Soutenance de stage M2 ITA

Méthodes de *mapping* de *reads* avec indexation des *reads*

Pierre Morisse
Encadrants : M. Thierry Lecroq et M. Arnaud Lefebvre

26 janvier 2017

Plan de la présentation

Contexte

- Milieu des années 2000 $\Rightarrow$ Développement des séquenceurs à très haut débit (NGS)

- Production de millions de très courtes séquences appelées *reads*, utilisés pour résoudre des problèmes :
  - De *mapping*
  - D'assemblage
  - De traitement des requêtes suivantes, pour f de longueur k fixé :
    1. Dans quels *reads* f apparaît ?
    2. Dans combien de *reads* f apparaît ?
    3. Quelles sont les occurrences de f ?
    4. Quel est le nombre d'occurrences de f ?
    5. Dans quels *reads* f n'apparaît qu'une fois ?
    6. Dans combien de *reads* f n'apparaît qu'une fois ?
    7. Quelles sont les occurrences de f dans les *reads* où f n'apparaît qu'une fois ?

Contexte

- 7 requêtes précédentes introduites dans [Philippe et al., 2011], en complément d'un index les supportant
- *Reads* produits bruités $\Rightarrow$ Nécessité d'une procédure de correction avant utilisation
- Nécessité d'indexer ces *reads* pour traiter les différents problèmes rapidement identifiée
- De nombreuses méthodes d'indexation permettant de traiter ces problèmes existent

Définitions et notations

Définitions et notations

Alphabet : $\Sigma = \{A, C, G, T\}$

Séquence : mot sur l'alphabet Σ

k-mer : facteur de longueur k d'une séquence

Contig : séquence générée par l'assemblage de plus courtes séquences se chevauchant

Gb : Gigabases

Description

- Ont pour but de produire des séquences à partir d'un échantillon d'ADN
- Différentes technologies et plateformes $\Rightarrow$ Possibilité de traiter divers problèmes de génomique
- Prix désormais abordable $\Rightarrow$ Séquençage accessible à tous
- Depuis peu, séquençage de *reads* de plus en plus longs $\Rightarrow$ Très utiles dans les problèmes d'assemblage
- Mais ces *reads* sont très bruités

Principaux séquenceurs

Technologie	**Plateforme**	**Nombre de *reads***	**Longueur**	**Précision (en %)**	**Temps**	**Coût (en $)**	**Erreurs**
Illumina	HiSeq 2500/1500 MiSeq	3 milliards 17 millions	36 - 100 25 - 250	99 >99	2 - 11 jours 4 - 27 heures	740 000 125 000	Subs.
Roche	454 GS FLX+ 454 GS Junior	1 million 1 million	700 400	99,997 >99	23 heures 10 heures	450 000 108 000	Indels.
ABI Life Technologies	5500xl SOLiD Ion Proton Chip I/II	2,8 millions 60 - 80 millions	75 jusqu'à 200	99,99 >99	7 jours 2 heures	595 000 243 000	Indels.
Pacific Biosciences	PacBio RS	50 000	3 000 en moyenne	85	2 heures	750 000	Indels.
Oxford Nanopore	GridION MinION	4 - 10 millions 70 000	dizaines de milliers dizaines de milliers	96 70	variable 48 heures	variable 1 000	Indels.

Méthodes de correction

Motivations

- *Reads* bruités
- Difficiles à utiliser
- Nécessité d'améliorer leur précision

Méthodes de correction

Principaux outils :

Outil	**Structure de données**	**Erreurs corrigées**	**Nombre de *reads* (longueur)**	**Espace mémoire (en Mo)**	**Temps (en min)**	***Reads* corrigés**
SHREC	Arbre des suffixes	subs.	1 090 946 (70)	1 500	183	88,56
HybridSHREC	Arbre des suffixes	subs. + indels	977 971 (178)	15 000	28	98,39
HiTEC	Table des suffixes	subs.	1 090 946 (70) 4 639 675 (70)	757 3 210	28 125	94,43
Fiona	Table des suffixes partielle	subs. + indels	977 971 (178) 2 464 690 (142)	2 000 3 000	15 32	66,76
Coral	Table de hachage	subs. + indels	977 971 (178)	8 000	5	92,88
RACER	Table de hachage	subs.	2 119 404 (75) 101 548 652 (457 595)	1 437 41 700	23 104	76,65 42,95
BLESS	Filtres de Bloom	subs. + indels	1 096 140 (101)	11	6	84,38
LoRDEC	Graphe de de Bruijn	subs. + indels	33 360 *reads* longs (2 938) et 2 313 613 *reads* courts (100)	960	10	85,78

Méthodes de *mapping*

Motivations

- Comparer ADN d'un individu à un génome de référence
- Détection de mutations dans l'ADN séquencé
- $\Rightarrow$ Détection de pathologies

Méthodes de *mapping*

Principaux outils :

Outil	Structure de données	Erreurs prises en compte	Nombre de *reads* (longueur)	Espace mémoire (en Mo)	Temps (en min)	*reads* mappés (en %)
MAQ	Table de hachage	subs. + indels	1 000 000 (44)	1 200	331	92,53
MrsFAST	Table de hachage	subs.	1 000 000 (100)	20 000	169	90,70
MrsFAST-Ultra	Table de hachage	subs.	2 000 000 (100)	2 000	57	91,41

Remarques

- Peu d'outils présentés ici
- De nombreux outils, n'utilisant pas de structure d'index sur les *reads*, existent et produisent de bons résultats

Méthodes de traitement des 7 requêtes

Applications

- Détection d'erreurs de séquençage
- Détection de mutations
- Assemblage

Méthodes de traitement des 7 requêtes

Principaux outils :

Outil	Structure de données	Nombre de *reads* (longueur)	Espace mémoire (en Go)	Temps R1	Temps R2	Temps R3	Temps R4
GkA	Table des suffixes modifiée + Table des suffixes modifiée inverse + Table associant *k*-mer - nombre d'occurrences	42 400 000 (75)	20	16	25	25	0,1
CGkA	Table de suffixes échantillonnée + 3 vecteurs de bits	42 400 000 (75)	3 - 7	1203	28	1278	28
PgSA	Table des suffixes échantillonnée + Table auxiliaire d'information sur les *reads* et *k*-mers	42 400 000 (75)	1 - 4	70	58	70	58

Remarque

Les requêtes 5-7 sont exclues du comparatifs, car non implémentées dans GkA et CGkA au moment des tests réalisés.

Problématique

- *Reads* longs très utiles, notamment pour résoudre des problèmes d'assemblage longs et complexes
- Séquencer de tels *reads* est devenu rapide, peu coûteux et facile, notamment à l'aide de MinION
- Ces *reads* présentent un fort taux d'erreur
- La correction de ces *reads* longs par des méthodes classiques n'est pas aussi efficace que la correction de *reads* courts
- $\Rightarrow$ Nécessité de proposer une méthode alternative

Solution : les *reads* NaS

- Création de *reads* longs synthétiques via une approche hybride
- Peuvent atteindre une longueur de 60 000 et s'aligner sur le génome de référence avec un précision de 99,99%
- $\Rightarrow$ Première solution efficace permettant d'appliquer un traitement correctif aux *reads* longs

Solution : les *reads* NaS

Nous présentons ici deux méthodes de synthèse des *reads* NaS :

- La première [Madoui et al., 2015] nécessite d'aligner les *reads* courts sur les *reads* longs, mais également entre eux
- La deuxième, que nous avons mis en place, vise à ne déduire des informations qu'à partir de l'alignement des *reads* courts sur les *reads* longs

Reads Nanopore

La technologie Nanopore permet de séquences deux types de *reads* :

- Des *reads* 2D, plus longs et plus précis
- Des *reads* 1D, plus courts et moins précis

Jeu de données utilisé

- 66 492 *reads* longs MinION répartis en 5 ensembles comme suit :

Ensemble	Nombre de *reads*	% *reads* 2D	% taille totale
1	9 241	6,5	14,6
2	3 990	13,6	27,1
3	6 052	43,3	57,1
4	11 957	11,6	42,7
5	35 252	9,7	44,6

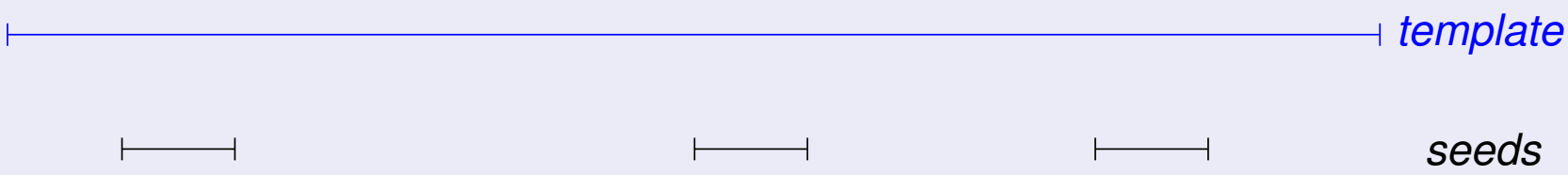
- 83,2% des *reads* 2D et 16,6% des *reads* 1D alignés
- Identité moyenne de 74,5% et 56,5%, respectivement
- Deux ensembles de 5 984 858 *reads* courts Illumina

Première méthode

Nous présentons ici la méthode pour le traitement d'un *read* long :

Première étape

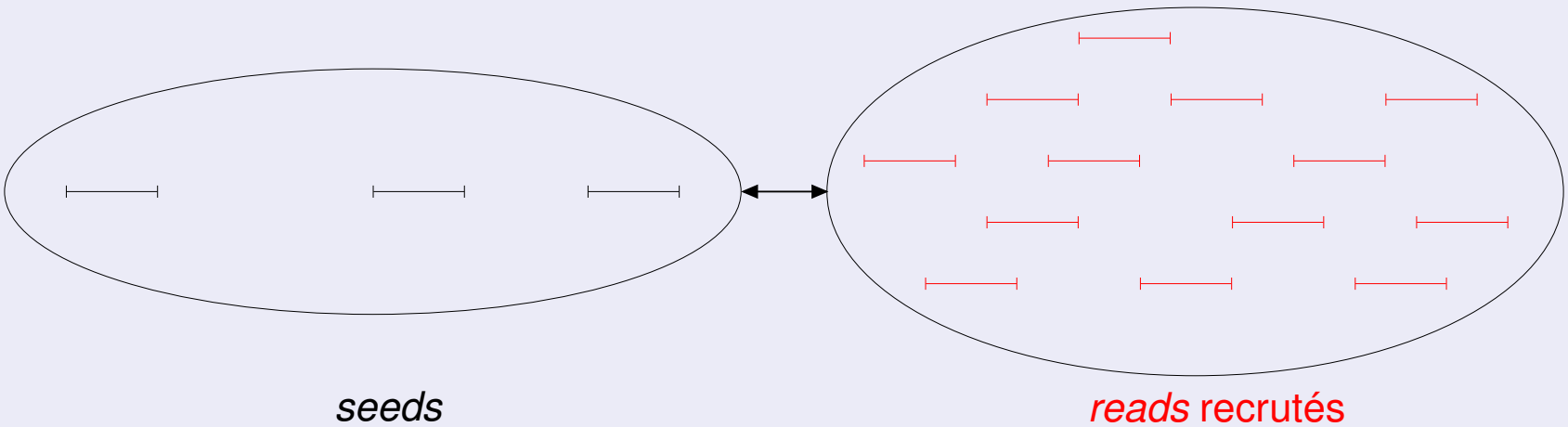
Alignement des *reads* courts sur le *read* long *template*



Première méthode

Deuxième étape

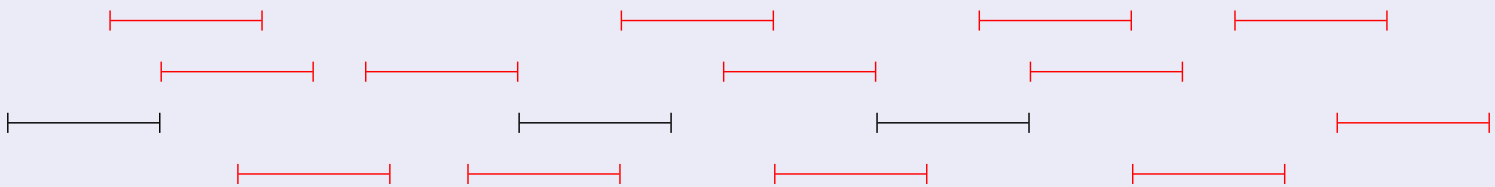
Recrutement de nouveaux *reads*, en alignant les *reads* courts entre eux



Première méthode

Troisième étape

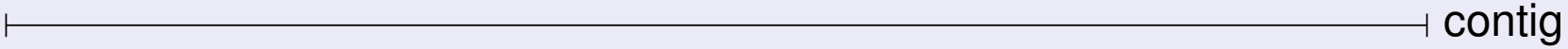
Micro-assemblage de l'ensemble de *reads* obtenu



Première méthode

Quatrième étape

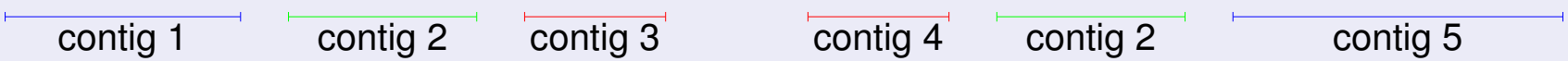
Obtention d'un contig



Première méthode

En général un unique contig est produit, mais de mauvais *reads* peuvent être recrutés et produire des contigs erronés

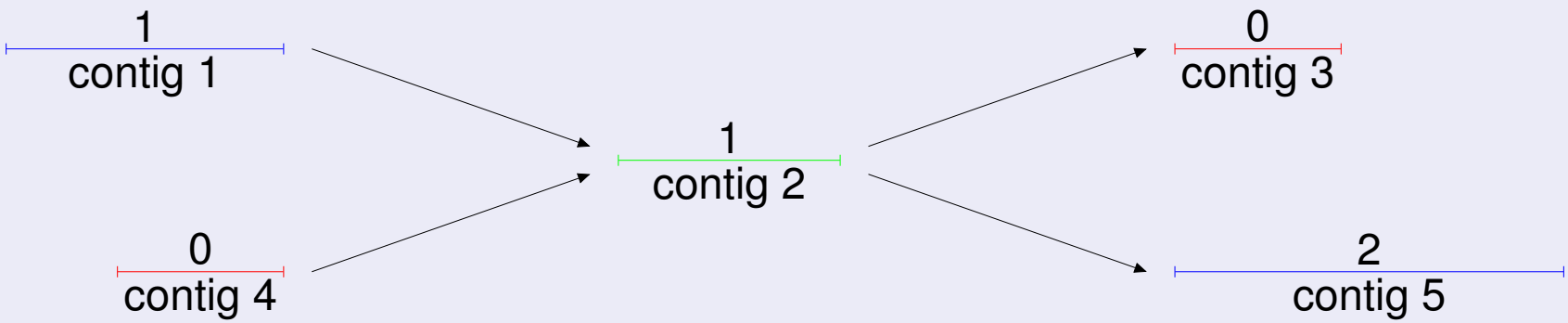
Obtention de plusieurs contigs



Première méthode

Première étape

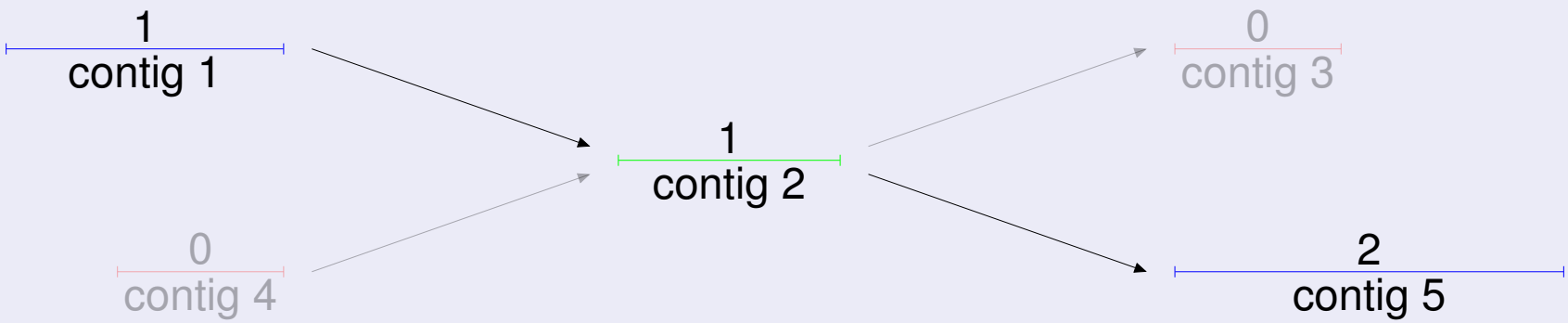
Construction du graphe des contigs



Première méthode

Deuxième étape

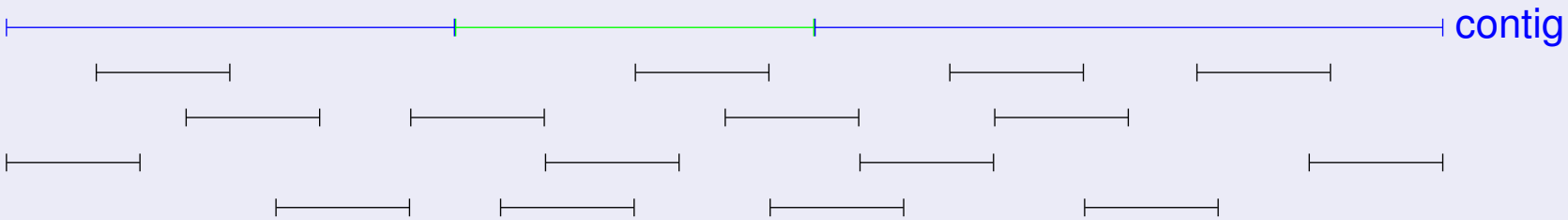
Sélection du chemin optimal



Première méthode

Troisième étape

Vérification du contig obtenu, par alignement des *reads* courts



Première méthode

Résultats

- 11 275 *reads* NaS produits
- Longueur maximale de 59 863
- Seulement 17% des *reads* longs ont produit un *read* NaS (76,4% 2D, 8,1% 1D)
- Certains *reads* NaS sont plus longs que leur *template* de référence
- Temps de traitement : moins d'une minute en moyenne pour un *read* long, 7 jours au total

Première méthode

Résultats

- Les *reads* NaS produits couvrent 99,96% du génome de référence
- Identité moyenne de 99,99%
- 97% s'alignent sans erreur
- 99,2% s'alignent avec au plus une erreur

Notre méthode

Nous présentons la méthode pour le traitement d'un *read* long

Principe

Alignement des *reads* courts sur le *read* long *template*, en se fixant un seuil *lmin*, pour récupérer les *reads* :

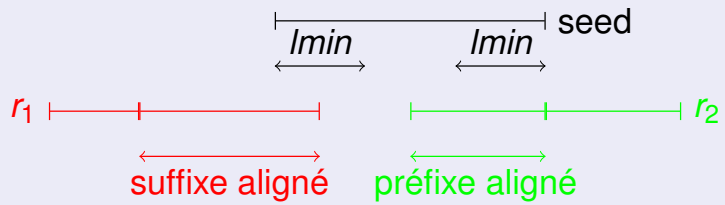
- Totalement alignés, et servant de *seeds*
- Avec un préfixe de longueur $\geqslant$ *lmin* aligné
- Avec un suffixe de longueur $\geqslant$ *lmin* aligné

Notre méthode

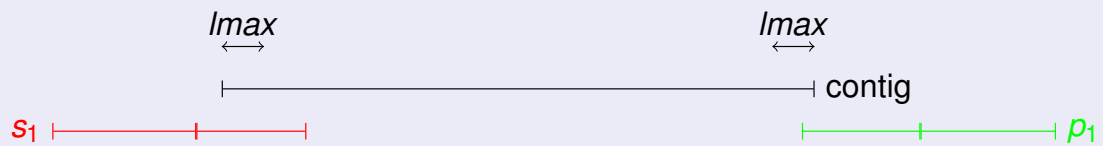
Principe

Deux étapes d'extensions :

1. Recrutement de *reads* partiellement alignés, similaires aux *seeds*



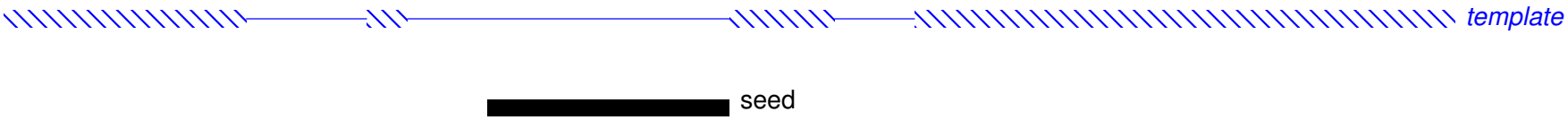
2. Recrutement de nouveaux *reads* partiellement alignés, sans relation de similarité, en se fixant un nouveau seuil *lmax*



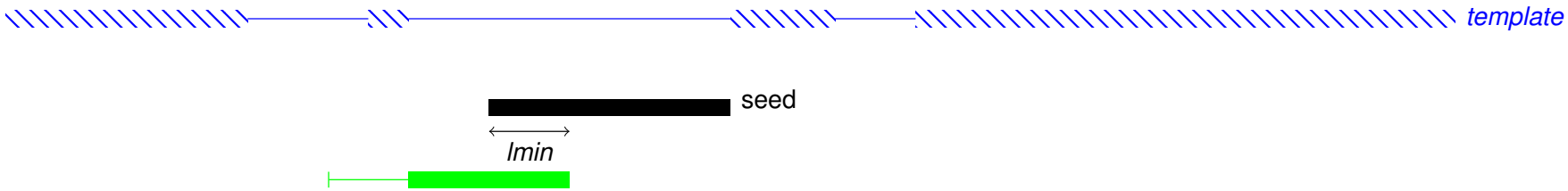
Notre méthode

template

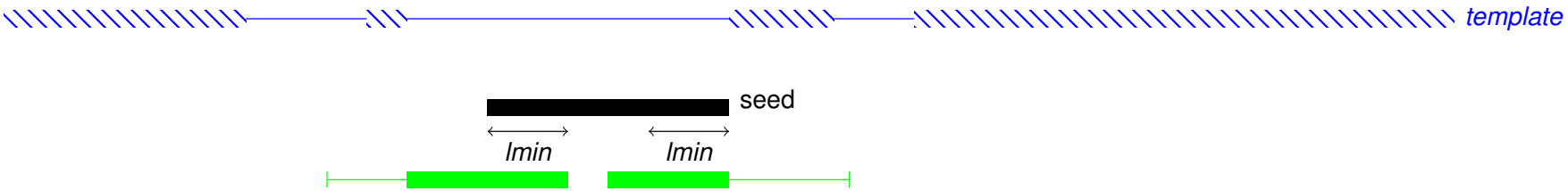
Notre méthode



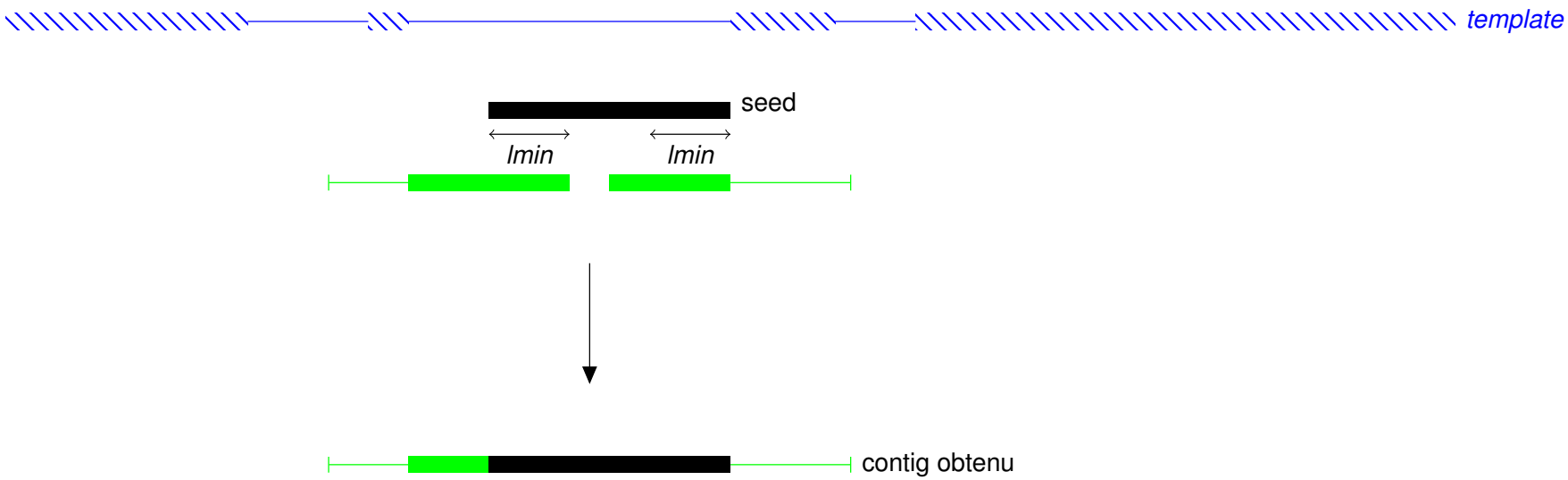
Notre méthode



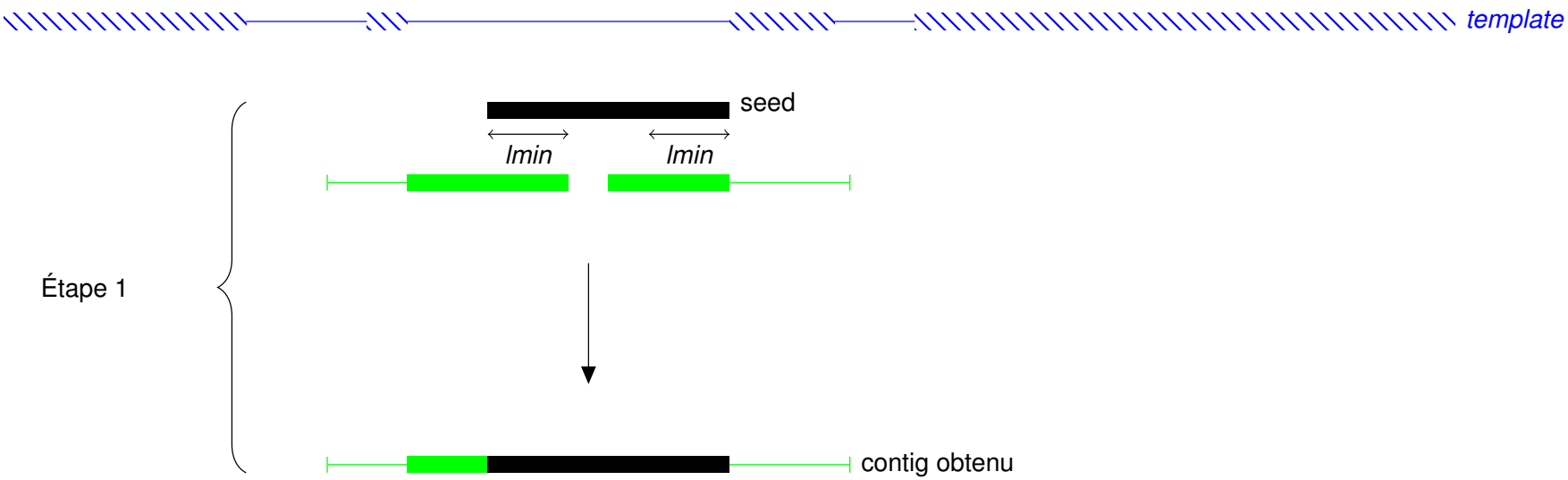
Notre méthode



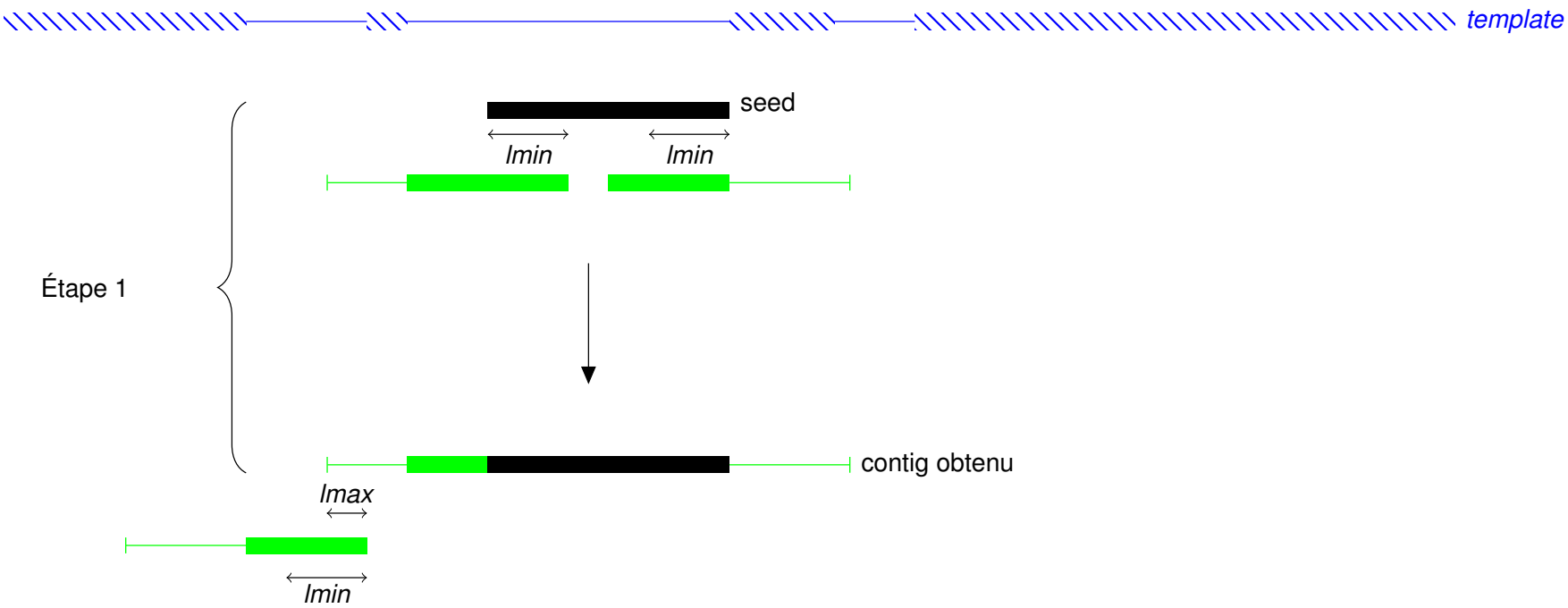
Notre méthode



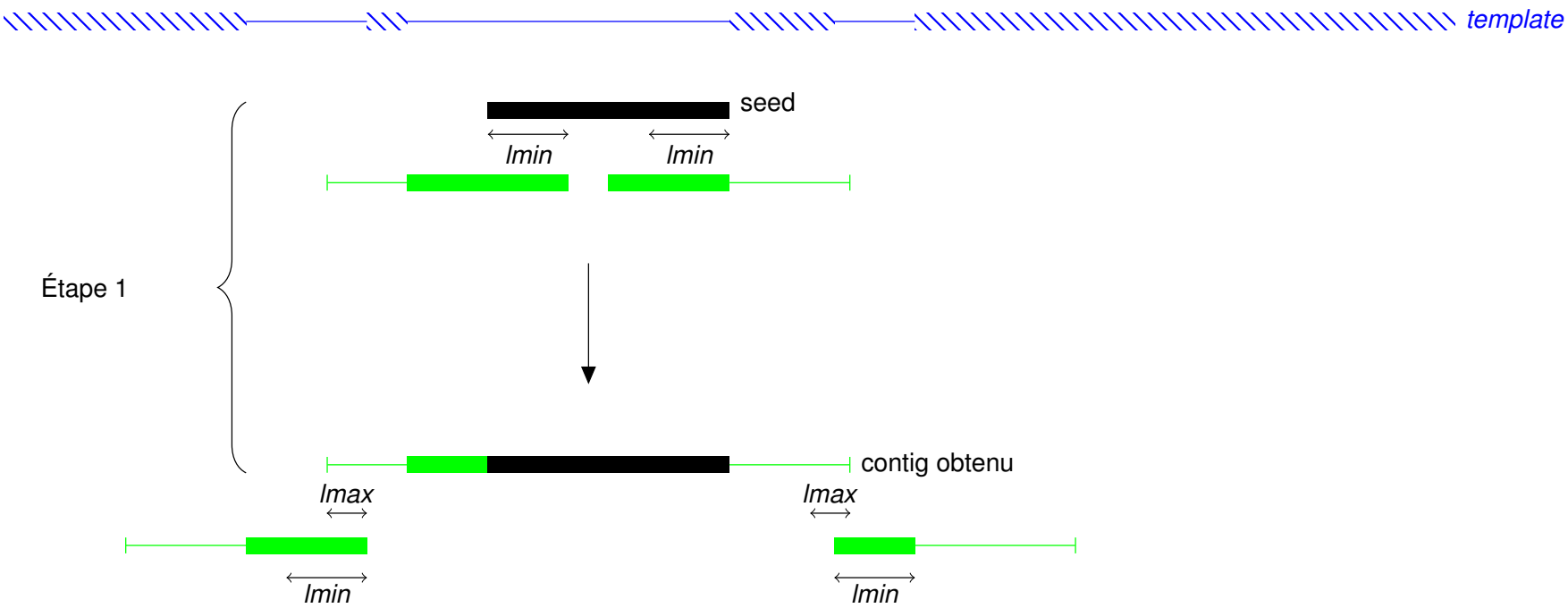
Notre méthode



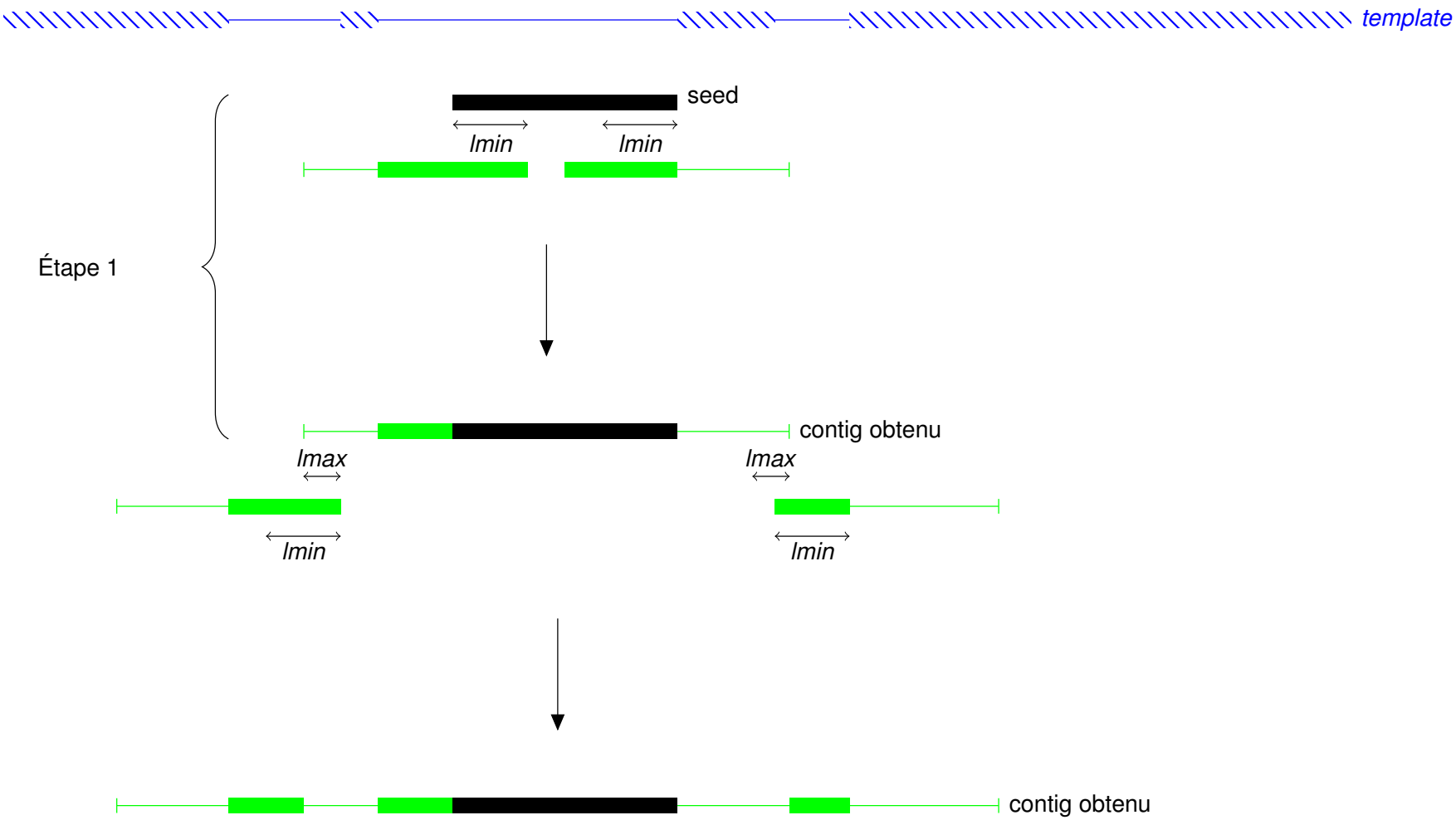
Notre méthode



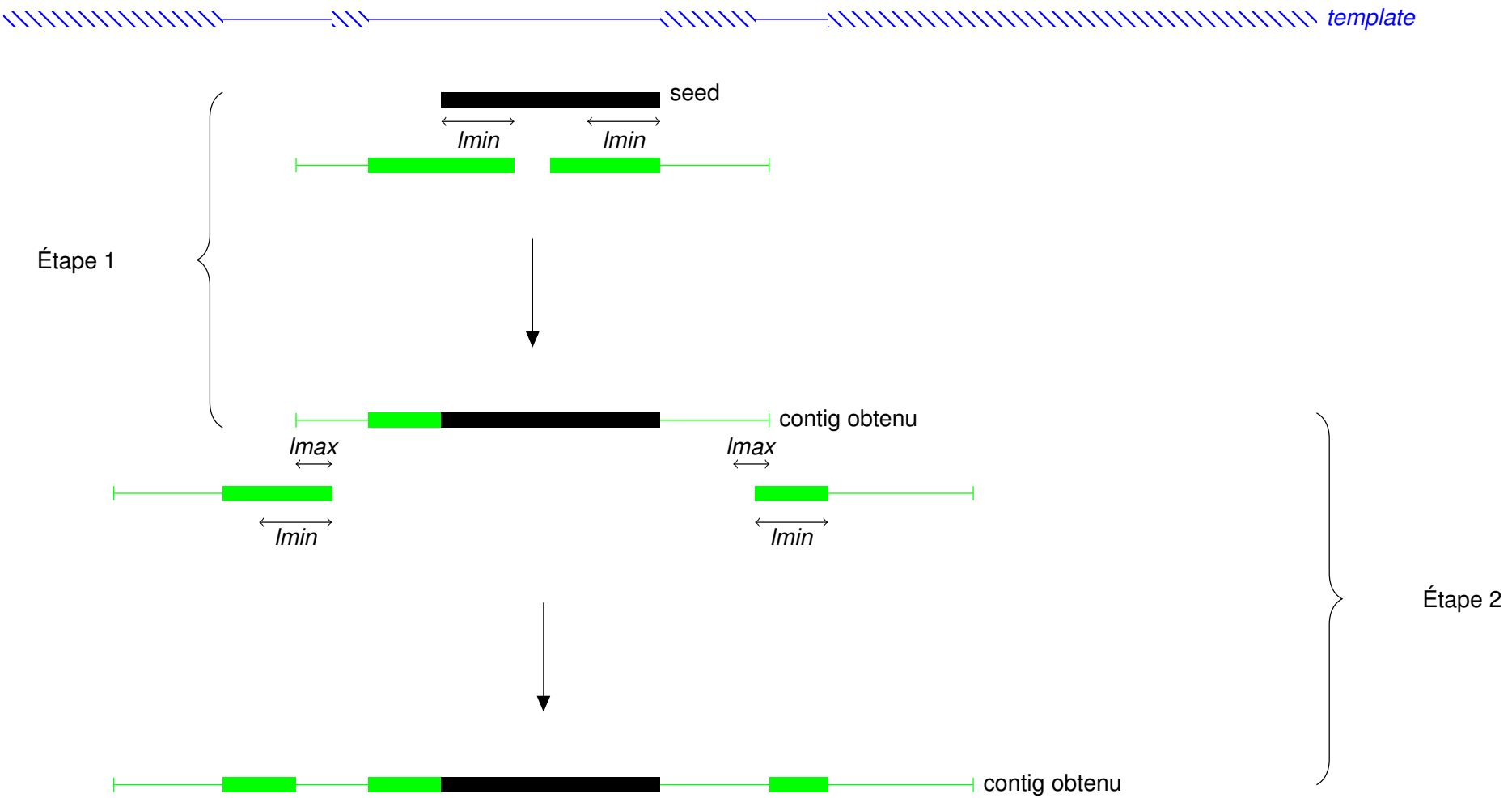
Notre méthode



Notre méthode



Notre méthode



Notre méthode

Résultats après application de notre méthode sur 9 641 *reads* du jeu de données précédent, avec $lmin = 100$ et $lmax = 10$:

Reads	Longueur moyenne	Précision moyenne	Contigs / *read*	Longueur moyenne	Précision moyenne	Template couvert
1D	2 052	56,5%	2,296	645	88,636%	72,17%
2D	10 033	74,5%	2,732	2 421	88,186%	65,93%

- Temps de traitement : moins de 10 secondes en moyenne pour un *read* long, 14 h 30 min au total
- Réduction du taux d'erreur à moins de 12%
- Faible taux de couverture des *templates* $\Rightarrow$ Synthèse de contigs courts
- Notre méthode semble déjà constituer un prétraitement efficace

Conclusion

Nous avons donc pu

- Dresser l'état de l'art des technologies de séquençage et des solutions aux principaux problèmes concernant les reads, utilisant une structure d'index sur ces *reads*
- Nous pencher sur le cas des *reads* longs
- Introduire une méthode alternative permettant d'appliquer un traitement à ces *reads* avant utilisation $\Rightarrow$ *reads* NaS
- Étudier une méthode de synthèse de *reads* NaS, et en développer une nouvelle

Perspectives

- Ajuster les paramètres de notre méthode
- Étudier plus en détails les résultats obtenus
- Dresser l'état de l'art des méthodes d'assemblage de *reads*, utilisant une structure d'index sur les *reads*

Madoui, M.-A., Engelen, S., Cruaud, C., Belser, C., Bertrand, L., Alberti, A., Lemainque, A., Wincker, P., and Aury, J.-M. (2015).
Genome assembly using Nanopore-guided long and error-free DNA reads.
BMC Genomics, 16:327.

Philippe, N., Salson, M., Lecroq, T., Leonard, M., Commes, T., and Rivals, E. (2011).
Querying large read collections in main memory: a versatile data structure.
BMC bioinformatics, 12(1):242.

Implémentation

- Ajout des *seeds* et *reads* partiellement alignés à des listes
- Tri des listes
- Parcours parallèle des listes pour effectuer les recrutements

Implémentation

Recrutement de *reads* similaires