DE LA RECHERCHE À L'INDUSTRIE







www.cea.fr

# Gestion informatique des données de séquençage

William Amory M1 BI-IPFB Université Paris Cité

Laboratoire de Bioinformatique pour la Génomique et la Biodiversité (Genoscope - LBGB)

Sous la responsabilité de Frédérick Gavory



# Gestion informatique des données de séquençage



- 1 Genoscope LBGB
- 2 Contexte et objectifs de la mission
- 4 Pipeline NGS-RG pour les séquenceurs MGI
- 5 Perspectives



# Laboratoire de Bioinformatique pour la Génomique et la Biodiversité (LBGB)



#### Plusieurs groupes de travail

- Evaluation des techniques de séguençage
- **Production**
- Assemblage
- Annotation

#### Missions du groupe Production

- Répondre aux besoins des équipes de recherches et de productions
- Vielle technologique et évaluation de nouveaux outils
- Développer, tester et maintenir les librairies et scripts
- Mise en place et maintient de pipelines automatisant l'exécution de ces scripts pour le **Genoscope** (centre national de séquençage) et le **CNRGH** (centre national de recherche en génétique humaine)
  - Génération des fichiers de séquences
  - Contrôle qualité et nettoyage des fichiers de séquences
  - Analyses biologiques
- Mise à jour de la base de données de référence NGL (Next Generation LIMS)



# Contexte et objectifs de la mission



# NGS\_RG (Reads Generation) NGS\_QC (Quality Control) NGS\_BA (Biological Analysis) NGS\_WV (Workflow viewer)

Figure 1 – Workflow de génération, de contrôle qualité et d'analyse biologique des FASTQ

https://www.genoscope.cns.fr/rdbioseq/ consulté le 21/06/2022

#### Arrivée des Séquenceurs MGI



#### 2 DNBSEQ-G400

- 2 flowcell 2/4 pistes
- 1.4 TB
- 5000 Millions de reads
- · Taille max des reads :
- 150pb PE
- 400pb SE
- Temps moyen d'un run :
- 24h ~ 30h



#### 1 DNBSEQ-T7

- 4 flowcell 1 piste
- 6 TB
- 1800 Millions de reads
- Taille max des reads :
  - 200pb PE
- 400pb SE
- Temps moyen d'un run :
- 14h ~ 109h

https://en.mgi-tech.com/products/ consulté le 21/06/2022





#### 1 script Perl

#### Qui fait appel à :

- 14 librairies de traitements de run MGI
- 3 librairies communes à tous les traitements de run MGI
- 11 librairies d'intéraction avec NGL pour les run MGI
- 1 librairie commune à tous les type de run

Calcul et Récupération des récupération des Création du run et des rapports de métriques séquençage des pistes d'évaluation du pistes run et des pistes Création des Calcul des readsets, calcul et Concaténation des top index récupération des **Fastq** des pistes métriques d'évaluation Insertion des Méta-Renommage des Distribution des données des **FASTQ** fichiers **FASTQ** Insertion dans NGL Mise à jour de l'état du run et des readsets **Traitements** 





Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes

Concaténatio des Fastq Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des méta-données de Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Création du run et des pistes

#### **Traitements**

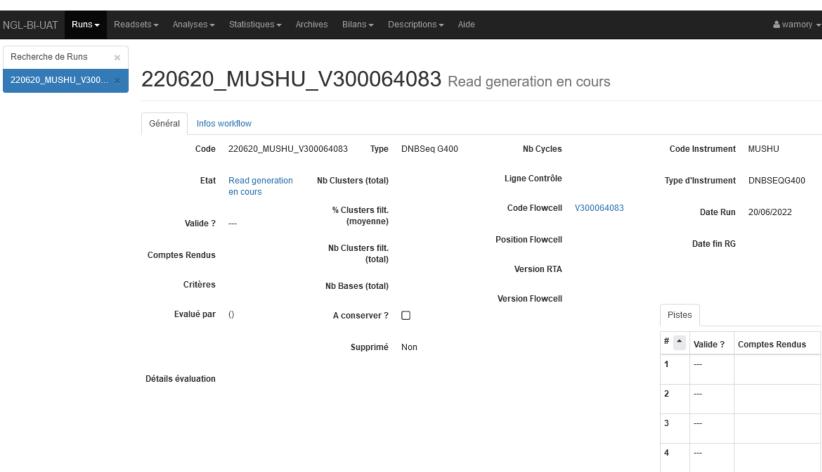
 Création d'un répertoire temporaire de traitement du run

#### NGL

- Création du run
- Création des piste

#### **Objectifs**

 Rendre disponible les informations à propos du run et l'état de traitement de celui-ci aux utilisateurs







Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes

Concaténatio des Fastq Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des néta-données des Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

#### **Traitements**

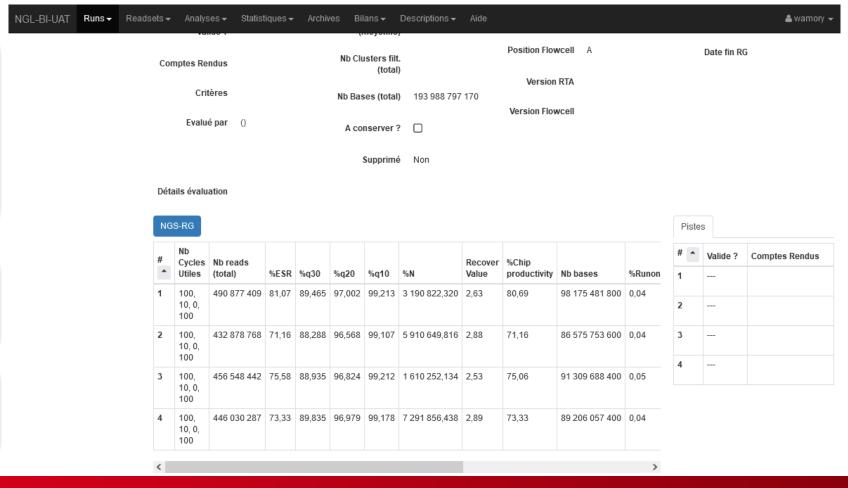
- Récupération des métriques du run et de pistes
  - Nombre de cycle des reads et des index
  - Nombre de reads, de bases
  - Pourcentage de Q30
  - Pourcentage de perte après le premier démultiplexage
  - Etc.

#### NGL

 Insertion des métriques du run et des pistes

#### **Objectifs**

Permettre l'évaluation du run et des pistes







Création du run et des pistes

Calcul et récupération des métriaues d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des

Calcul des top index des pistes des Fastq

écupération des d'évaluation

Renommage des

Insertion des Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Récupération des rapports de séquençage des pistes

#### **Traitements**

- Récupération des rapport de séquençage des piste
  - Contenu du rapport html
  - Extension
  - Nom du rapport

#### NGL

Insertion des rapport de séquençage des pistes

#### **Objectifs**

- Permettre l'évaluation des pistes
- Contient plusieurs tableaux de métriques et de graphique d'évaluation des pistes

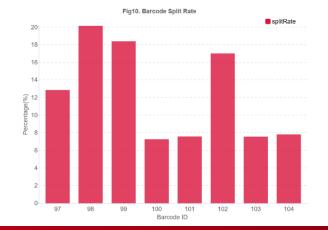
Tab1. Summary Information

| Category            | Value     |
|---------------------|-----------|
| SoftwareVersion     | 1.0.8.208 |
| TemplateVersion     | 0.8.0     |
| Reference           | NULL      |
| CycleNumber         | 210       |
| ChipProductivity(%) | 80.69     |
| ImageArea           | 432       |
| TotalReads(M)       | 485.06    |
| Q30(%)              | 89.57     |
| SplitRate(%)        | 98.82     |
| Runon1(%)           | 0.04      |
| Runon2(%)           | 0.05      |
| Lag1(%)             | 0.14      |
| Lag2(%)             | 0.17      |
| ESR(%)              | 81.07     |
| MaxOffsetX          | 26.24     |
| MaxOffsetY          | 20.61     |
| InitialOffsetX      | 16.37     |
| InitialOffsetY      | 16.48     |
| RecoverValue(A)     | 2.24      |
| RecoverValue(C)     | 2.93      |
| RecoverValue(G)     | 2.97      |
| RecoverValue(T)     | 2.37      |
| RecoverValue(AVG)   | 2.63      |

#### Tab2. Biochemistry Information

| Category          | Value           |
|-------------------|-----------------|
| ISW Version       | 1.0.0.34        |
| Machine ID        | R13040100200006 |
| Sequence Type     | PE100           |
| Recipe Version    | V1.4.0.176      |
| Sequence Date     | 2020-07-21      |
| Sequence Time     | 12:42:50        |
| Reagent ID        | W2006010541     |
| Flowcell Pos      | А               |
| DNB ID            | TEST_circu      |
| Barcode Type      | 1~128           |
| Barcode File      | barcodeAL01.csv |
| Read1 Cycles      | 100             |
| Read2 Cycles      | 100             |
| Barcode           | 10              |
| Dual Barcode      |                 |
| Read1 Dark Cycles |                 |
| Read2 Dark Cycles |                 |

|                     |      |      | F           | ig14. Ave | rage Qua                                      | ality Distr | ibution |     |            |      |     |
|---------------------|------|------|-------------|-----------|---|-------------|---------|-----|------------|------|-----|
|                     |      |      |             |           |   |             |         |     |            | Qual |     |
| 39                  |      |      |             |           |   |             |         |     |            |      |     |
| 38                  |      |      |             |           |   |             |         |     |            |      |     |
| 37                  |      |      |             |           |   |             |         |     |            |      |     |
| 36                  | \\^\ | ~~~~ |             |           |   |             |         |     |            |      |     |
| 35<br>Onality<br>34 |      |      | ··········· |           | <i>س</i> ــــــــــــــــــــــــــــــــــــ | ~\/~v       |         | ٠   | ·········· |      |     |
| ਰੋ 34               |      |      |             |           |   |             |         | •   |            |      | ~~  |
| 33                  |      |      |             |           |   |             |         |     |            |      |     |
| 32                  |      |      |             |           |   |             |         |     |            |      |     |
| 31                  |      |      |             |           |   |             |         |     |            |      |     |
| (                   | 0    | 20   | 40          | 60        | 80<br>Cy                                      | 100<br>ycle | 120     | 140 | 160        | 180  | 200 |







Création du run et des pistes

Calcul et récupération des métriaues d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des

Calcul des top index des pistes des Fastq

Création des récupération des d'évaluation

Renommage des

Insertion des

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Calcul des top index des pistes

#### **Traitements**

- Récupération des index représenté à plus de 0.01% de la pistes et des index attendus
  - Trie des index par ordre décroissant

#### NGL

Insertion top index par piste

#### **Objectifs**

Permettre de vérifier que les index attendus par pistes sont bien majoritairement représentés

William Amory M1 BI-IPFB

| NGS-RG Rapport séquença | ge MGI Démultiplexage MGI |         | Piste | es       |               |
|-------------------------|---------------------------|---------|-------|----------|---------------|
| Lane 1                  |                           |         | # 📥   | Valide ? | Comptes Rendu |
| barcode                 | count                     | percent | 1     |          |               |
| barcode98               | 98 898 442                | 20,147  | -     |          |               |
| barcode99               | 90 340 138                | 18,404  | 2     |          |               |
| arcode102               | 83 544 661                | 17,019  | 3     |          |               |
| barcode97               | 63 193 710                | 12,874  |       |          |               |
| parcode104              | 38 393 930                | 7,821   | 4     |          |               |
| barcode101              | 37 241 062                | 7,587   |       |          |               |
| barcode103              | 37 183 005                | 7,575   |       |          |               |
| parcode100              | 35 681 639                | 7,269   |       |          |               |
| иииииииии               | 1 149 326                 | 0,234   |       |          |               |
| arcode57                | 319 055                   | 0,065   |       |          |               |
| GTTGCATCGT              | 244 878                   | 0,050   |       |          |               |
| CGCCGTGAAT              | 212 841                   | 0,043   |       |          |               |
| GTGCATTCGT              | 207 168                   | 0,042   |       |          |               |
| ACGTCGATCT              | 204 918                   | 0,042   |       |          |               |
| TTGCATTCGT              | 193 336                   | 0,039   |       |          |               |
| GTTGATTCGT              | 135 657                   | 0,028   |       |          |               |
| ACGCGGATCT              | 97 527                    | 0,020   |       |          |               |
| barcode58               | 90 788                    | 0,018   |       |          |               |
| TCCGCGAGT               | 86 393                    | 0,018   |       |          |               |





Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes Concaténation des Fastq Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des méta-données de Fasta

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

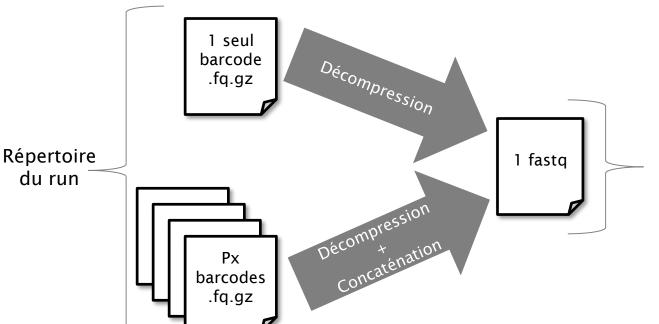
# Concaténation des FASTQ

#### **Traitements**

- Si un seul index :
  - Décompression et renommage du FASTQ
- Si plusieurs index :
  - Décompression, concaténation et renommage des FASTQ

La décompression et la concaténation est réalisé avec **unpigz** sur 2 threads

La technologie MGI requiert une homogénéité des bases pour chaque cycle des index Le démultiplexage génère un FASTQ par index connu Un échantillon peut être divisé en plusieurs fichiers



Répertoire de concaténation de traitement du run

#### **Objectifs**

Obtenir un seul FASTQ par readset





Création du run et des pistes

Calcul et récupération des métriaues d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des

Calcul des top index des pistes Concaténation des Fastq

Création des readsets, calcul et récupération des métriques

Renommage des

Insertion des Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

#### **Traitements (3 traitements)**

- NGSRG
  - Nombre de reads
  - Nombre de bases
  - Qualité moyenne
- Global (sera mis à jour par NGS-QC)
  - Nombre de reads
  - Nombre de bases

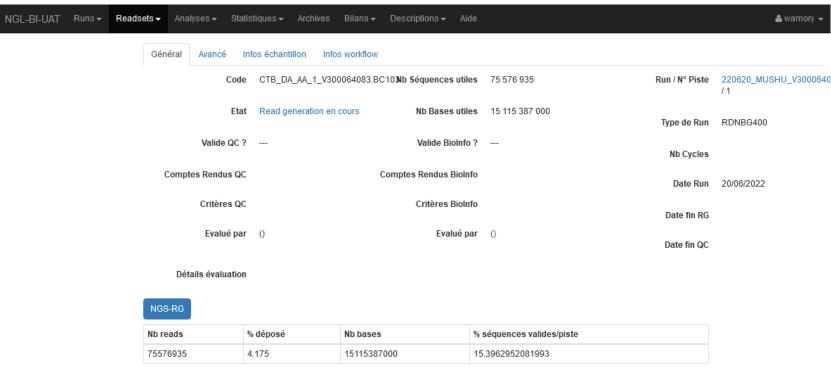
#### **NGL**

- Création des readsets
- Insertion des métriques d'évamluation des readsets

#### **Objectifs**

01/07/2022

Permettre l'évaluation des readsets







Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes Concaténation des Fastq Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des méta-données de Fasta

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Renommage des FASTQ

#### **Traitements**

 Renommage des Fastq selon le format utilisé au Genoscope et CNRGH

Le renommage est réalisé par des liens symboliques des FASTQ issue du traitement de concaténation

#### **Objectifs**

- Tous les fichiers de séquences doivent avoir un nom unique et « parlant »
- Doit permettre d'identifier à quel échantillon, projet, flowcell, ect le fichier appartient

Le format des FASTQ finaux sont :

Ex: ABC\_DA\_AAAA\_1\_2\_F0123456789.BC3.fastq

Répertoire de concaténation du répertoire de traitement du run

concat\_L01\_CTB\_AA\_1.BC103.fastq

Répertoire de renommage des FASTQ du répertoire de traitement du run

CTB\_DA\_AA\_1\_1\_V300064083.BC103.fastq

Lien symbolique





Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes Concaténation des Fastq

Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des méta-données des Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Insertion des méta-données des FASTQ

#### **Traitements**

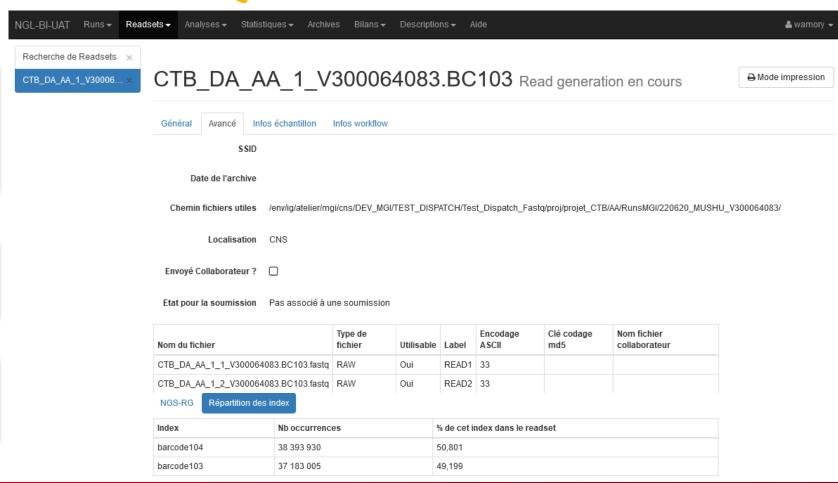
- Récupération de l'extension et du type d'encodage de la qualité
- Construction du chemin du répertoire des fichiers
- Construction du label

#### NGL

 Insertion des méta-données des FASTQ de chaque readsets

#### **Objectifs**

 Décrire les fichiers disponible pour un readset, ainsi que leurs emplacement dans le système de fichers







Création du run et des pistes

Calcul et récupération des métriaues d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des

Calcul des top index des pistes Concaténation des Fastq

Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des **FASTO** 

Insertion des néta-données des Fastq

**Distribution des** fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Distribution des fichiers (FASTQ attendus)

#### **Traitements**

- Dispatch des FASTQ attendus dans le répertoire final de l'échantillon du projet du run
- Changement des droits d'accès au FASTQ (droits restrictifs)

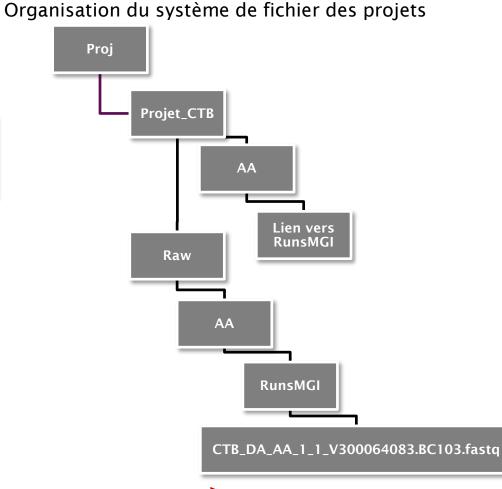
#### **Objectifs**

Rendre disponible les fichiers de séquences, tous en restreignant les droits d'écriture, de lecture et d'exécution aux utilisateurs

Répertoire de renommage de traitement du run

CTB\_DA\_AA\_1\_2\_V300064083.BC103.fastg

copie + chmod







Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes

Concaténation des Fastq

Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des méta-données des Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Distribution des fichiers (fichiers de statistiques)

#### **Traitements**

- Dispatch des fichier de Statistique dans le répertoire dédié
  - 1 archive compressé pour les \*.fqStat.txt par piste
  - 1 archive compressé pour les fichier html par piste
  - Renommage des autres fichiers de statistiques en ajoutant le numéros de la piste
- Changement des droits d'accès aux fichiers de statistiques (droits restrictifs)

#### **Objectifs**

 Conserver les fichiers de statistiques du run Répertoire de renommage et d'archivage des Organisation du système de fichier des fichiers de statistiques de traitement du run statistiques des runs fqStat\_L01.tar.gz stat Report\_html\_L01.tar.gz BioInfo L01.csv summaryTable\_L01.csv SequenceStat\_L01.txt 2022 BarcodeStat L01.txt BasecallQC\_L01.txt firstBaseInfo\_L01.csv Version\_L01.json RunsMGI Copie + chmod 220620 MUSHU V300064083





Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes Concaténation des Fastq

Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des méta-données des Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

# Distribution des fichiers (Fastq non attendus)

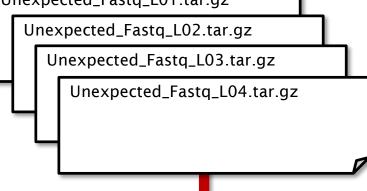
#### **Traitements**

- Renommage des FASTQ non attendus selon le format utilisé au Genoscope
- Dispatch des FASTQ non attendus dans le répertoire dédié
  - 1 archive compressé des FASTQ non attendus par piste
- Changement des droits d'accès au FASTQ (droits restrictifs)

#### **Objectifs**

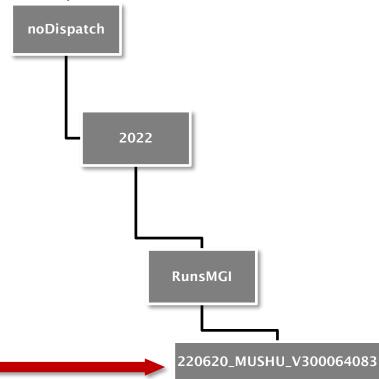
 Conserver les FASTQ non-attendus du run en cas de mauvaise déclaration de la composition en barcode des readsets Répertoire de renommage et d'archivage des FASTQ non attendus de traitement du run

Unexpected\_Fastq\_L01.tar.gz



Copie + chmod

Organisation du système de fichier des FASTQ non attendus des runs



#### Format de renommage :

 $BC < barcode\_number >\_ < lane\_number >\_ < flowcell\_code >. fastq.gz$ 

Pour les FASTQ de barcode non connus BC<barcode\_number> remplacé par UNKNOWN





Création du run et des pistes Calcul et récupération des métriques d'évaluation du run et des pistes

Récupération des rapports de séquençage des pistes

Calcul des top index des pistes

Concaténation des Fastq Création des readsets, calcul et récupération des métriques d'évaluation

Renommage des FASTQ Insertion des méta-données des Fastq

Distribution des fichiers

Mise à jour du run et des readsets

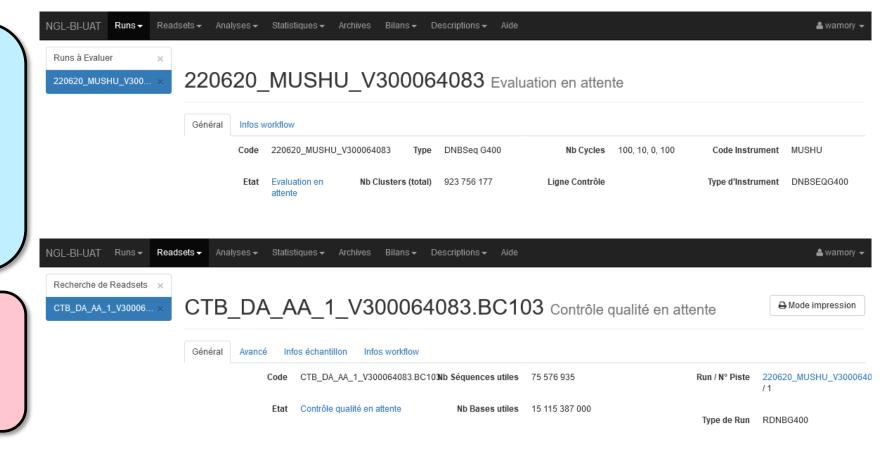
# Mise à jour de l'état du run et des readsets

#### Mise à jour NGL

- Mise à jour du run et des readset en cascade à « Fin de génération de reads »
  - Mise à jour automatique du run à « Evaluation en attente »
  - Mise à jour automatique des readset à « Contrôle qualité en attente »

#### **Objectifs**

- Indiquer que l'évaluation du run peut être réalisé
- Indiquer au pipeline NGS-QC qu'il peut réaliser le contrôle qualité des readsets





#### **Pipeline NGS-RG MGI**

- Ajout du second démultiplexage (démidage) pour les run comportant des mids
- Benchmark du pipeline (identifier les étapes les plus longues en temps, les plus consommatrice de mémoire et les optimiser)

#### **Workflow NGS MGI**

- Ecriture du pipeline NGS-QC MGI
- Mise en production des 2 pipelines (NGS-RG et NGS-QC MGI)

#### **Evaluation d'autres outils**

- Outils d'assignation taxonomique
- Outils de trimming (pour NGS-QC)
- Intégration d'outils des autres groupes de travail dans les pipelines NGS-BA
  - Outils d'assemblage, scaffolding, mapping ...





- Impact of sequencing depth and technology on de novo RNA-Seq assembly. Patterson. 2022-01-23, BMC Genomics. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5965-x
- Comparison between MGI and Illumina sequencing platforms for whole genome sequencing, Jeon, S.A., Park, J.L., Park, SJ. and al. Genes Genom 43, 713-724 (2021). https://doi.org/10.1007/s13258-021-01096-x
- Best practices for the interpretation and reporting of clinical whole genome sequencing. Austin-Tse, C.A., Jobanputra, V., Perry, D.L. and al. npj Genom. Med. 7, 27 (2022). https://doi.org/10.1038/s41525-022-00295-z
- Comparative analysis of 7 short-read sequencing platforms using the Korean Reference Genome: MGI and Illumina sequencing benchmark for whole-genome sequencing. Hak-Min Kim and al. GigaScience, Volume 10, Issue 3, March 2021, giab014, https://doi.org/10.1093/gigascience/giab014
- Highly comparable metabarcoding results from MGI-Tech and Illumina sequencing platforms. Anslan S, Mikryukov V, and al. 2021. Peer J 9:e12254 https://doi.org/10.7717/peerj.12254
- CoolMPS™: Advanced massively parallel sequencing using antibodies specific to each natural nucleobase. Snezana Drmanac, Matthew Callow and al. bioRxiv preprint. https://doi.org/10.1101/2020.02.19.953307
- perl The Perl 5 language interpreter Perldoc Browser. 2022-01-23, https://perldoc.perl.org/perl
- The Comprehensive Perl Archive Network. 2022-01-23, www.cpan.org

DE LA RECHERCHE À L'INDUSTRIE







www.cea.fr

# Merci de votre attention

William Amory M1 BI-IPFB Université Paris Cité

Laboratoire de Bioinformatique pour la Génomique et la Biodiversité (Genoscope - LBGB)

Sous la responsabilité de Frédérick Gavory



# Données Supplémentaires - La technologie MGI



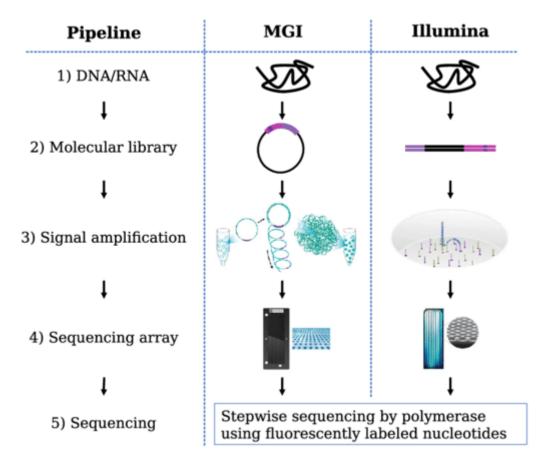


Figure 2 - Différences entre Illumina et MGI de technologie NGL

J. Patterson & all. (2019). Impact of sequencing depth and technology on de novo RNA-Seq assembly. BMC Genomics. 20. 10.1186/s12864-019-5965-x.

### DNB (DNA Nanoball)

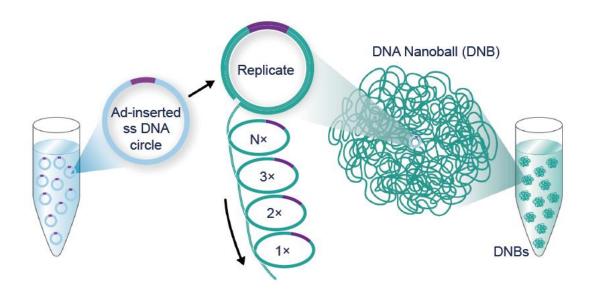


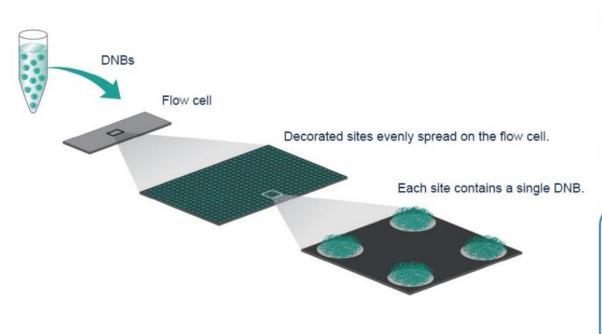
Figure 3 - Schéma de la technologie des DNA nanoballs de MGI

https://en.mgi-tech.com/products/ consulté le 21/06/2022



# Données Supplémentaires - La technologie MGI





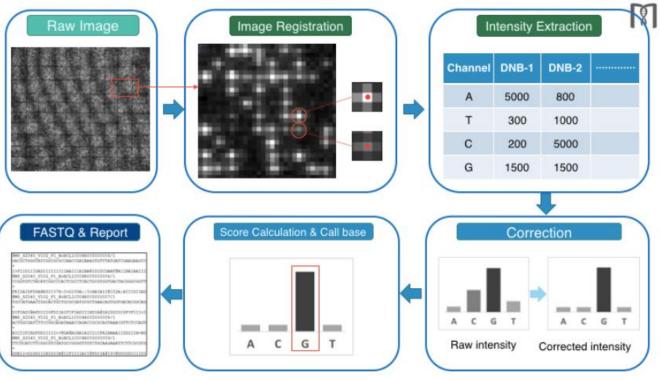


Figure 4 - Schéma d'une flowcell et des DNB dans les puits de la flowcell

Figure 5 - Schéma de basecalling des séquenceurs MGI

https://en.mgi-tech.com/products/ consulté le 21/06/2022

https://en.mgi-tech.com/products/ consulté le 21/06/2022



# Données Supplémentaires - La technologie MGI



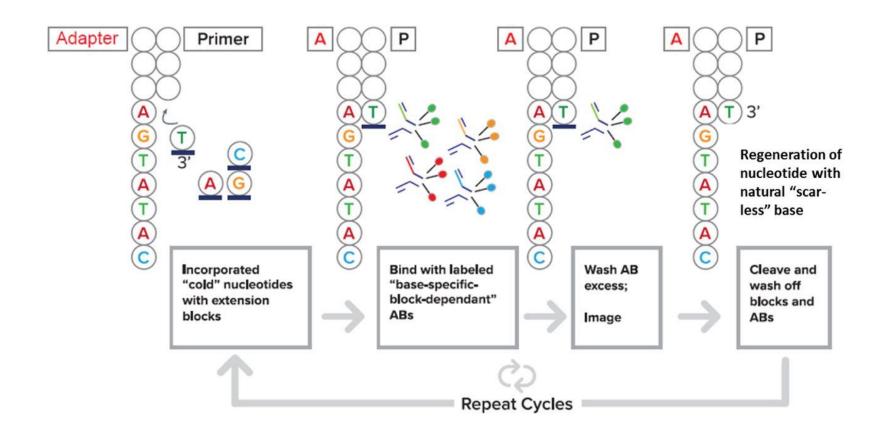


Figure 6 - Schéma de la nouvelle chimie MGI : CoolMPS

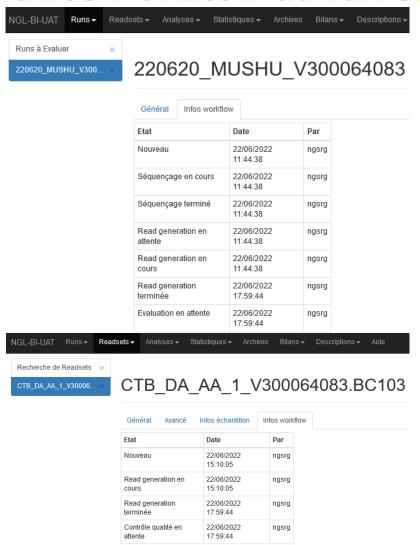
CoolMPS<sup>™</sup>: Advanced massively parallel sequencing using antibodies specific to each natural nucleobase. Snezana Drmanac, Matthew Callow and al. bioRxiv preprint. https://doi.org/10.1101/2020.02.19.953307



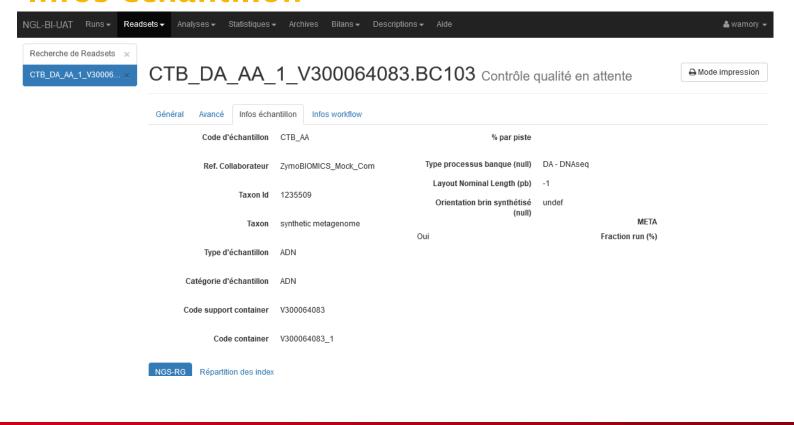
# Données suplémentaire - Autres onglets NGL



# Infos workflow du run et des readsets



# Infos échantillon





# Données supplémentaire - CEA/Genoscope/LBGB



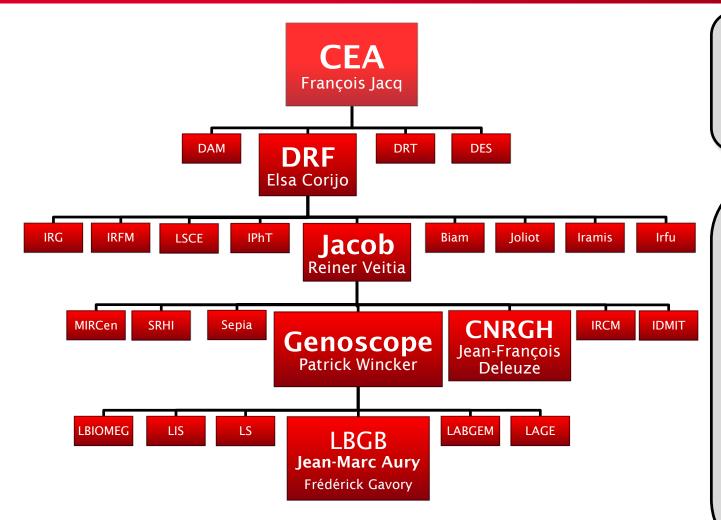


Figure 7 - Organigramme situant l'équipe du *Laboratoire de Bioinformatique pour la Génomique et la Biodiversité (LBGB)* au sein du Genoscope et du CEA (2022)

# CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives)

- créé le 18 octobre 1945 par Charles de Gaulle
- 20 000 Salariés
- 4 directions opérationnelles et 9 directions fonctionnelles

#### Genoscope (Centre National de Séquençage) Créé en 1996 - 250 salariés

- Participation au projet Génome humain (Séquençage du chromosome 14)
- Développerment de programmes de génomiques en France
- Plus grand centre de séquençage français
- France génomique unité mixe de service regroupe les 4 principaux organismes de recherche (CEA, CNRS, TNRA, INSERM) rassemblement de la majorité des plateforme de séquençage et de bioinformatique français
- Projets Tara (Pacific Océans Artic ...) étude des écosystèmes marins
- Projets ERGA (European Reference Genome Atlas) création d'une base de données de références de haute qualité des génomes d'espèces européeene

25