Premières Analyses des Données de Séquençage

Samuel BARRETO

19 novembre 2015

I Qualité des données

I.A *qualité du séquençage*

Globalement la plupart des séquences était de bonne qualité. Sur les 192 envoyées à séquencer, 179 ont été retenues pour l'analyse, soit 93%.

Étant donnée la faible qualité des bases en début et en fin de séquence, elles ont été tronquées. Le score 28 semblait le seuil naturel de qualité. De plus, toutes les séquences qui avaient une longueur inférieure à 620 étaient généralement mal alignées. Elles ont été éliminées de l'analyse.

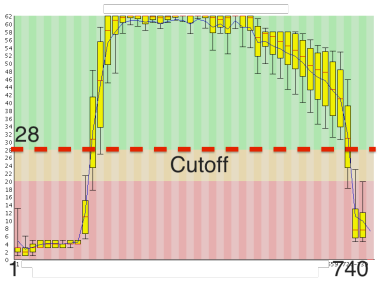


FIGURE 1: Qualité des séquences *avant* d'être trimmées et filtrées sur la qualité

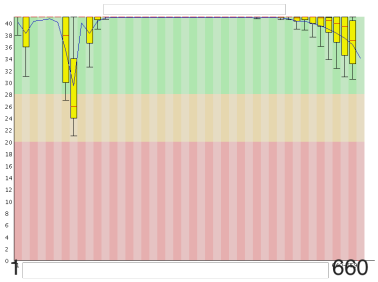


FIGURE 2: Qualité des séquences *après* avoir été trimmées et filtrées sur la qualité

I.B *Présence de contaminations ?*

Pas évident à déterminer : voir après.

I.C *Observations générales*

nombre de SNP par gene synthétique	**moyen**	**sd**	**median**
global	14.4	6.4	15.0
strong	15.5	6.2	15.5
weak	13.3	6.5	13.0

I.D *Nombre de SNPs*

	strong	**weak**
nombre de SNP par gène synthétique	1337	1162
nombre de substitutions	**1970**	529

Pour un nombre de SNPs par gène synthétique sensiblement équivalent, il y a 3.7 fois plus de substitutions *strong* que *weak* !

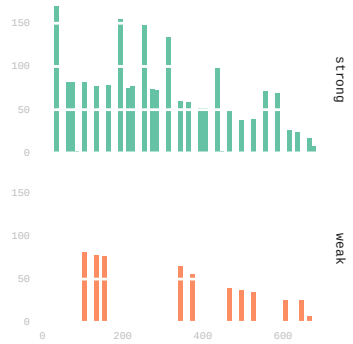


FIGURE 3: Distribution du nombre de substitutions de type *strong*, comparée à celles de type *weak*.

II Distribution des SNPs

II.A *Distribution globale*

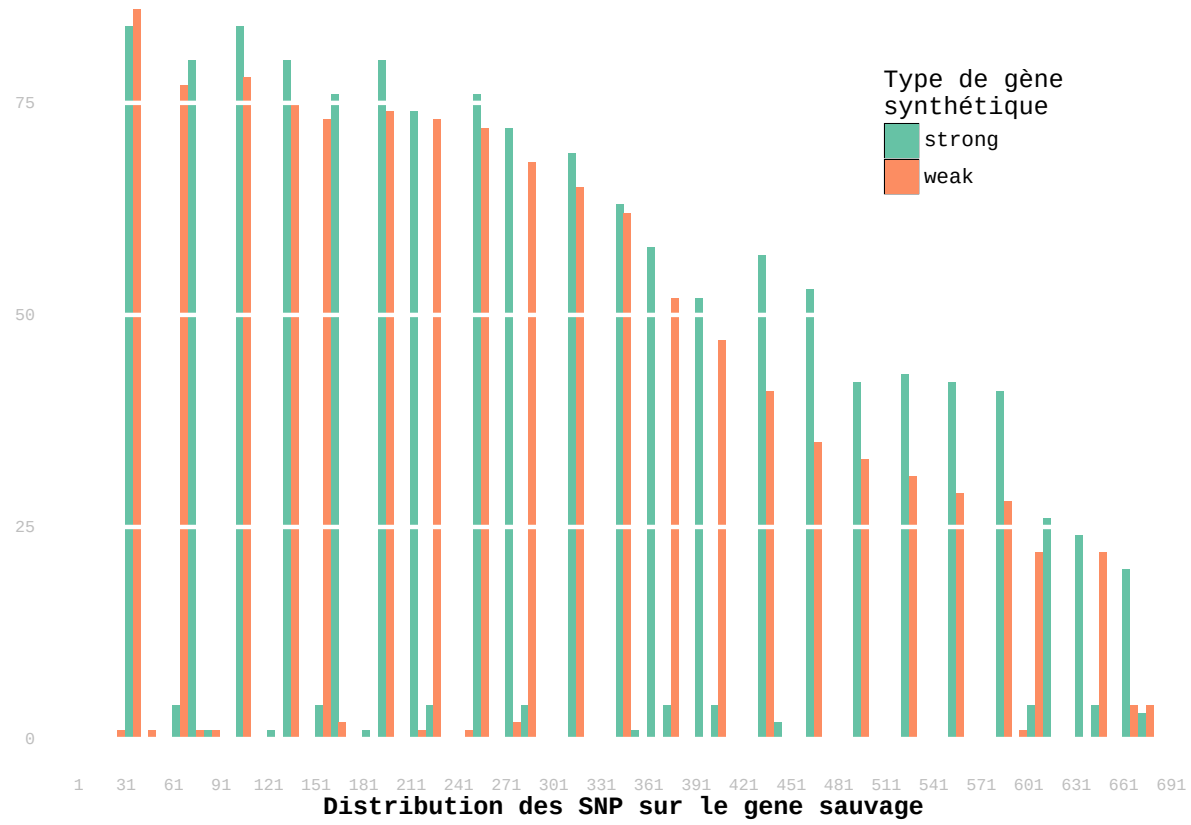


FIGURE 4: La distibution des SNPs, sans tenir compte de la qualité de la mutation. La couleur représente le mutant d'origine, qu'il soit sensé être Weak ou Strong.

Ce graphe représente la distribution des SNPs sur la séquence de référence. Les barres vertes représentent les SNP des gènes synthétiques Strong, les rouges celles des Weak.

Première observation : il y a plus de SNP dans les régions 5′ que 3′. Artefact de séquençage ? Quand on regarde la qualité du *base call* et les spectrogrammes associés, il ne semble pas.

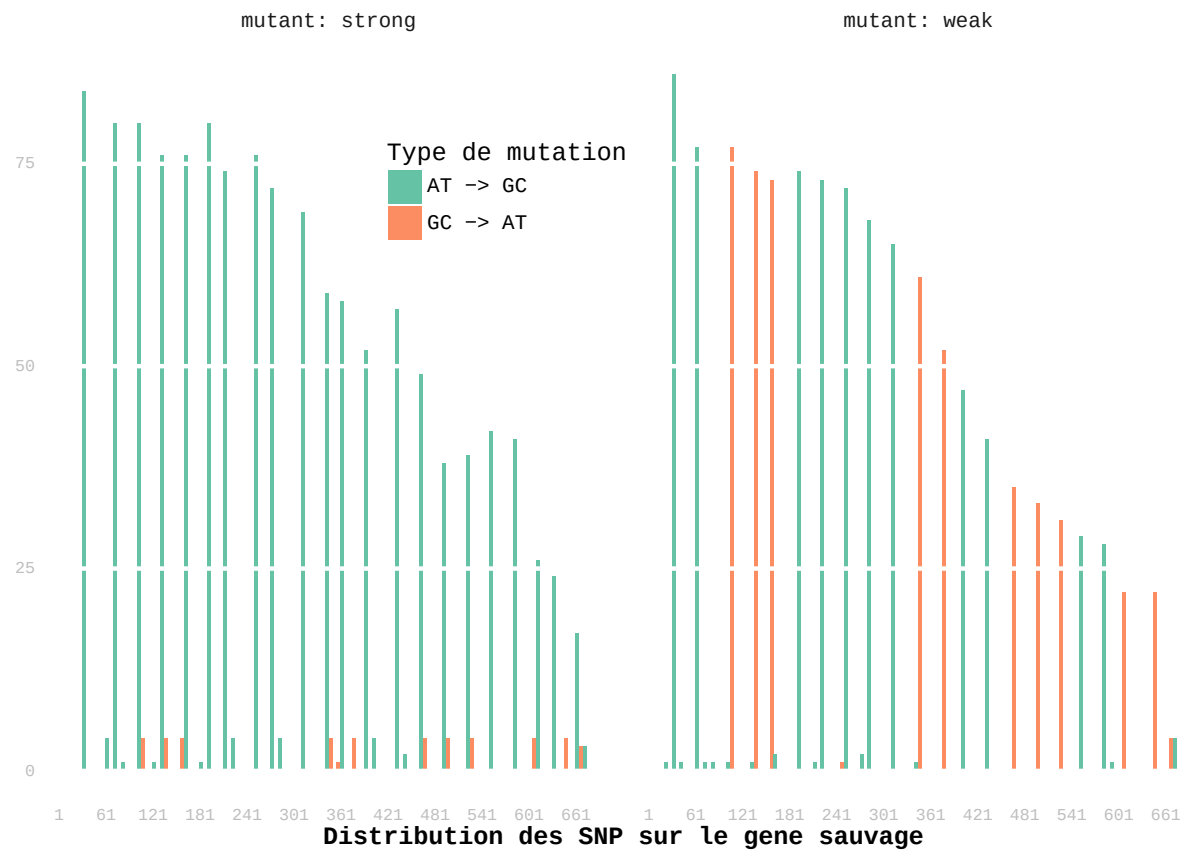
Deuxième observation : les gènes synthétiques Strong génèrent plus de SNPs en 3′ que les Weak. À tester, pas certain que ce soit significatif.

Troisème observation : malgré les filtres et le tronquage, il reste du bruit. Quelques SNP ne sont pas à leur place attendue. Pas facile à éliminer…

CONCLUSION : il y a plus de substitutions dans les régions 3′ que 5′, sur la fin de la conversion tract. Où se fait le switch ?

À noter qu'on n'a pas de SNP après la position 691, alors que la séquence de référence mesure 734bp. C'est dû au trimming *des séquences. On perd l'information des premiers SNP.*

II.B *Distribution de la qualité des mutation*



Ce graphe montre un résultat surprenant.

À gauche, la distribution des SNP générés par les gènes synthétiques de type Strong ; à droite, celle des gènes synthétiques de type Weak. Les barres vertes représentent les substitutions vers GC, *strong* ; les barres rouges les substitutions vers AT, *weak*.

Lorsque le gène synthétique est de type Strong, les substitutions occasionnées sont — quasiment — exclusivement de type *strong*.

Mais lorsque le gène synthétique est de type Weak, les substitutions occasionnées sont à la fois de type *weak* et de type *strong*. Les positions particulièrement concernées sont celles autour de 60, 240, 420 et 600 bp.

FIGURE 5: **Distribution des SNP par position sur la séquence de référence.**

On retrouve bien les positions des polymorphismes “artificiels”, toutes les 30 paires de bases. En vert les mutations *strong* et en rouge les mutations *weak*. Les mutants Strong montrent exclusivement des substitutions *strong*. Les mutants Weak montrent cependant des choses différentes. Il y a beaucoup de mutations *strong*, contrairement à l’attendu.

MONTRÉ AUTREMENT, on voit le problème plus clairement.

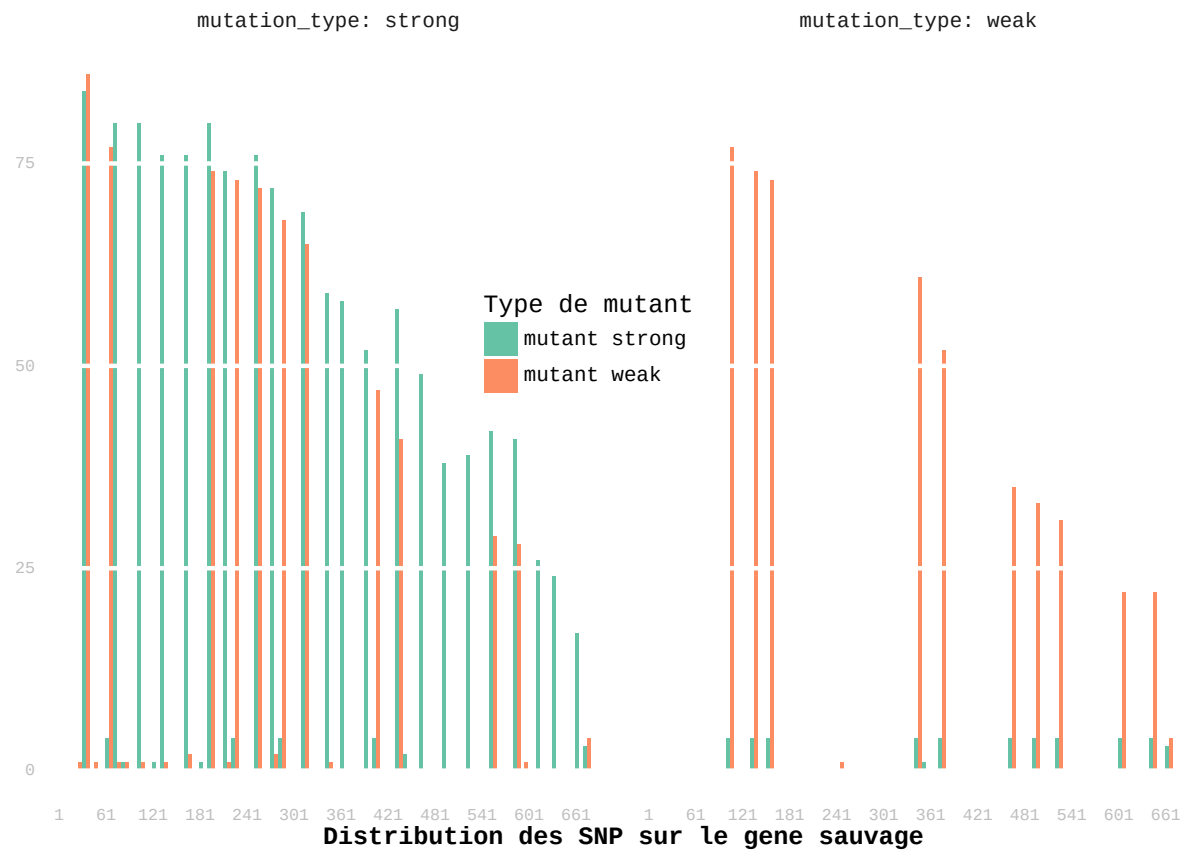


FIGURE 6: **Distribution de la qualité des substitutions**.

À gauche la distribution des substitutions vers GC, à droite celle des substitutions vers A ou T. On voit bien que les mutations *weak* sont quasiment exclusivement dans les mutants de type Weak, alors qu'on retrouve des mutations *strong* dans les deux types de mutants.

À gauche, la distribution des substitutions de type *strong*, vers GC. À droite, celle des substitutions de type *weak*, vers AT. Les barres vertes représentent les substitutions générés par les gènes synthétiques Strong, les rouges celles des Weak.

En figure 7, la distribution de ces SNP qui ne devraient pas exister : les substitutions *strong* générées par les mutants Weak — en rouge —, et les substitutions *weak* générées par les mutants Strong — en vert —. Trois graphes pour dire la même chose.

CONCLUSION : seuls les gènes synthétiques Weak génèrent des substitutions *weak*. Les substitutions *strong* sont générées à la fois par les gènes synthétiques Strong et par les Weak.

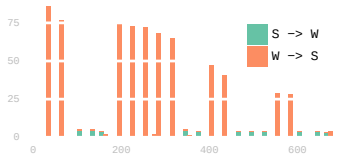


FIGURE 7: Avec ici un focus sur les *outliers qui n'en sont pas*

III Distribution de la position de basculement

III.A *Basculement terminal global*

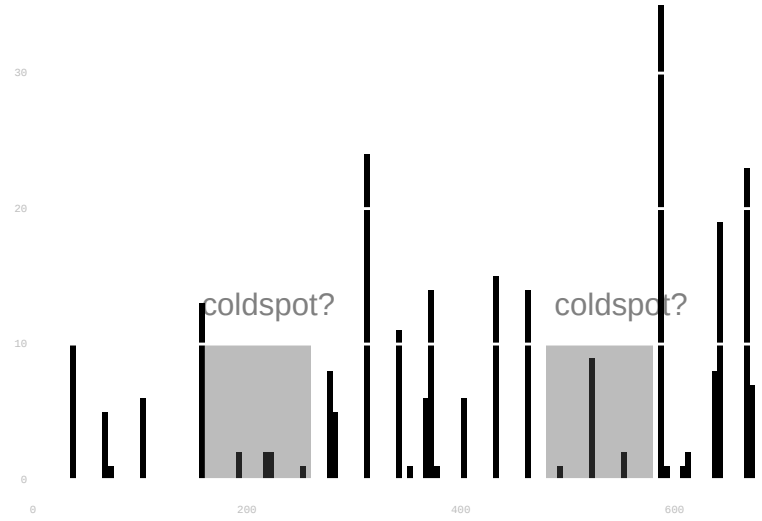


FIGURE 8: **Position des switch, indifféremment de la qualité de la substition ou du mutant**.

Il y a des disparités dans la distribution des positions de basculement. Il y a beaucoup de basculement dès le début, moins vers la fin. Il semble y avoir une sorte de *coldspot* local, autour de 500bp et 200bp sur la séquence de référence.

Ce graphe représente la distribution du dernier SNP par mutant : autrement dit, la position de basculement.

Il y a une très forte hétérogénéité : la distribution est clairement multi-modale. Peut-on parler de coldspot / hotspot local ?

III.B *Position terminale de basculement par type de mutation*

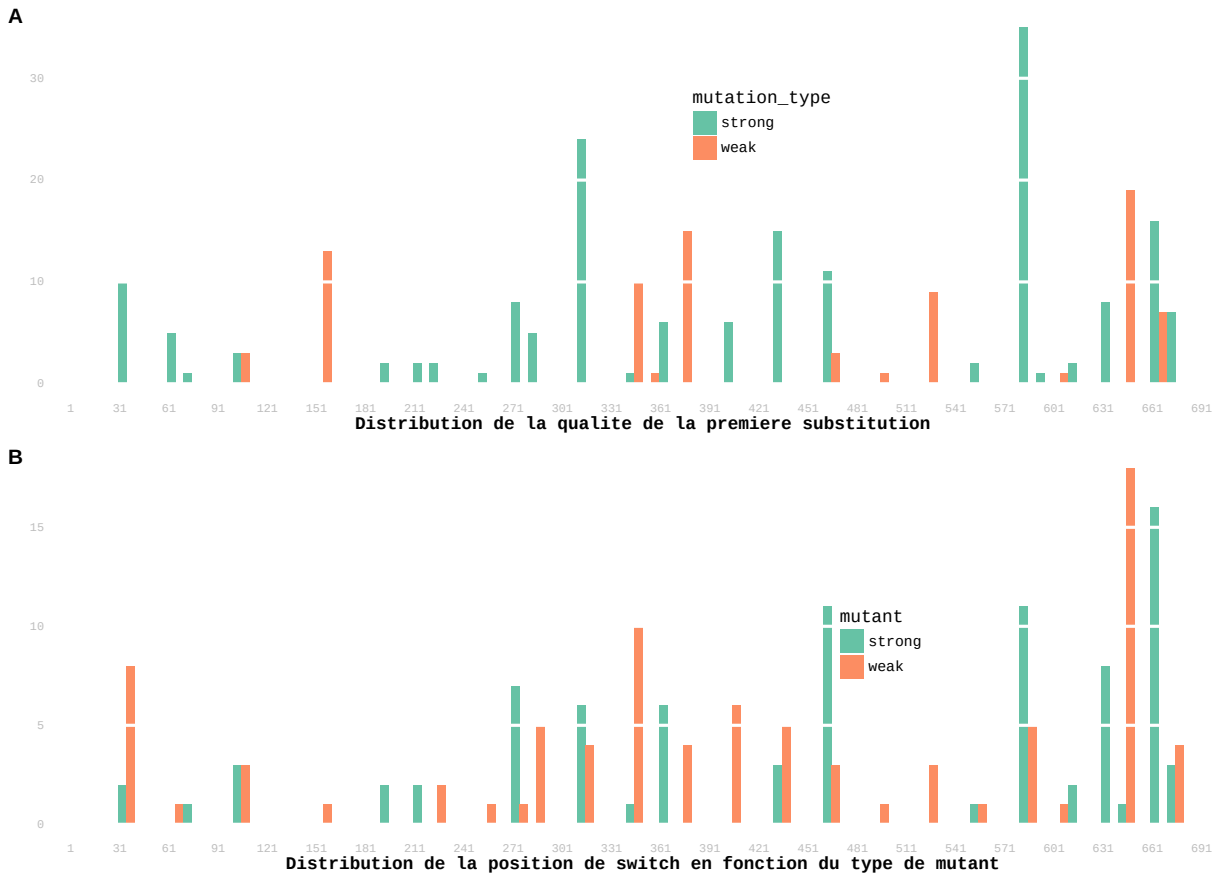


FIGURE 9: Position des switch en fonction du type de mutant.

Le graphe A représente la distribution et la qualité du premier SNP, AT $\mapsto$ GC est *strong* et GC $\mapsto$ AT est *weak*. Le graphe B représente la distribution du premier SNP par clone, en fonction de la qualité du clone, Strong ou Weak.

On ne semble pas voir de différence significative. Dans les deux cas, les distributions sont assez similaires pour le *weak* et le *strong*. Cependant, des différences existent entre les graphes A et B : toutes les premières substitutions sont de type *strong*.

Il y a toujours le même patron de coldspot autour de 541bp.

Le graphe A a été obtenu en filtrant le jeu de donnée de la façon suivante :

— groupe par clone et par type de mutation.

— demande la première position de SNP “groupwise”.

Il représente la position du dernier SNP de type *strong* ou *weak*, par gène synthétique. En fait il ne veut pas dire grand chose mais j’ai pas eu le temps de l’enlever...

Le graphe B a été obtenu en filtrant le jeu de donnée de la façon suivante :

— groupe par clone

— demande la première position de SNP “groupwise”.

Il représente la position du dernier SNP par type de gène synthétique. Il correspond au graphe de Vincent en figure 11.

À VUE D'ŒIL, il n'y a pas de variation significative sur la distribution des SNPs, quelle que soit la qualité du gène synthétique ou de la substitution.

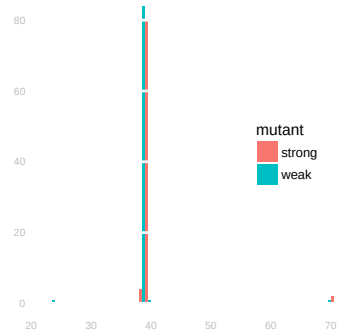


FIGURE 10: Position du premier SNP.

Pas de variation là dessus. À priori les deux mutants terminent au même endroit, c'est à dire au premier site avant le cutoff de trimming.

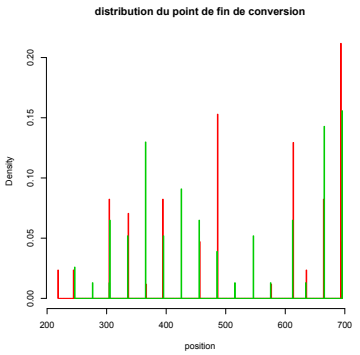


FIGURE 11: Position du dernier SNP.