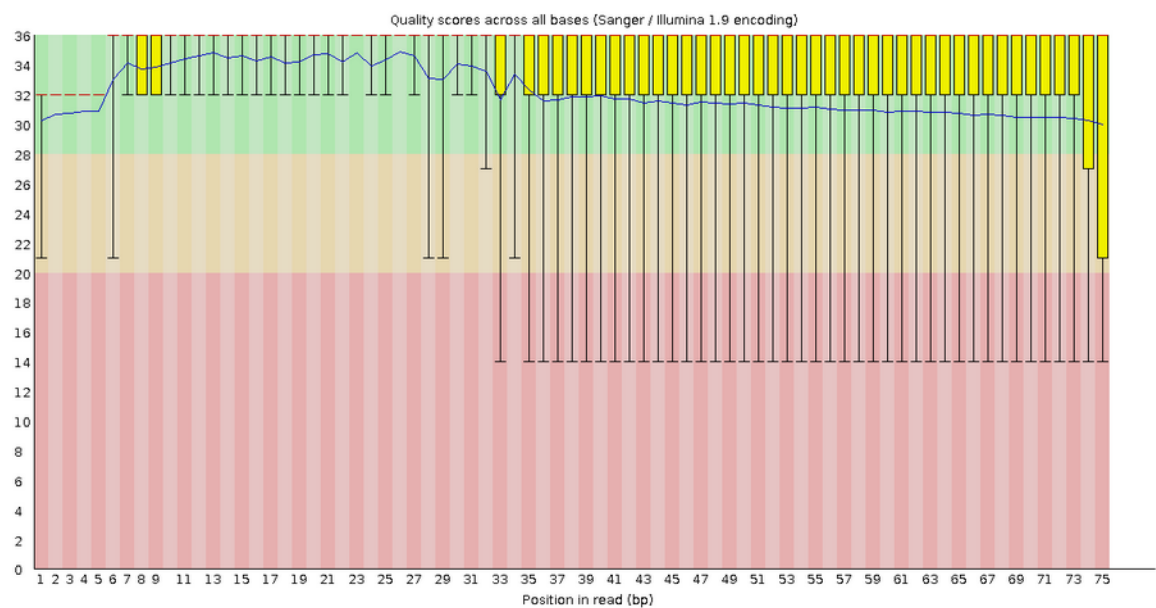


Basic Statistics

Measure	Value
Filename	RAW_ER33089581_Input1_358_R1_001_fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	38690201
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	10-75
%GC	40



Per base sequence quality



Per base sequence content

