Radiation Desiccation Response Regulated genes in the Radioresistant Bacterium Deinococcus radiodurans

Santiago Holguin Urbano

Analyse de données multi-omiques

Table de matières

https://github.com/HOLGUINsantiago/Regulated_genes_in_D.-radiodurans

Introduction

La bactérie *Deinococcus radiodurans* possède des caractéristiques génomiques et protéiques qui lui confèrent une résistance à la radioactivité . Cette résistance repose sur une réponse rapide de la machinerie transcriptionnelle, impliquant un changement structurel de la protéine Irre, et la dégradation de l'inhibiteur DdrO par cette dernière. Suite à cette dégradation, des gènes spécifiques impliqués dans une réponse ciblée aux conditions radioactives sont libérés. En 2021, des chercheurs de l'I2BC ont réalisé une analyse génomique complète de cet organisme.

Cette analyse a permis d'identifier une liste de gènes candidats potentiellement régulés par le facteur de transcription DdrO. Cette liste a été obtenue à partir de 3 approches différentes : une analyse transcriptomique visant à déterminer les gènes exprimés en l' absence de DdrO, un Chip Seq pour détecter les séquences directement fixées par Ddro et enfin, une étude des régions consensus fixés par cette protéine.

Ce compte rendu vise à donner une deuxième approche pouvant compléter les résultats obtenus en 2021. Bien que les mêmes données soient utilisées, certaines variations méthodologiques de traitement et analyse peuvent influencer les résultats. Pour s'y faire, nous allons tout d'abord analyser les données de Chip Seq afin d'identifier les motifs de fixation, afin d'obtenir les séquences retrouvées en ChipSeq et possédant également un des motifs candidats. Nous allons ensuite poursuivre avec l'analyse du transcriptome tout en croisant les données avec les résultats ChipSeq. Ce même processus dans l'article original résulte en une liste de 37 gènes.

Chip-seq

Peak Calling

La technique ChIP-Seq (Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing) permet d' identifier les sites de liaison des protéines sur l'ADN dans le génome. Ce processus comprend plusieurs étapes : l'incubation de la protéine avec l'ADN, formation de ponts stables avec formaldehyde, digestion enzymatique (ou sonication) de l'ADN, immunoprécipitation de la protéine lié à ce ADN, et séquençage des fragments d'ADN co-immuno précipités avec l'anticorps. Afin d' éviter les faux positifs et de s'assurer que les pics détectés correspondent bien aux véritables sites de liaison de la protéine d'intérêt, deux contrôles sont réalisés.

L'input correspond à l'ADN extrait avant immunoprecipitation (ChIP), mais traité de la même manière que l'échantillon ChIP (fragmentation, crosslinking, séquençage). Et le mock est une immunoprécipitation réalisée avec un anticorps contrôle (ex. anticorps contre une protéine absente ou non spécifique).

Le chip-seq a généré 5 fichiers : IP 1-3, le mock et le input. Pour cette analyse, le IP3 n'est pas utilisé. Le traitement de ces fichiers passe d'abord par un premier alignement des fichiers IP avec la séquence de référence, puis par un "Peak calling". Pour intégrer et analyser les résultats des différentes conditions expérimentales , contrôle et non contrôle, nous avons réalisé deux workflows sur Galaxy.

Figure 1 : Workflow d'analyse de données Chip-seq. (A) Workflow galaxy réalisant deux "Peak calling", un pour le MOCK-IP et un pour le INPUT-IP. Ce dernier workflow connect un deuxième (B) traitant ces fichiers. Ce Workflow va réunir en un seul fichier BED tous les Peaks retrouvés par MOCK et séparément ceux par INPUT. Une intersection des résultats est réalisé, puis le fichier bed de cette intersection est utilisée pour obtenir un fichier fasta contenant les séquences d'ADN.

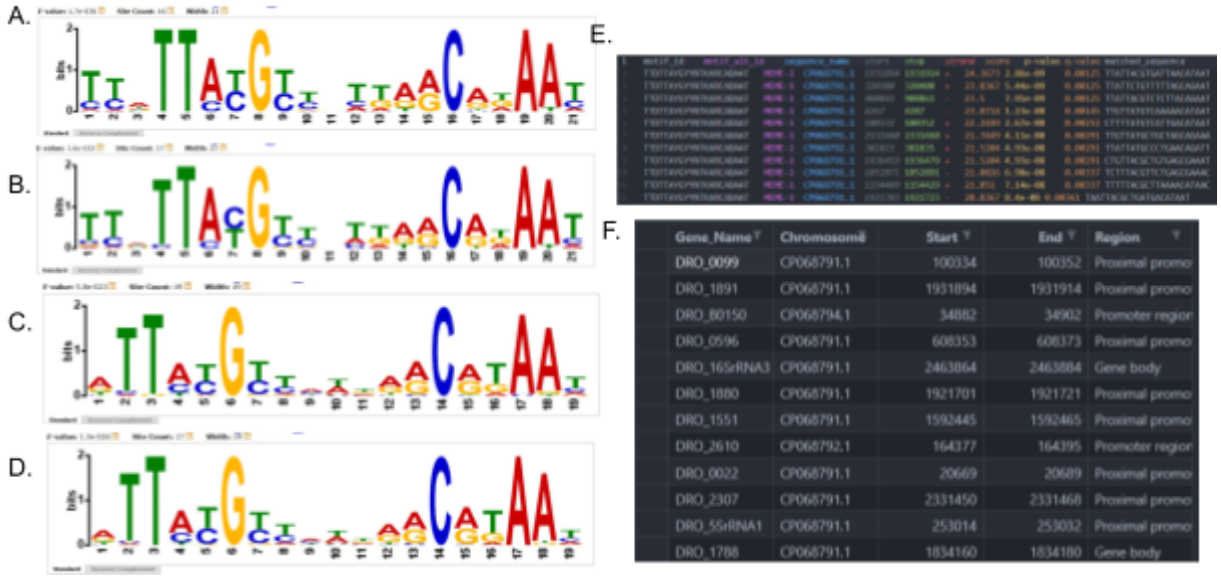
Le premier workflow aligne les séquences IP avec la séquence de référence, et identifie ensuite les peaks pour l'input et pour le mock (Figure 1.A). Le deuxième fusionne ("merge") tous les peaks trouvés avec chaque type de contrôle, puis fait une intersection entre les deux contrôles. Cela aboutit à un fichier bed et un fichier fasta, avec 452 séquences. Les auteurs de l'article on réalisé le peak calling en utilisant une alternative à MACS2. Ils ont utilisé B-peaks, une librairie R et ils ont ainsi retrouvé 136 séquences.

Recherche de motifs

La recherche de motifs peut être effectuée par différents algorithmes. MEME est un des nombreux algorithmes qui peut être utilisé, mais possède plusieurs limites. En effet, plus le nombre de séquences à analyser est élevé, plus le temps pour retrouver les séquences augmente, et la fiabilité des résultats diminue. Une alternative est donc d'effectuer une recherche de motifs au préalable, à partir de motifs de référence, en utilisant l'algorithme

FIMO. Ces dernières séquences de référence correspondront donc aux séquences de gènes ayant été démontrés expérimentalement comme étant fixés par DdrO.

Nous avons donc d'abord obtenu 4 matrices de référence en utilisant ces 16 séquences. Ces 4 matrices correspondent à la variation de deux paramètres : à 0 ou 1 occurrence par séquence (Figure 2.A,D) ou n'importe quelle nombre d'occurrence (Figure 2.B,C), et palindromique (Figure 2.C,D) ou non palindromique (Figure 2.A,B). Ces motifs sont ensuite recherchés dans nos 452 séquences, donnant ainsi comme résultat 4 fichiers tsv avec 10 colonnes (figure 2.E).



Gene_Name	Chromosome	Start	End	Region
DRO_0099	CP068791.1	100334	100352	Proximal promo
DRO_1891	CP068791.1	1931894	1931914	Proximal promo
DRO_80150	CP068794.1	34882	34902	Promoter regior
DRO_0596	CP068791.1	608353	608373	Proximal promo
DRO_16SrRNA3	CP068791.1	2463864	2463884	Gene body
DRO_1880	CP068791.1	1921701	1921721	Proximal promo
DRO_1551	CP068791.1	1592445	1592465	Proximal promo
DRO_2610	CP068792.1	164377	164395	Promoter regior
DRO_0022	CP068791.1	20669	20689	Proximal promo
DRO_2307	CP068791.1	2331450	2331468	Proximal promo
DRO_5SrRNA1	CP068791.1	253014	253032	Proximal promo
DRO_1788	CP068791.1	1834160	1834180	Gene body

Figure 2 : Résultats de la recherche de motifs. L'algorithme FIMO nous donne comme résultat 4 matrices en fonction des paramètres utilisés : 01 et non palindromique (A), any-number et non palindromique (B), any-number et palandromique (C), 01 et palindromique (D). Le recherche de motifs dans nos données de chip seq résulte dans un des fichier tsv (dossier Fimo452) (E), qui est ensuite utilisé pour retrouver les gènes fixés et contenant un des motifs, l'extrait du fichier associated_genes452.tsv est un exemple du résultat de ce traitement (F).

Afin de retrouver à quels gènes sont associées chacune de ces séquences, un pipeline d'analyse est réalisé en utilisant un script Python (github : findGenes.py). Ce script identifie les gènes contenant le motif recherché en utilisant les paramètres suivants : Le motif se retrouve dans le partie intergénique du promoteur (entre la fin du gène en amont et le début du gène d'intérêt), dans le corps du gène (soit entre lé début et la fin si la longueur du gène est supérieure à 100, soit entre le début et 100 nucléotides après si la longueur est

inférieure), ou dans la région promotrice proximale (-500 nt avant le TSS). Nous obtenons donc un fichier, dans le format présenté dans la figure 2.F, contenant 288 gènes candidats sur 452 gènes initiaux.

Cette valeur est largement supérieure aux 110/136 gènes retrouvés dans l'article. Parmi ces 288 gènes, 19 (comme dans l'article) sont des gènes de référence (sur 25). Si on fait le même filtrage sur les 136 gènes, nous obtenons non pas 110 gènes, mais 84 gènes qui se retrouvent dans une région promotrice. Cette variabilité peut s'expliquer par : notre choix de dire que si le gène a une longueur x de <100 nt, les fixation après ces x nucléotides ne sont pas comptés comme des possibles sites de régulation; mais aussi par des variabilités dans les analyses PeakCalling.

Ces choix sont fait pour améliorer la précision par rapport au site de fixation de DdrO, et pour augmenter la flexibilité par rapport à ce qui peut ou ne peut pas être une bonne fixation de DdrO sur le gène, sans sortir des standards (pv < 0.05 sur MACS2), mais juste en changeant la méthode.

Transcriptome

L'étude des gènes différentiellement exprimés en l'absence de DdrO repose sur une analyse du transcriptome. Cette analyse compare les conditions sans DdrO avec la condition où DdrO est présent. La première condition correspond à un transcriptome extrait x heures après le changement de température, qui restreint la réplication du plasmide contenant la séquence codant pour la protéine DdrO dans la cellule (Figure 3.B). La deuxième condition correspond au transcriptome extrait 1-x heures après l'augmentation de la température (Figure 3.A).

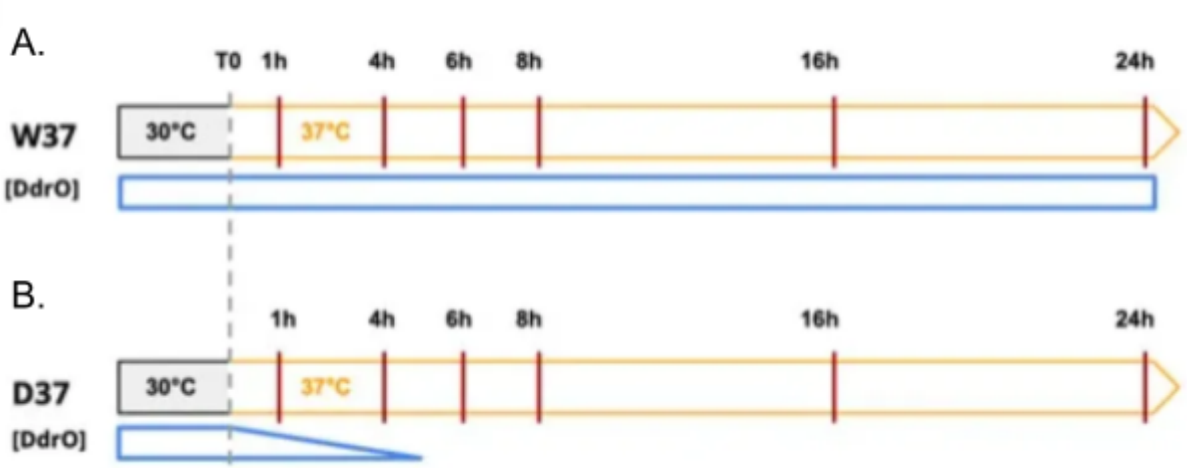


Figure 3 : Procédure pour l'extrait d'ARN cellulaire. Évolution de la température et de la quantité estimée de DdrO pour la souche W37, contenant un plasmide non thermosensible (A), et pour la souche D37 contenant un plasmide thermosensible (B). Les deux souches sont KO pour DdrO. Figure issue de l'article (Eugénie et al. 2021).

Les données transcriptomiques suivent un pipeline qui est transformé en workflow Galaxy (Figure 4). Ce pipeline nous permet de faire un contrôle qualité avec FASTQC, un alignement avec bowtie, un comptage de reads par gène en utilisant htseq-count, et une analyse différentielle avec DESEQ2 entre les conditions 1H contre les autres temps. L'ensemble des données transcriptomiques suit ce pipeline, générant 10 fichiers tsv qui sont transformés en un seul fichier utilisant le script "extrait_donnees.R" (github).

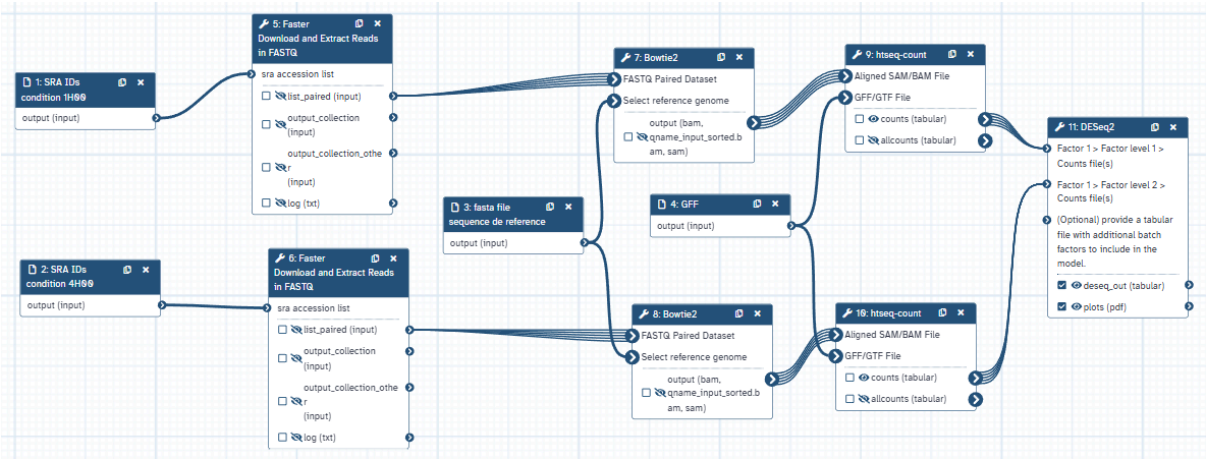


Figure 4 : Workflow d'analyse de transcriptome sur Galaxy et traitement.

Analyse double

Préparation de données et paramètres choisies

Dans les sections précédentes, nous avons d'abord augmenté notre jeu de séquences fixées afin de ne pas perdre des séquences potentiellement peu fixées par DdrO. Ensuite, nous avons traité les données transcriptomiques en calculant le log2FC et la p-value (ajustée et non ajustée). Contrairement à l'article, où les résultats sont retrouvés et filtrés séparément avant d'être intersectés ou fusionnés, nous avons opté pour une analyse double où les résultats du transcriptome influencent le filtrage du ChIP-seq et vice-versa.

Pour préparer les données, nous avons donc créé un dataframe regroupant plusieurs paramètres essentiels au filtrage (Tableau 1). Cela permet de réduire à une seule ligne par gène les informations clés pour déterminer si un gène est fixé par DdrO (présence du motif et détection en ChIP-seq) et/ou s'il est surexprimé en absence de DdrO. Nous avons analysé la p-value ajustée pour quantifier combien de fois elle était significative en conditions de surexpression en l'absence de DdrO, mettant ainsi en avant les gènes qui varient positivement par rapport au contrôle.

Colonne	**Description**
FC_sup_2.5_D37	Nombre de fois où le `log2FC` est supérieur à 2,5 pour l'échantillon "D37"
FC_sup_1.5_D37	Nombre de fois où le `log2FC` est supérieur à 1,5 pour l'échantillon "D37"
FC_sup_2_4fois_D37	Indique si le `log2FC` est supérieur à 2 au moins 4 fois pour l'échantillon "D37".
FC_inf_1.5_W37	Nombre de fois où le `log2FC` est inférieur à 1,5 pour l'échantillon "W37".
FC_inf_1_4fois_W37	Indique si le `log2FC` est inférieur à 1 au moins 4 fois pour l'échantillon "W37" (valeur booléenne).

Significatif_diff	Différence entre le nombre de fois où le `log2FC` est significatif (`P_adj < 0,01`) et supérieur à 1 pour "D37" par rapport à "W37".
Associated	Indique si le gène fait partie des gènes issues du Chip Seq et contenant le motif
Reference	Indique si le gène est dans la liste des gènes de référence.
Associated_region	Région de fixation de DdrO sur le gène en fonction du motif (Proximal promoter, promoter region, Gene body, ou NOT).

Tableau 1 : Paramètres choisis pour le filtrage des gènes.

Filtrage (script filtrage.R github)

Pour filtrer les gènes selon des conditions spécifiques, nous avons créé une nouvelle colonne "Condition" dans notre dataframe et une colonne “Passe_filtre”. La prémière colonne attribue une valeur numérique à chaque gène en fonction de critères prédéfinis, permettant ainsi de catégoriser les gènes selon leur comportement d'expression et leur pertinence biologique. Si le gène ne suit aucune condition une valeur de “-2” est donnée en colonne “Conditions” (moyenne négative des 4 conditions importante pour l’ACP qui est réalisée en amont). La colonne “Passe_filtre” indiquera “vraie” si le gène satisfait une des conditions.

La première condition, 51 gènes, regroupe donc les gènes qui se sont fortement exprimés en absence de DdrO pendant un temps court et dont l’expression en présence de DdrO n’augmente que très très peu dans pas plus d’une seule condition (’entre 1 et 1.5, soit 50% de ce qui a varié en absence de DdrO). La condition 2, 16 gènes, englobe les gènes ayant varié pendant plus longtemps mais peut-être d’une manière plus faible , tout en gardant une faible augmentation dans les conditions de contrôle. La condition 3, 26 gènes, comprend les gènes ayant le motif et ayant été fixés à DdrO,et ayant une légère augmentation des transcrits en l'absence de DdrO.. La condition 4, 2 gènes, englobe les gènes où l’expression a augmenté faiblement pendant longtemps tout en ne variant presque pas dans les conditions de contrôle.

Condition	Description
1	`log2FC` > 2,5 au moins une fois pour "D37", `log2FC` < 1 au moins quatre fois pour "W37", `log2FC` < 1,5 tout le temps pour "W37", et différence significative d'au moins trois fois.
2	`log2FC` > 1,5 au moins trois fois et > 2,5 au moins deux fois pour "D37", `log2FC` < 1,5 au moins trois fois pour "W37", et différence significative d'au moins trois fois.
3	`log2FC` > 1,5 au moins une fois pour "D37", `log2FC` < 1 au moins quatre fois pour "W37", gène associé, et différence significative d'au moins une fois.
4	`log2FC` > 2 au moins quatre fois pour "D37", `log2FC` < 1 au moins quatre fois pour "W37", et différence significative d'au moins trois fois.

Tableau 2 : Différents types de filtres rendant un gène comme candidat.

Le filtrage a permis d'identifier 96 gènes candidats, contre 35 dans l'article. Pour autant, seulement 10 gènes sont communs aux 2 listes. Ces résultats peuvent ainsi paraître mauvais à cause de ce faible partage de gènes entre les listes. Nous avons donc décidé de faire une comparaison entre ces résultats en utilisant comme point de comparaison les caractéristiques des séquences de référence.

Comparaison des résultats et discussion

Afin de comparer les résultats de l'article avec les nôtres, nous avons décidé de réaliser une analyse en composantes principales (ACP). Bien que cette analyse puisse être biaisée parce que les variables expliquant le modèle sont les paramètres de filtrage de nos gènes, nous avons justifié le choix de ces variables dans un contexte biologique global et devraient pouvoir aussi s'appliquer aux gènes retrouvés dans l'article. Deux analyses sont réalisées, la première prend en compte toutes les variables numériques et même si on pourrait considérer comme "équilibré", le biais qu'elle pourrait induire ne nous permet pas de l'utiliser pour comparer exhaustivement les résultats mais seul pour avoir une idée graphique des résultats. La deuxième ACP enlève tous les biais en calculant les coordonnées uniquement à partir de variables globales, sans les variables propres à chaque groupe (on enlève par exemple la variable Condition ou la variable Article).

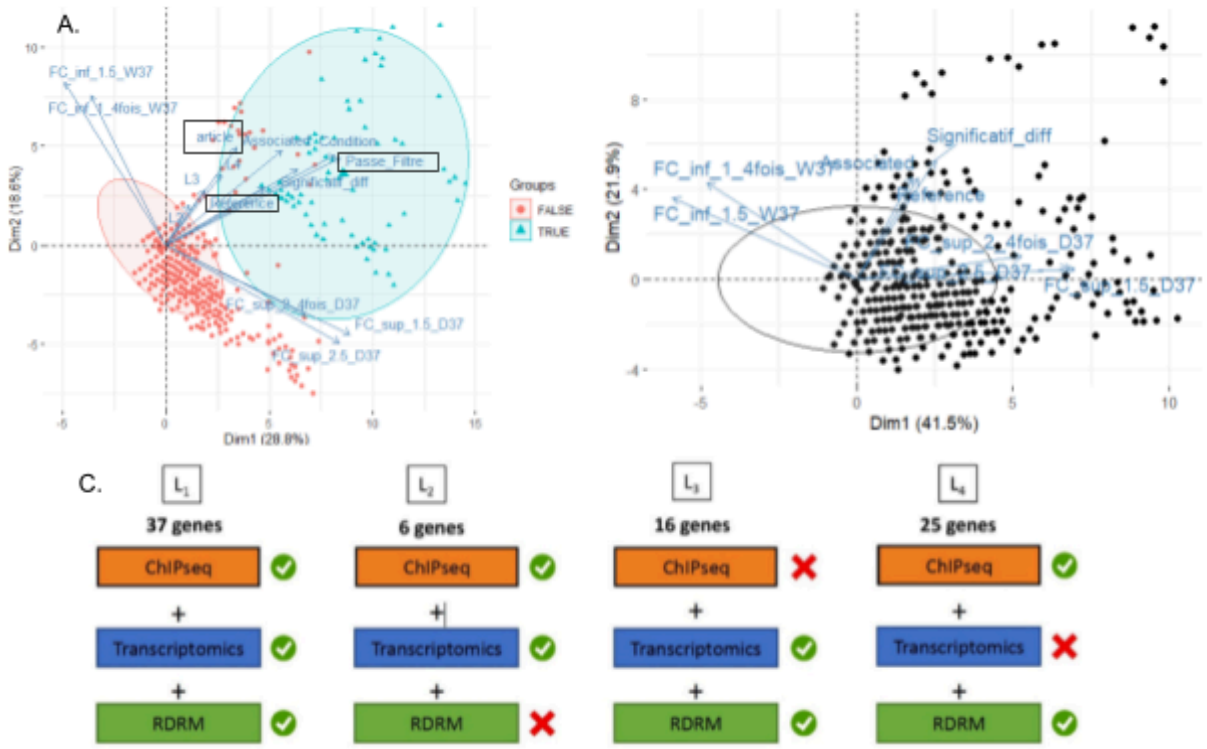


Figure 5 : Analyses en composantes principales sur l'ensemble de données. La première (A) est réalisée avec l'ensemble de variables numériques : toutes celles en Tableau 1 sauf Associated_region, plus L2, L3, L4, article, condition, Passe_filtre. L2-4 correspondent aux groupes dans l'article (C) et article est une variable booléenne. Le deuxième analyse (B) est uniquement réalisé avec les variables globales : toutes celles en Tableau 1 sauf Associated_region.

En figure 5.A nous observons que les gènes issues de l'Article et les nôtres (ceux dont Passent_filtre est vrai) suivent bien la même tendance .Graphiquement, nous pouvons constater que nos gènes sont plus proches du vecteur représentant les gènes de référence. De plus, nos gènes semblent paradoxalement englober des gènes qui sont plus fortement exprimés en D37 tandis que les gènes de l'article regroupent les gènes dont la variation est moindre dans W37 et dont la présence est plus forte dans les séquences Chip Seq. Le paramètre Signifactif_diff semble être le paramètre expliquant le mieux la variabilité des gènes de référence.

Pour l'ACP sans biais (ou avec moins), graphiquement rien ne peut être commenté. Cependant, nous avons utilisé le résultat de cet ACP pour calculer la distance euclidienne entre reference-article et reference-Passsent_filtre (nos gènes). Ce calcul résulte dans une distance de 12.6 et 11.8 respectivement, nous indiquant que dans un espace vectorielle définie par des variables explicatives telles que celles montrées en Tableau 1, les gènes que

nous avons trouvés suivent une tendance plus ressemblante aux gènes de référence que les gènes retrouvés dans l'article. La liste des gènes filtrés peut-être retrouvée sur Github dans le fichier "resultats_filtres.csv".

Afin d'étudier si l'algorithme de PeakCalling pourrait influencer les résultats, nous avons réalisé le même script de filtrage mais à partir du fichier issu des 136 séquences. Nous trouvons cette fois-ci 71 gènes, et un résultat similaire: la distance euclidienne est de 11.6 pour nos gènes et de 12 pour les gènes de l'article. Ce changement réduit la distance globale et rapproche les deux résultats. Cela pourrait s'expliquer parce que l'algorithme b-peaks est spécifique pour les procaryotes tandis que MACS2 est plus spécifique des eucaryotes, le rendant donc moins adapté pour cette analyse.

Nous pourrions envisager dans le futur de réaliser un algorithme qui modifie les paramètres de filtrage pour réduire la distance euclidienne entre les gènes de référence et les gènes candidats.