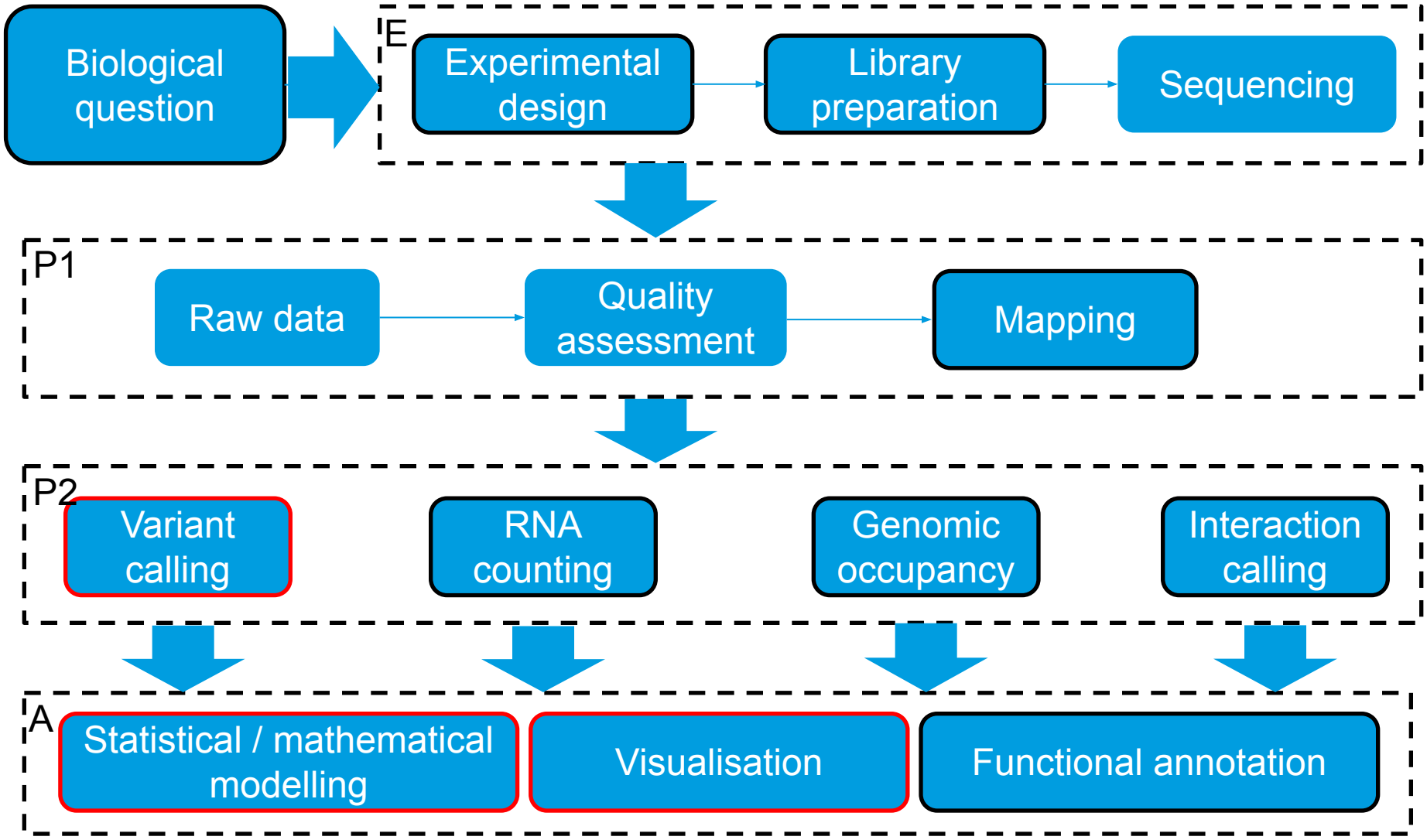
université de BORDEAUX

Introduction: Analyse de variants génomiques et de données RNA-seq

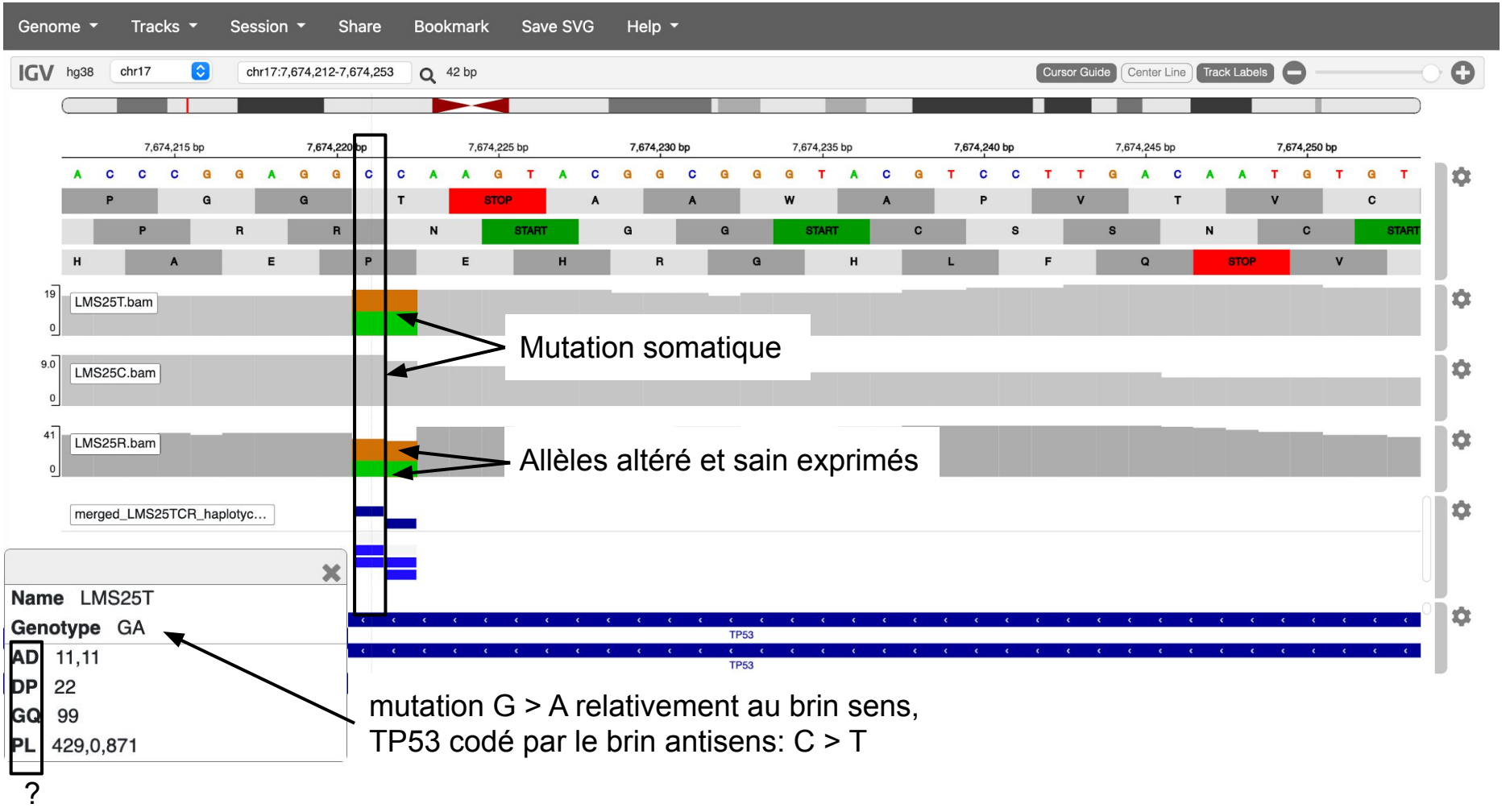
université de BORDEAUX

Pipeline bioinformatique

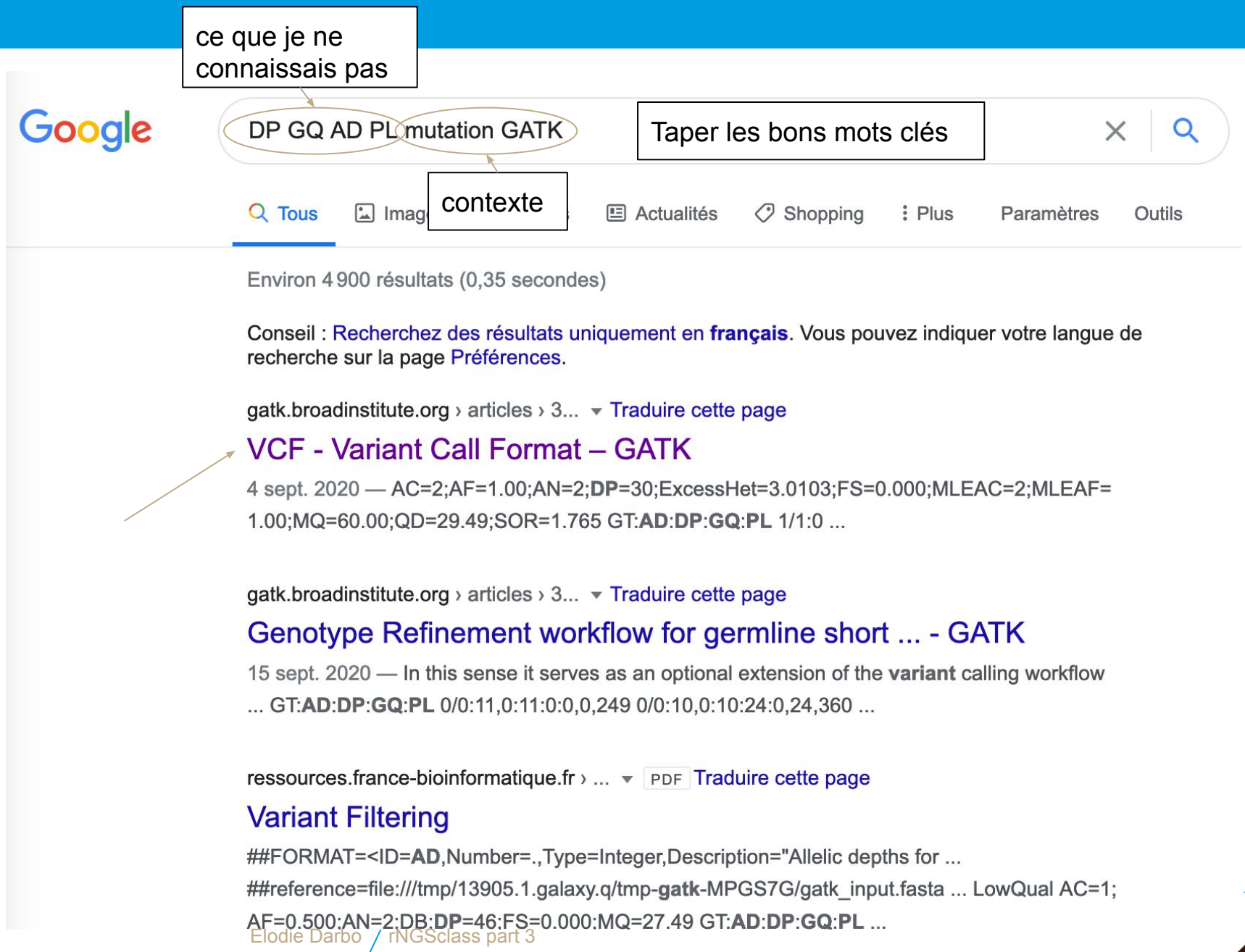


Integrative Genome Viewer

- Visualisation des reads et détection du variant à la position 7674221 sur le chromosome 17



Recherche d'informations



Recherche d'informations

PL

"Normalized" Phred-scaled likelihoods of the possible genotypes. For the typical case of a monomorphic site (where there is only one ALT allele) in a diploid organism, the PL field will contain three numbers, corresponding to the three possible genotypes (0/0, 0/1, and 1/1). The PL values are "normalized" so that the PL of the most likely genotype (assigned in the GT field) is 0 in the Phred scale. We use "normalized" in quotes because these are not probabilities. We set the most likely genotype PL to 0 for easy reading purpose.The other values are scaled relative to this most likely genotype.

Keep in mind, if you are not familiar with the statistical lingo, that when we say PL is the "Phred-scaled likelihood of the genotype", we mean it is "How much less likely that genotype is compared to the best one". Have a look at this article for an example of how PL is calculated.

GQ

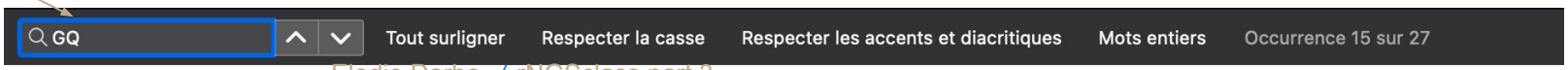
The Genotype Quality represents the Phred-scaled confidence that the genotype assignment (GT) is correct, derived from the genotype PLs. Specifically, the GQ is the difference between the PL of the second most likely genotype, and the PL of the most likely genotype. As noted above, the values of the PLs are normalized so that the most likely PL is always 0, so the GQ ends up being equal to the second smallest PL, unless that PL is greater than 99. In GATK, the value of GQ is capped at 99 because larger values are not more informative, but they take more space in the file. So if the second most likely PL is greater than 99, we still assign a GQ of 99.

Basically the GQ gives you the difference between the likelihoods of the two most likely genotypes. If it is low, you can tell there is not much confidence in the genotype, i.e. there was not enough evidence to confidently choose one genotype over another. See the FAQ article on the Phred scale to get a sense of what would be considered low.

Not to be confused with the site-level annotation QUAL; see this FAQ article for an explanation of the differences in what they mean and how they should be used.

A few examples

recherche dans la page



Recherche d'informations

AD and DP

Allele depth (AD) and depth of coverage (DP). These are complementary fields that represent two important ways of thinking about the depth of the data for this sample at this site.

AD is the unfiltered allele depth, *i.e.* the number of reads that support each of the reported alleles. All reads at the position (including reads that did not pass the variant caller's filters) are included in this number, except reads that were considered uninformative. Reads are considered uninformative when they do not provide enough statistical evidence to support one allele over another.

DP is the filtered depth, at the sample level. This gives you the number of filtered reads that support each of the reported alleles. You can check the variant caller's documentation to see which filters are applied by default. Only reads that passed the variant caller's filters are included in this number. However, unlike the AD calculation, uninformative reads are included in DP.

See the Tool Documentation for more details on AD (DepthPerAlleleBySample) and DP (Coverage) for more details.

PL

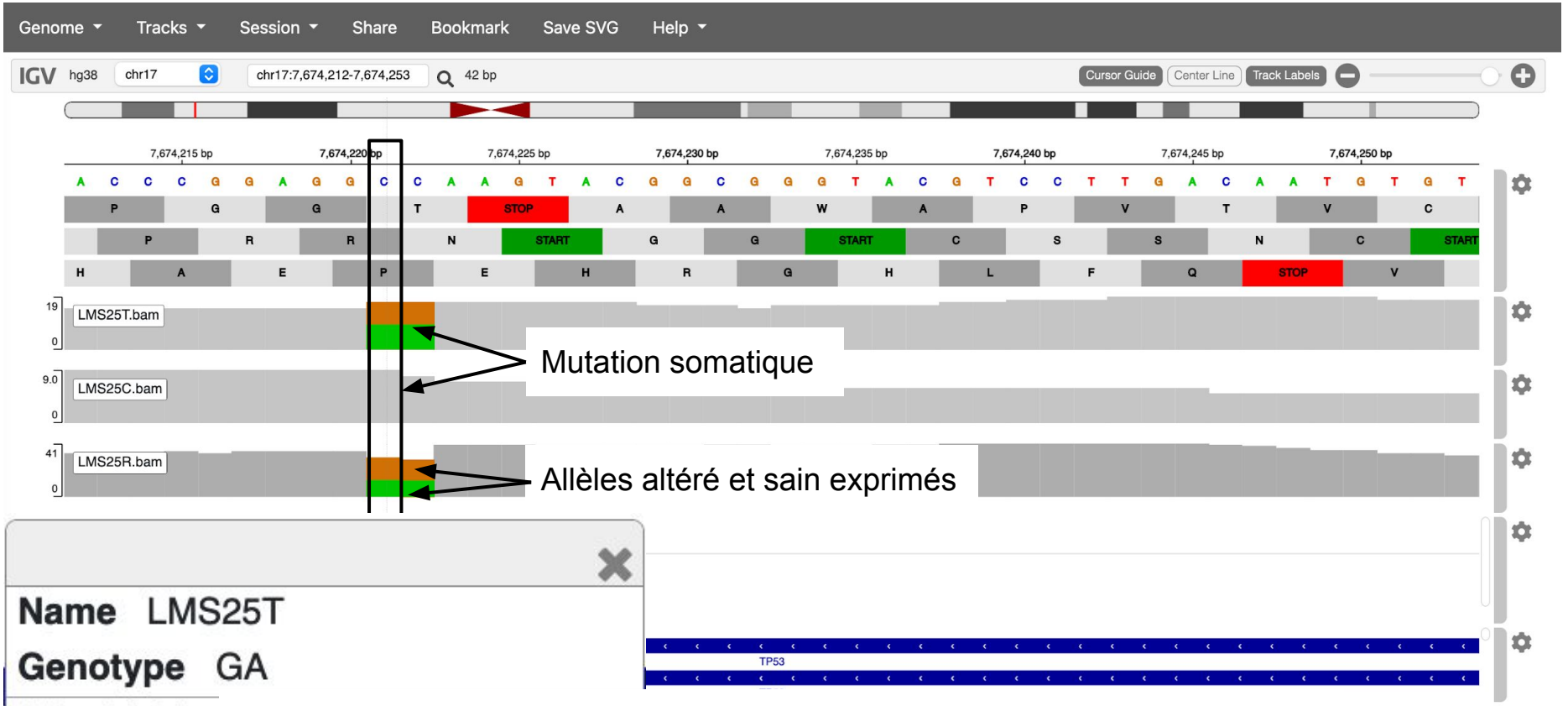
"Normalized" Phred-scaled likelihoods of the possible genotypes. For the typical case of a monomorphic site (where there is only one ALT allele) in a diploid organism, the PL field will contain three numbers, corresponding to the three possible genotypes (0/0, 0/1, and 1/1). The PL values are "normalized" so that the PL of the most likely genotype (assigned in the GT field) is 0 in the Phred scale. We use "normalized" in quotes because these are not probabilities. We set the most likely genotype PL to 0 for easy reading purpose.The other values are scaled relative to this most likely genotype.

Keep in mind, if you are not familiar with the statistical lingo, that when we say PL is the "Phred-scaled likelihood of the genotype", we mean it is "How much less likely that genotype is compared to the best one". Have a look at this article for an example of how PL is calculated.

GQ

Integrative Genome Viewer

- Visualisation des reads et détection du variant à la position 7674221 sur le chromosome 17



couverture allèle de référence: 11 reads, couverture allèle alternatif: 11 reads

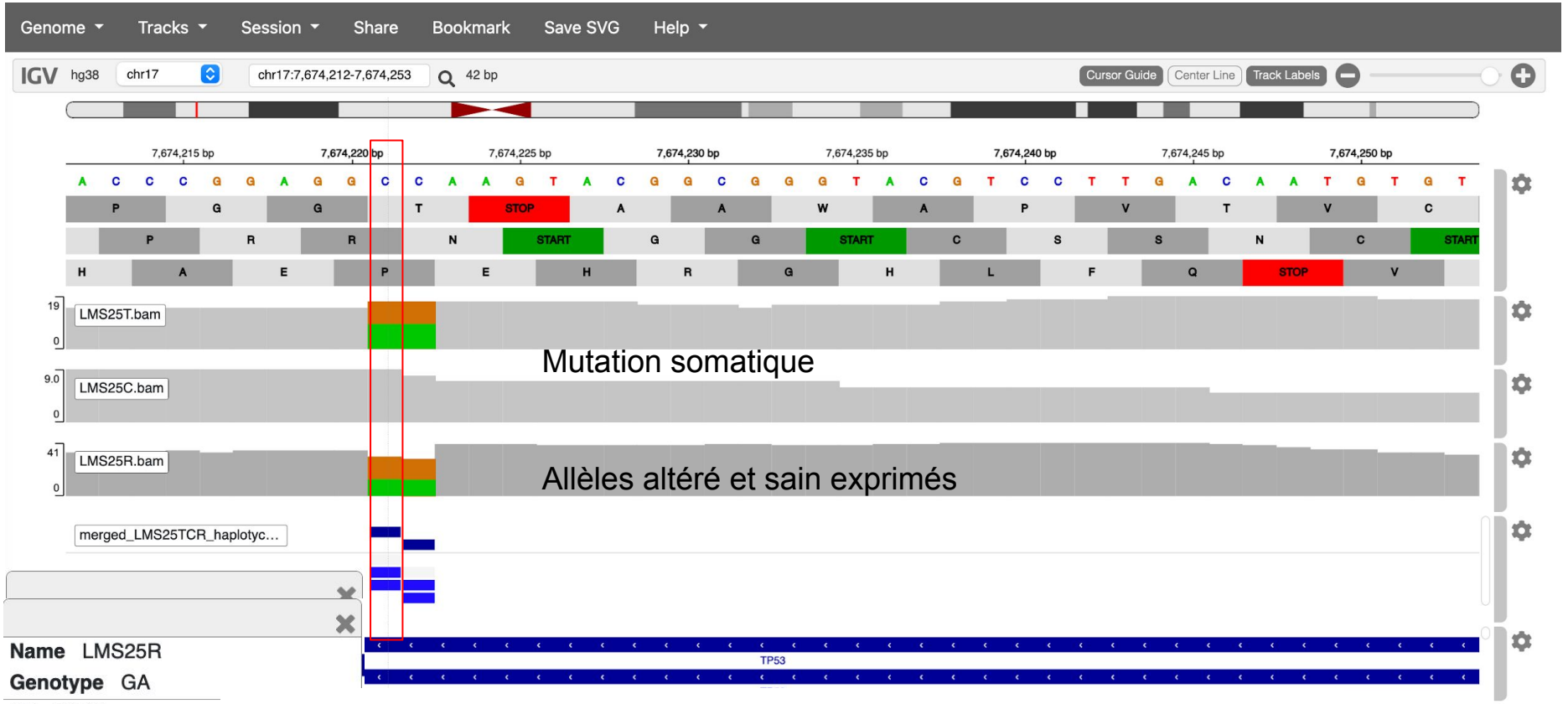
couverture totale de la position: 22 reads

confiance la plus haute dans le génotype estimé

0/0, 0/1, 1/1: 0/1: génotype hétérozygote est le plus probable

Integrative Genome Viewer

- Visualisation des reads et détection du variant à la position 7674221 sur le chromosome 17



couverture allèle de référence: 17 reads, couverture allèle alternatif: 24 reads

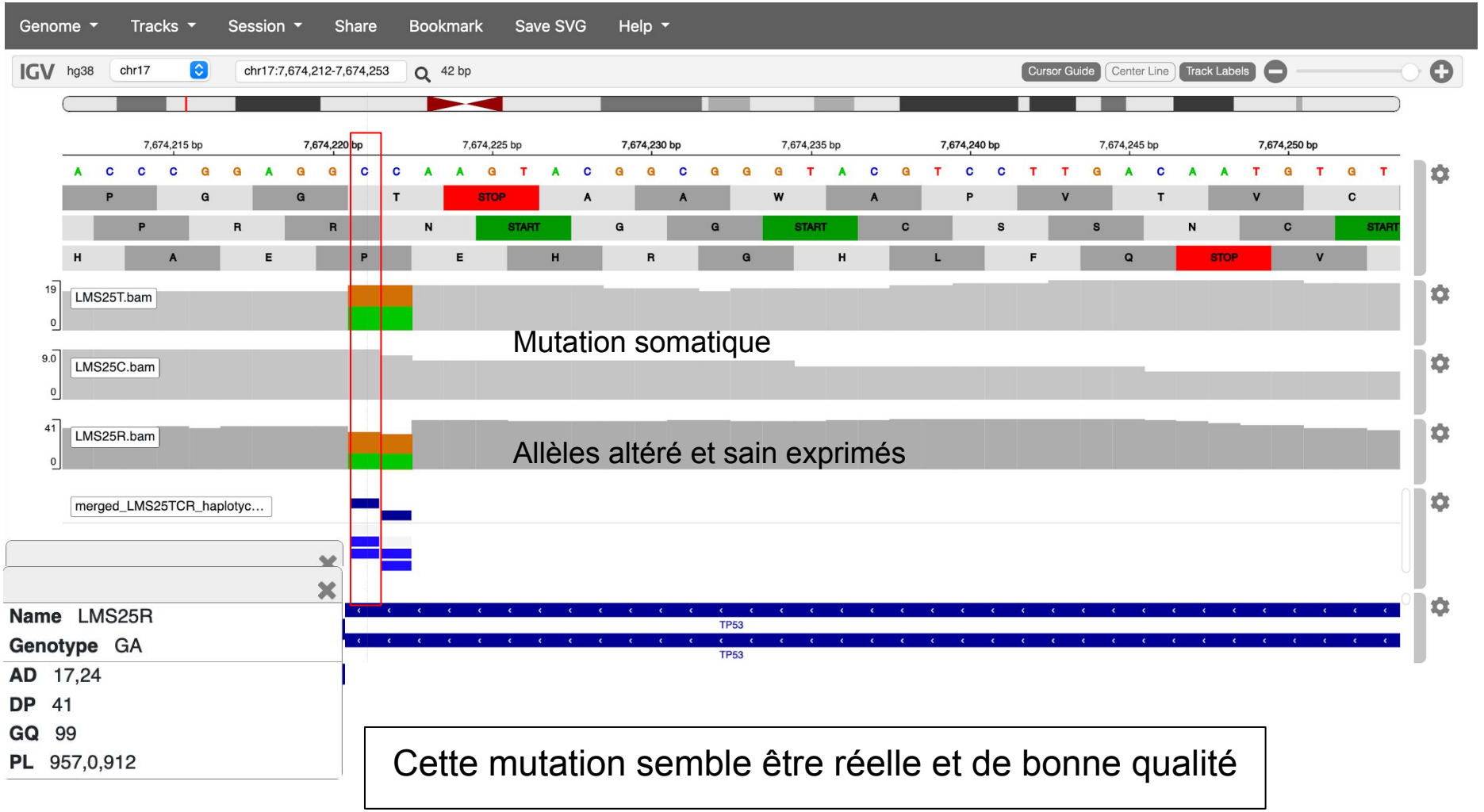
couverture totale de la position: 41 reads

confiance la plus haute dans le génotype estimé

0/0, 0/1, 1/1: 0/1: génotype hétérozygote est le plus probable

Integrative Genome Viewer

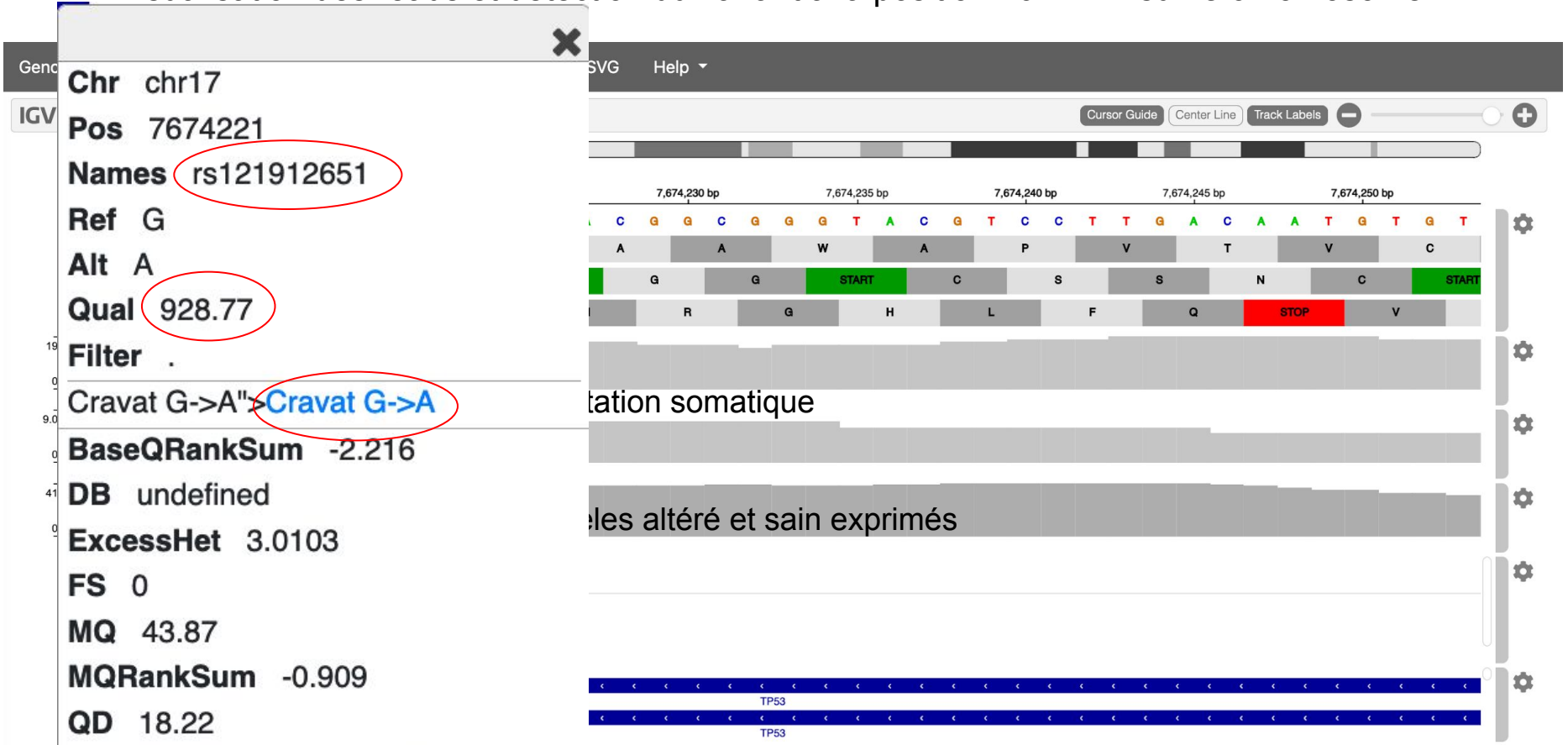
- Visualisation des reads et détection du variant à la position 7674221 sur le chromosome 17



Cette mutation semble être réelle et de bonne qualité

Integrative Genome Viewer

- Visualisation des reads et détection du variant à la position 7674221 sur le chromosome 17

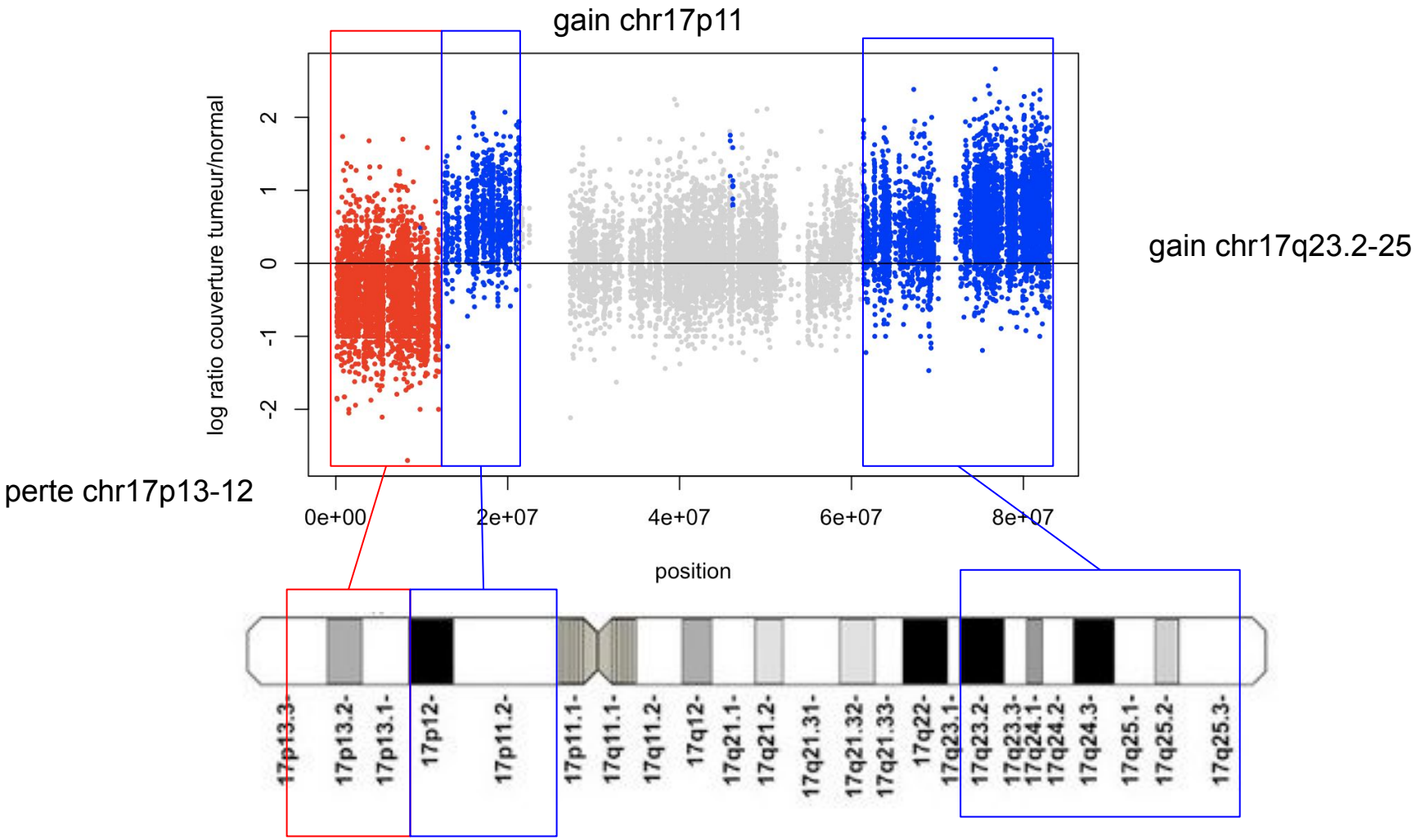


Résumé

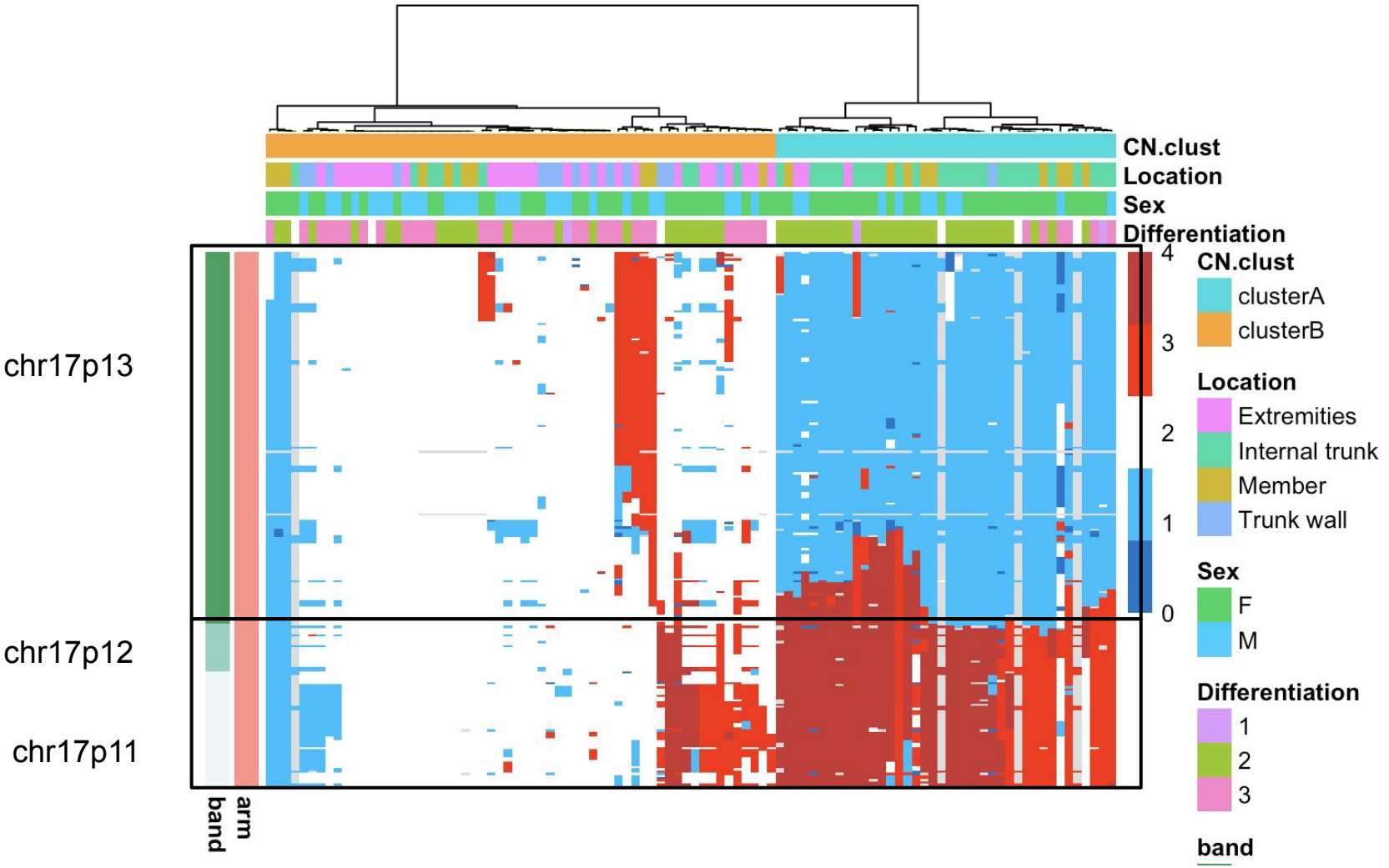
- ID: rs121912651, COSV52662035
- Changement protéique: p.Arg237Trp
- Effet de la mutation: perte du rôle supresseur de tumeur et gain de fonction qui peut promouvoir la tumorigénèse.
- Fréquence dans la population faible
- Zhang, Y., Coillie, S., Fang, JY. et al. Gain of function of mutant p53: R282W on the peak?. Oncogenesis 5, e196 (2016):

p53 est un facteur de transcription, notamment impliqué dans les mécanismes de mitose et de mort programmée. La mutation de son gène codant en position 7 674 221pb est dominante autosomique. Cette mutation non synonymes présente dans de nombreux cancers est ainsi qualifié d'Hot spot. Elle amène un GOF (Gain of function) à la protéine p53 : cette mutation affecte la structure de l'hélice H2 de la protéine, résultant à une perte de liaison H et à la dissociation du motif boucle-feuillet-hélice. Cela amène à une déstabilisation thermodynamique de la protéine en plus de toucher le repliement de la protéine. p53 est ainsi plus dénaturée à 37°C, la température corporelle. Enfin la mutation touche la partie de liaison de p53 avec les protéines Bcl. Cette liaison est primordiale pour l'exercice de leur fonction puisqu'elle résulte à la permalisation de la membrane externe des mitochondries puis à l'apoptose. (4)

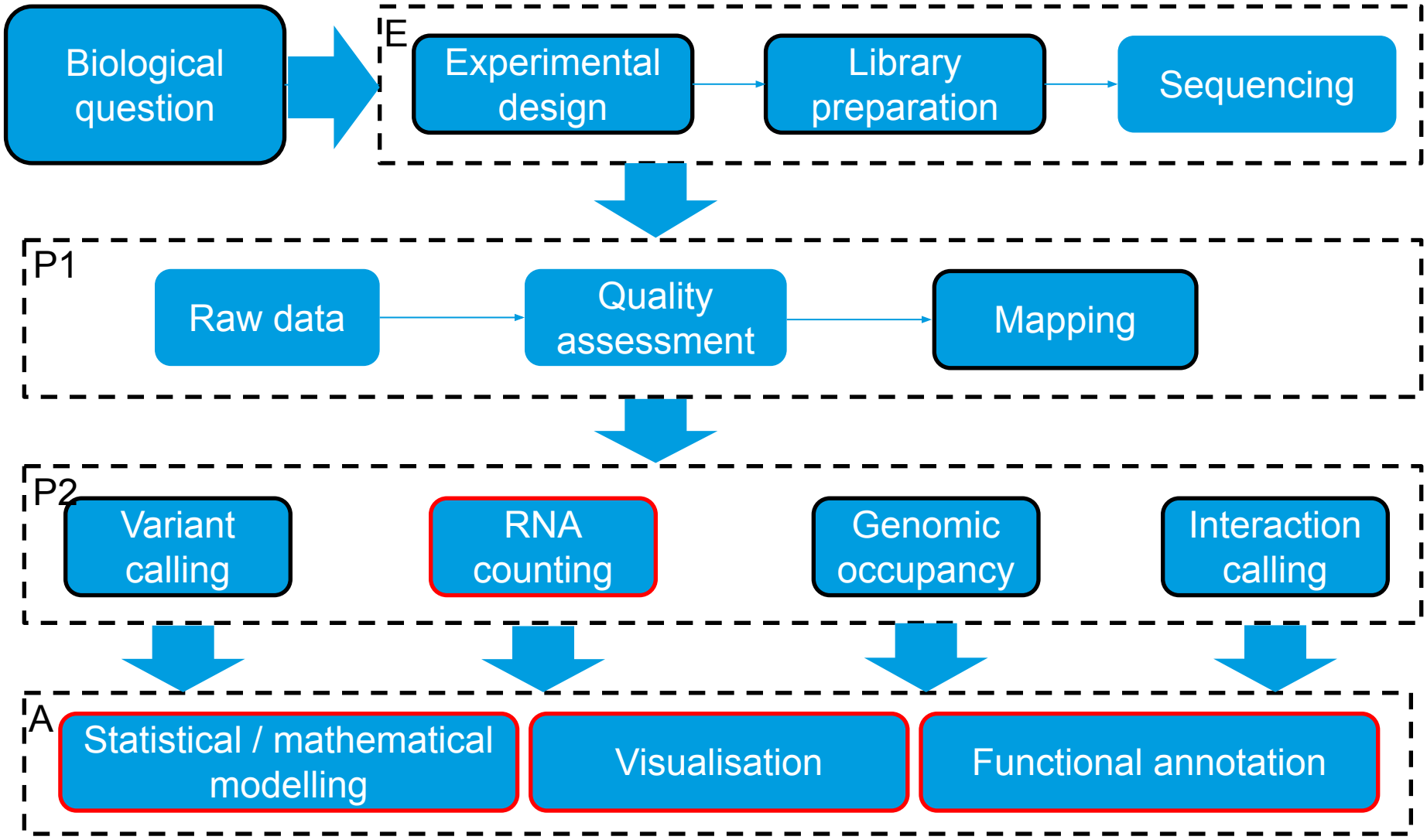
Copy Number Variation



Copy Number Variation



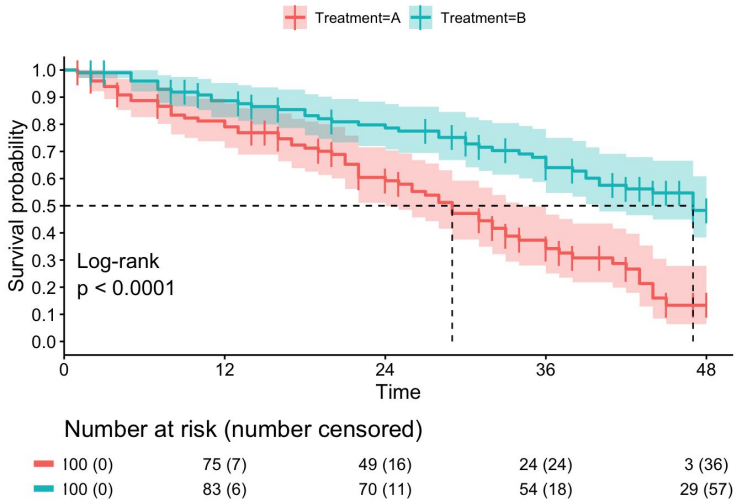
Pipeline bioinformatique



Analyse de survie: courbe de Kaplan Meier

L'estimateur de Kaplan-Meier est utilisé pour estimer la fonction de survie. La représentation visuelle de cette fonction est généralement appelée la courbe de Kaplan-Meier, et elle montre la probabilité d'un événement (par exemple, la survie) à un certain intervalle de temps. Si la taille de l'échantillon est suffisamment importante, la courbe doit se rapprocher de la véritable fonction de survie pour la population étudiée.

Elle compare généralement deux groupes dans une étude (par exemple, un groupe qui a reçu le traitement A et un groupe qui a reçu le traitement B).



Le traitement B semble donner de meilleurs résultats que le traitement A (durée médiane de survie de +/- 47 mois contre 30 mois avec une valeur p significative).

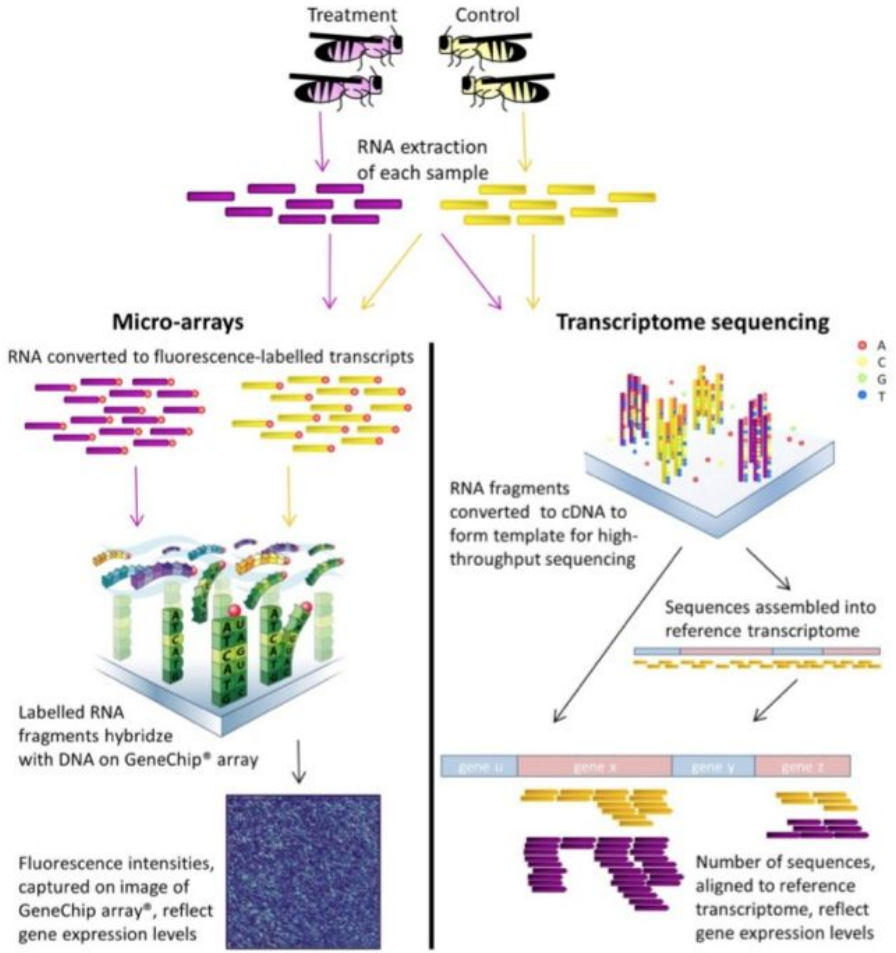
https://towardsdatascience.com/kaplan-meier-curves-c5768e349479

A propos du RNA-seq

- Pourquoi utilise-t'on du RNA-seq?

- Normalisation

cDNA micro-arrays vs RNA-seq



From: Wertheim B. *in* Functional Genomics (Eds. G. Meroni and F. Petrera), 2012

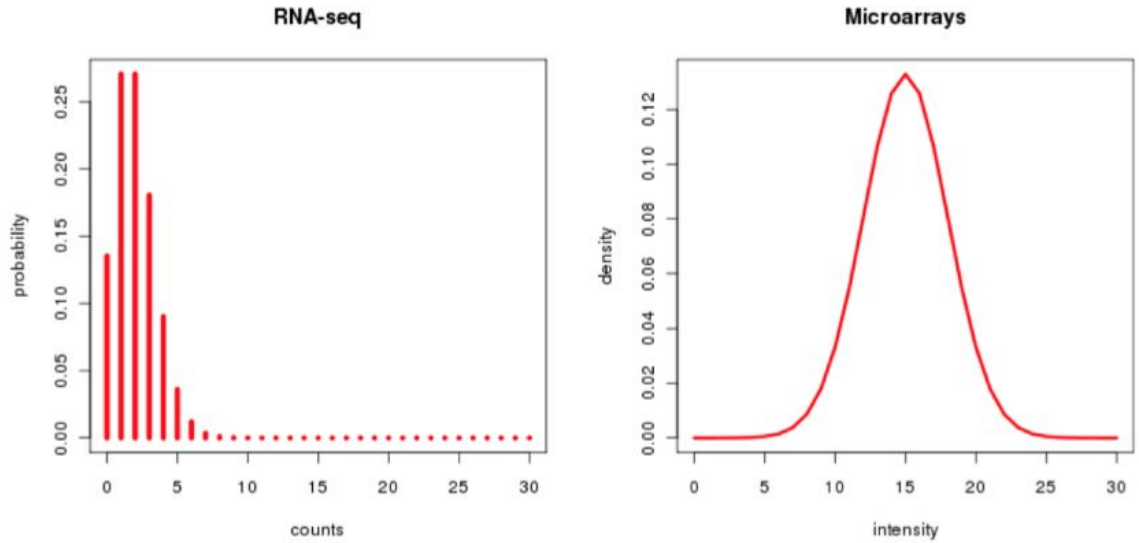
cDNA micro-arrays vs RNA-seq

- avantages du RNA-seq
  - Transcriptome de référence non nécessaire
  - Identification de nouveaux transcrits
  - Intervalles de mesure plus important (plus précis & plus sensible)
  - Reproductible
  - Peut-être adapté à de nouvelles questions

- avantage des micro-arrays
  - Prix
  - Plus petite quantité d'ARN
  - Plus de recul

cDNA micro-arrays vs mesures de RNA-seq

Ce sont des comptes discrets mappés sur des régions d'intéret



Les méthodes développées pour les micro-arrays ne sont pas applicables au RNA-seq

Pourquoi utilise-t'on le RNA-seq?

- 2 objectifs principaux:
  - Quantitatif:
    - Expression différentielle
    - Epissage alternatif
    - TSS / polyA alternatif
  - Qualitatif :
    - structure des mRNAs : jonction exon/intron, identification des sites TSS et polyA, transcrits de fusion)
    - Assemblage du transcriptome
    - Analyse des SNPs

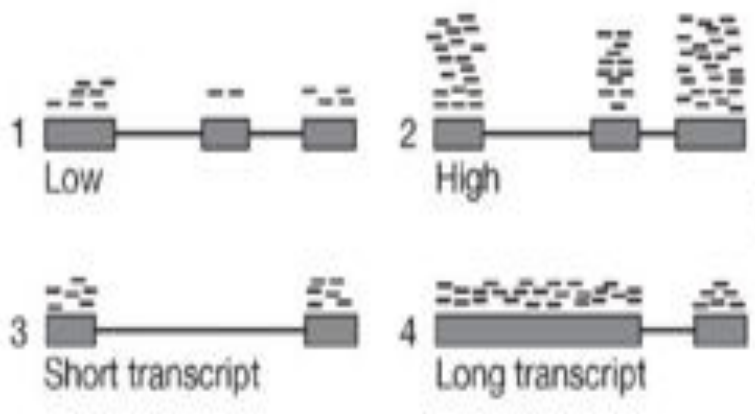
Pourquoi doit-on normaliser?

- Il y a des biais systématiques (techniques et biologiques) qui impactent les résultats
- Vrai pour toutes les analyses de données NGS mais certains biais sont spécifiques aux technologies.
- Essentiel pour les analyses quantitatives

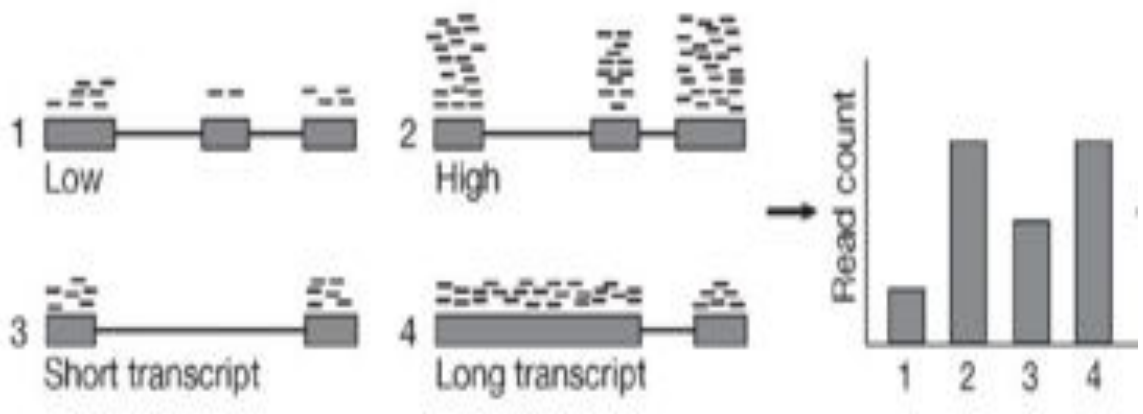
Quels biais?

- Composition des séquences (GC content)
- PCR amplification
- Effet de batch
- Profondeur (nombre total de reads séquencés et mappés)
- Longueur des gènes *
- La taille de la librairie

Longueur des gènes



Longueur des gènes



Le nombre attendu de reads dans une librairie est proportionnel au nombre total de transcrits fois la longueur des gènes.

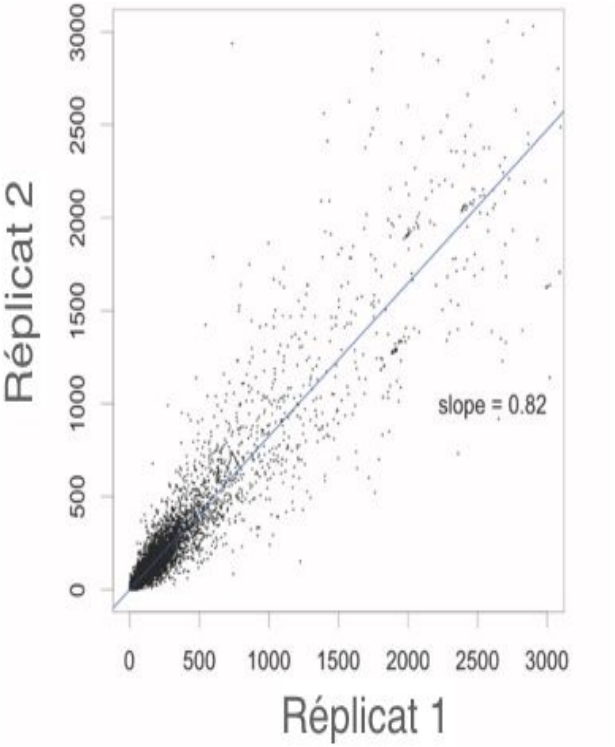
Taille de la librairie

	Sample 1	Sample 2
Gene 1	15	30
Gene 2	24	48
. .	. .	. .
Gene 20,000	345	690

Taille de la librairie

	Sample 1	Sample 2
Gene 1	15	30
Gene 2	24	48
. .	. .	. .
Gene 20,000	345	690
Total number of reads	10,000,000	20,000,000

Taille de la librairie (entre réplicats)

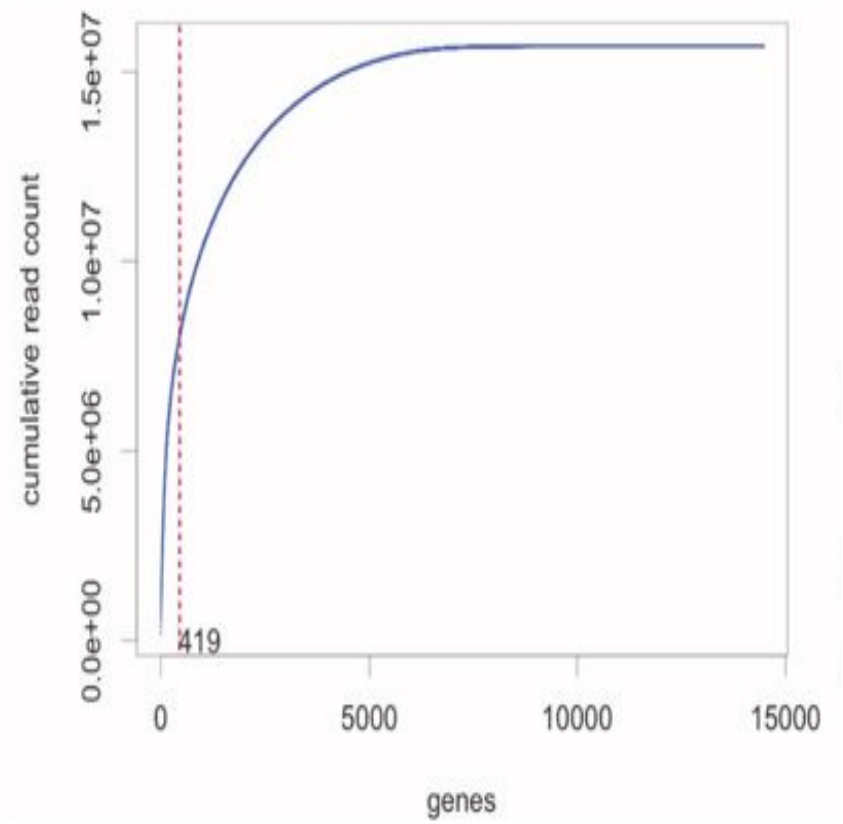


Idéalement tous les points devraient se trouver sur la ligne de pente 1

Le ratio entre les 2 réplicats devrait être 1
----> En fait c'est 0.82, nous devons normaliser par ce nombre.

Utiliser la pente réelle comme *facteur de normalisation ou size factor*

Taille de la librairie (entre conditions)



Dans différentes conditions biologiques, différents ARNs sont exprimés, ce qui mène à une quantité totale d'ARNs différente

La majorité des gènes n'est pas exprimée

Le but de la normalisation est de minimiser l'effet des séquences majoritaires

Concept de taille de librairie ***effective*: edgeR**

Trimmed Mean of M-values (Robinson et al. 2010) (edgeR)

Meilleure hypothèse: l'output entre échantillon est similaire pour un set de gènes G
Objectif: identifier un sous-jeu de gènes non exceptionnel

Etape 1: Calcule le log ratio et compte total entre deux échantillons

Etape 2: Exclus les gènes avec des log ratio extrêmes (i.e. changements massifs entre deux échantillons) ou avec des comptes extrêmes (ceux qui tombent dans le x% quantile pour une de ces mesures

Etape 3: Calcule un facteur de normalisation basé sur les gènes restants

Enrichissement fonctionnel à partir de gènes différentiellement exprimés

A partir des données d'expression des gènes, nous pouvons détecter les gènes dont l'expression diffèrent entre 2 groupes.

Est ce que ces gènes sont impliqués dans des voies biologiques particulières ?

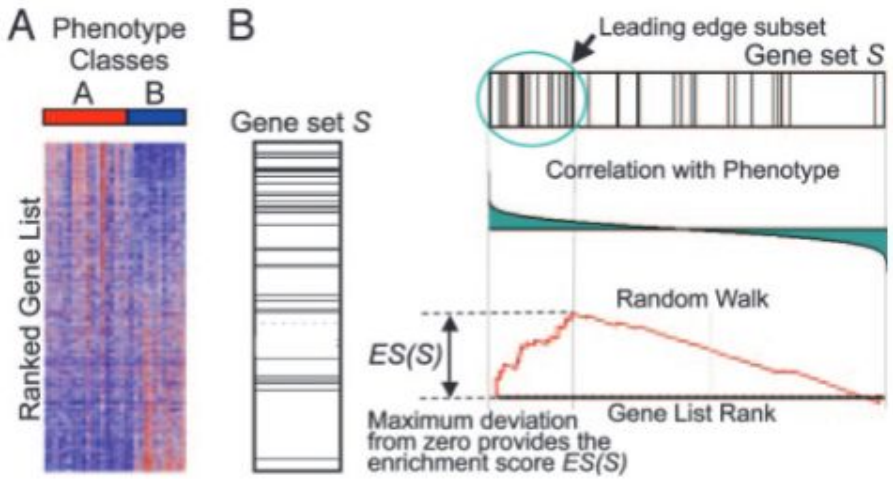
2 solutions

- A partir de la liste des gènes ordonnée par la différence d'expression
- A partir de listes de gènes significativement différentiellement exprimés

A Broad institute tool (http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp)

How does work GSEA?

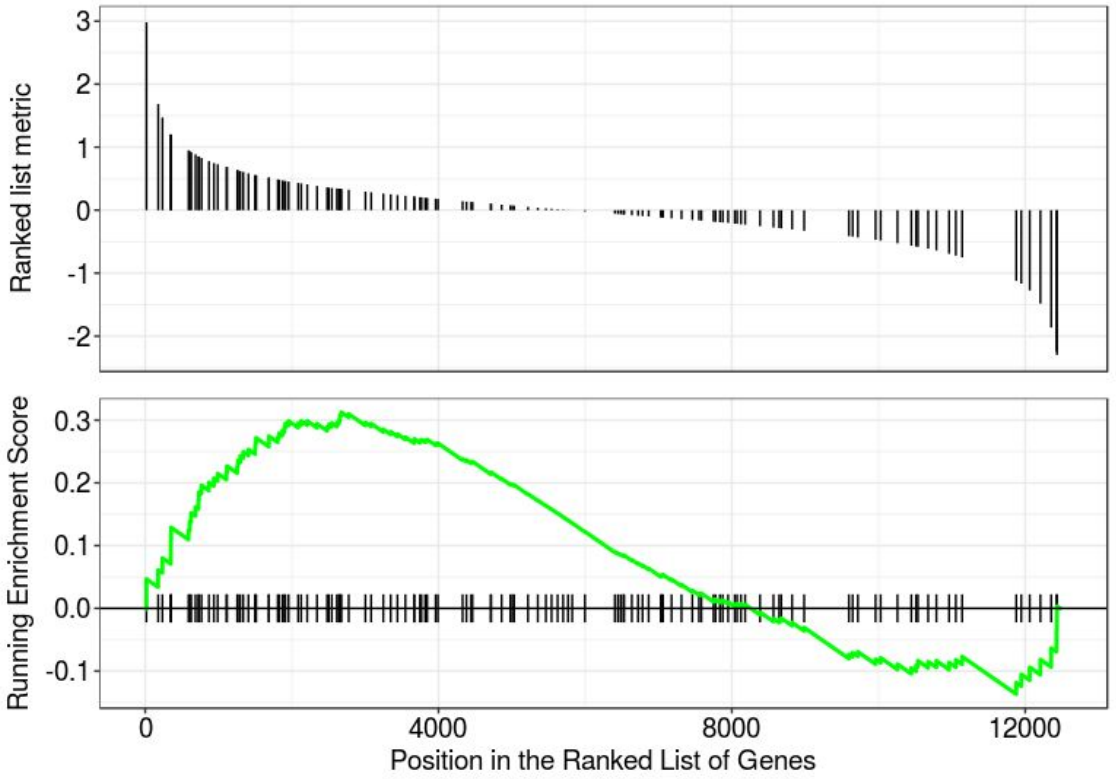
(http://software.broadinstitute.org/gsea/doc/subramanian_tamayo_gsea_pnas.pdf)



- Est ce que la distribution du groupe de gènes suis une distribution continue de probabilités?
  - pondérée (taille du groupe de gènes) statistique Kolmogorov-Smirnov-like
- Est ce significatif?
  - permutation des labels et p-valeur nominale + correction multi-testing

How does work GSEA?

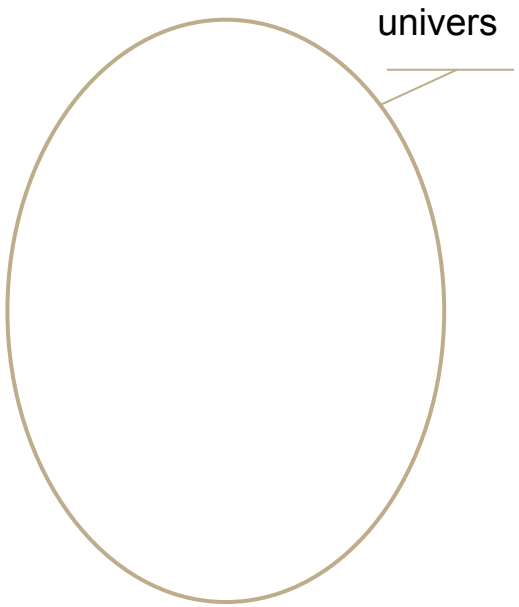
(http://software.broadinstitute.org/gsea/doc/subramanian_tamayo_gsea_pnas.pdf)



Enrichissement fonctionnel dans une liste de gènes

- Est ce que la proportion de gènes observée d'un pathway est due au hasard?

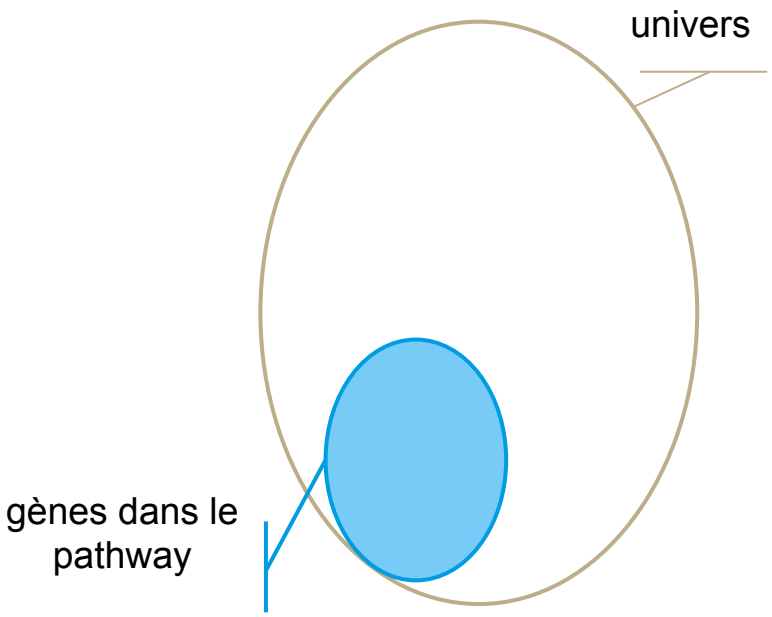
  → test hypergeométrique



Enrichissement fonctionnel dans une liste de gènes

- Est ce que la proportion de gènes observée d'un pathway est due au hasard?

  → test hypergéometrique



Enrichissement fonctionnel dans une liste de gènes

- Est ce que la proportion de gènes observée d'un pathway est due au hasard?

  → test hypergéometrique