M2 Mycologie

Blast et alignement multiple

Université Paris Cité

Recherche de motifs

Principe général

- recherche par similarité d'une séquence déjà connue ou proche de séquences connues
- trouver des alignements significatifs entre une séquence (query) et une banque de séquences (subjects)
- algorithme de Smith-Waterman trop lent donc utilisation de l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Alignement, similarité et homologie

Une possibilité est de définir la similarité entre deux séquences par leur distance (Levenshtein ou edit), ou par le pourcentage d'identité (résidus appariés / nombre total de résidus) :

```
GTCCTCATAACTCTCTCTAG
GTCGTCATAAC CTCTCTAG
    ^       ^
```

Une autre possibilité consiste à définir un score d'alignement à partir du nombre d'insertions et de déletions (”gaps”).

```
GTCCTCATAACTCTCTCTAG   |   GTCCTCAT-AACTCTCTCTAG   |   ...
GTCGTCATAAC-CTCTCTAG   |   GTCGTCATAA-C-CTCTCTAG   |   ...
```

Recherche par Blast

Blast utilise des heuristiques pour accélérer la production de résultats et il permet de calculer la significativité statistique des résultats d'alignement. Attention, ce sont les parties conservées de l'alignement qui sont généralement favorisées.

Matrice de substitution :

- permet d’associer un score à chaque paire de résidus que l’on trouve dans un alignement, sauf cas des nucléotides où la pénalisation est identique quelque soit la substitution
- scores positifs indiquent des substitutions fréquentes ou acceptables (> hasard), scores négatifs indiquent des mutations rares (contre sélection)

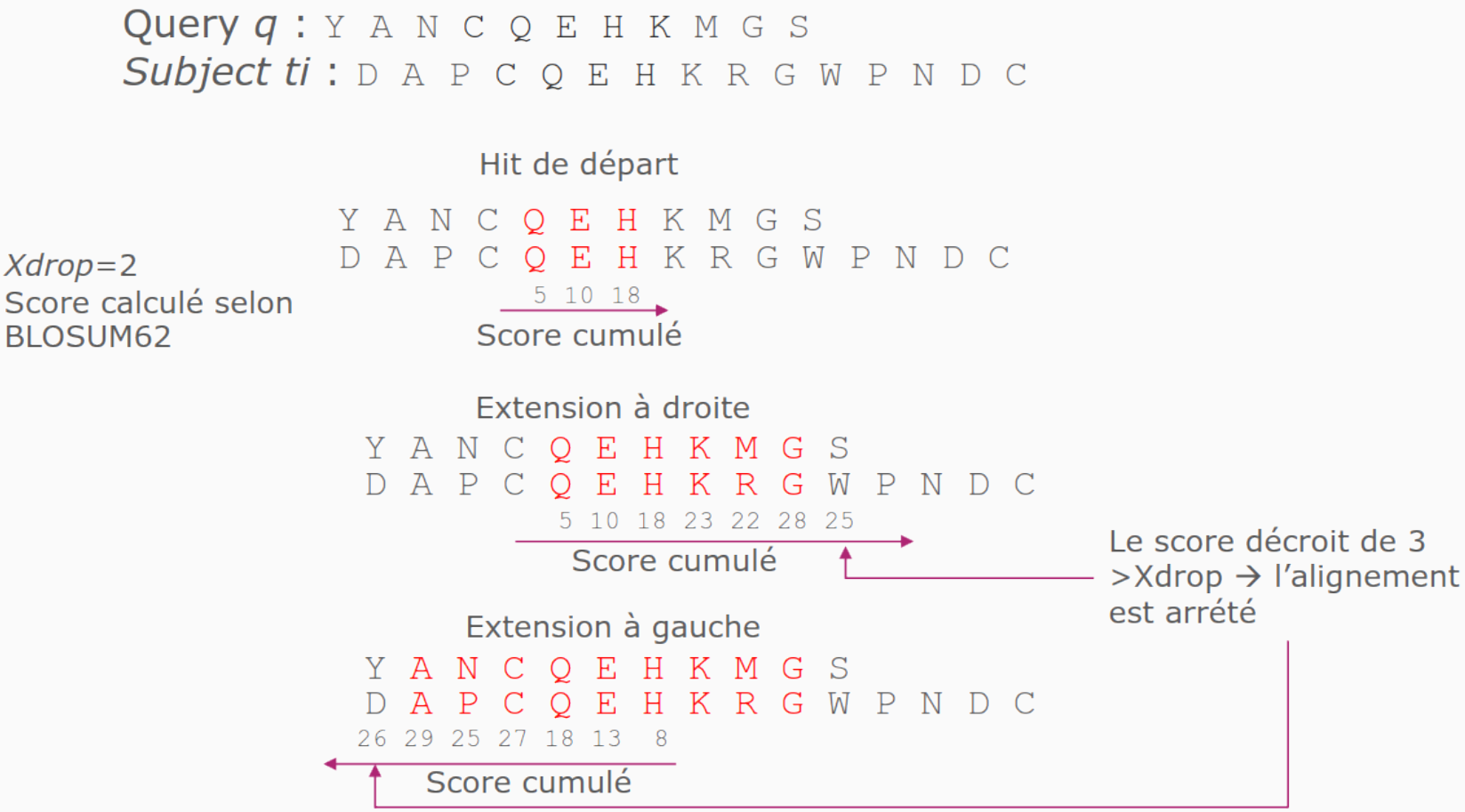
Algorithme Blast

1. définir à partir de la séquence requête q (longueur L) une liste de mots (graines, max $L - w + 1$) de taille définie w (taille par défaut de 11 pour l'ADN et de 3 pour les protéines) ; dans le cas des protéines ($w = 3$), utilisation d'une matrice de substitution (PAM ou BLOSUM62)
2. rechercher des alignements exacts (hits, de taille w) entre les mots de la liste (ADN) ou de la liste étendue (protéines) et les séquences de la base de donnée
3. chaque hit est étendu à gauche et à droite : L'extension est stoppée lorsque de le score du hit décroit de plus de X (X-drop)

HSP et MSP

- LMSP = Locally Maximal scoring Segment Pair
- HSP = High scoring Segment Pair
- MSP = Maximum scoring Segment Pair

Illustration[1]



[1]Source : https://wikis.univ-lille.fr/bilille/_media/cours_blast.pdf

Considérations statistiques

On peut toujours aligner deux séquences et définir le meilleur MSP : comment fixer un seuil de significativité statistique (i.e., pour démontrer une réelle homologie) ?

Soit le S le score d'alignement des deux séquences. On définit la E-value comme l'espérance du nombre n de MSP de score $\geq S$ dans 2 séquences aléatoires de même longueur et de même composition. Par exemple, si E=10, on dira que 10 HSP $\geq S$ peuvent être trouvés par chance.

Valeurs E et P

La valeur E est calculée sur la base du score d'alignement (somme des substitutions et indels, S), de la taille de l'espace de recherche (longueur séquence et taille base de données, $m \times n$) et des paramètres dérivés du système de scoring et de la composition de la base de données (paramètres de Karlin-Altschul, K et λ) :

$$\text{E-value} = K \times m \times n \times e^{-\lambda S}.$$

Des valeurs plus faibles de E des alignements plus "significatifs" alors que des valeurs plus élevées suggèrent des alignements qui peuvent être des événements aléatoires. La probabilité de ne trouver aucun HSP avec un score ≥ S vaut e^{-E}, d'où la probabilité de trouver au moins un HSP, $P = 1 - e^{-E}$.[2]

[2] Pour plus de détails, consulter The Statistics of Sequence Similarity Scores.

Alignement multiple

Principe général

On dispose de *k* séquences (NN) de taille variable et on cherche à aligner ”au mieux” l'ensemble des séquences, en introduisant des indels. On parle également de résidus équivalents alignés par site.

1. Entrée B_BLOCK

   ```
   CATGCGAGTAGTAG
   CATGGTAGTAG
   CCTGGAGTACGTAG
   CATGAGCGTAG
   ```

2. Sortie B_BLOCK

   ```
   CATGCGAGTA-GTAG
   CATG---GTA-GTAG
   CCTG-GAGTACGTAG
   CATG--AG--CGTAG
   ```

Résultats MAFFT

1. Progressive method (guide trees were built 2 times.) (FFT-NS-2) B_BLOCK

```
$ mafft test.fasta


---catgcgagtagtag
---catggtagtag---
cctggagtacgtag---
---catgagcgtag---
```

2. Iterative refinement method (<16) with LOCAL pairwise alignment information (L-INS-i) B_BLOCK

```
$ mafft --auto test.fasta


catgcgagtag-tag
catggtagtag----
cctg-gagtacgtag
```

Score d'un alignement multiple

On pénalise plus largement les indels :

$$s(x, x) = 1, s(x, y) = -1, s(x, -) = s(-, x) = -2, s(-, -) = 0$$

Les sites sont considérés comme indépendants, et le score résultat est la somme des scores individuels.

Distance entre deux séquences : $1 - \underbrace{\frac{\#\text{ résidus identiques}}{\#\text{ résidus comparés}}}_{\%\text{ identité}}$.

Algorithmes

1. Alignement optimal : approche exact (par paires) par programmation dynamique + heuristiques, impossible en pratique
2. Alignement progressif : utilisation d'un arbre de guidage à partir d'une matrice de distance et alignement des paires les plus proches (ClustalW – utilisation de profils) [AA]
3. Alignement itératif : tri des séquences à partir d'une matrice de similarités (scores) et alignement par ordre croissant (sans arbre de guidage) (DIALIGN)
4. Alignement hybride (progressif + itératif) : arbre guide à partir de la matrice de distance (UPGMA ou NJ) puis alignement progressif ; amélioration de l'arbre guide, nouvel alignement progressif... ; raffinement (MUSCLE)

MUSCLE *versus* Clustal

- ClustalW/Clustal Omega : efficace mais lent, moins performant si les séquences sont de longueurs très différentes ou présentent peu de similarités
- Muscle : méthode rapide mais approximative pour le calcul des distances (k-mers partagés par paire de séquences) et donc arbre guide moins fiable

T-coffee et MAFFT

- T-coffee : approche hybride combinant les resultats d'alignement global (ClustalW) et local (Lalign)
- MAFFT : utile dans le cas où le nombre de séquence est grand ; bonnes performances en règle générale

Algorithme MAFFT

1. identification de segments de similarité entre chaque paire de séquences par FFT (méthode FFT-NS-1), puis alignement des paires de séquence (10x plus rapide que Clustal)
2. arbre de guidage basé sur ces alignements et calcul des distances simplifié à l'aide de k-mer
3. alignement progressif, éventuellement répété (comme MUSCLE – FFT-NS-2)

Possibilité de raffiner l'arbre de guidage (séparation de l'arbre en deux puis réalignement des deux moitiés) : méthode FFT-NS-i.

Sources : NCBI, Mafft, https://wikis.univ-lille.fr/bilille