



Laboratoire de Bioinformatique pour la Génomique et la Biodiversité

Master de bioinformatique - ingénierie de plate-forme en biologie UNIVERSITÉ PARIS CITÉ

Rapport d'alternance

Gestion informatique des données de séquençage

22 août 2022

William Amory sous la responsabilité de Frédérick Gavory



Table des matières

Gl	Glossaire 2						
1	Intr	oduction	3				
	1.1	LBGB au sein du Genoscope et du CEA	3				
	1.2	Contexte et missions du LBGB	3				
	1.3	Présentation du workflow NGS	4				
	1.4	La technologie MGI	4				
2	2 Objectifs						
3	Mat	ériels et Méthodes	6				
	3.1	Le cluster de calcul et Slurm	6				
	3.2	La base de données de référence NGL et la gestion des projets	6				
	3.3	Le langage de programmation Perl					
	3.4	Logiciels de $Base\ Calling\ (bcl2fastq\ -\ bcl-convert)\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .$	6				
	3.5	Les pipelines de génération de fichiers de séquences pour les technologies					
		Illumina et Nanopore	7				
	3.6	Les pipelines de contrôle qualité des fichiers de séquences pour les techno-					
		logies Illumina et Nanopore	7				
4	Résultats 8						
	4.1	Résultats des évaluations de bcl2fastq et bcl-convert	8				
		4.1.1 Détermination des meilleurs paramètres pour bcl2fastq	8				
		4.1.2 Comparaison entre bcl2fastq et bcl-convert	9				
		4.1.3 Migration de bcl2fastq vers bcl-convert	10				
	4.2	Le pipeline NGS_RG_MGI	10				
	4.3	Le pipeline NGS_QC_MGI	11				
5	Discussions						
	5.1	Le pipeline NGS_RG_MGI	11				
	5.2	Le pipeline NGS_QC_MGI	11				
6	Perspectives 1						
	6.1	Workflow MGI	11				
		6.1.1 Le pipeline NGS_RG_MGI	11				
		6.1.2 Le pipeline NGS_QC_MGI	11				
	6.2	Évaluation d'outils	11				
No	otes		12				

Glossaire

BGI: Beijing Genomics Institute, est une entreprise Chinoise de biotechnologie fondé en 1999.

CEA: Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CNRGH: Centre National de Recherche en Génomique Humaine

CNS: Centre National de Séquençage (Genoscope)

CPU: Central Processing Unit (Unité Central de Traitement)

DRF: Direction de la Recherche Fondamental

ERGA European Reference Genome Atlas

IBFJ: Institut de Biologie François Jacob

Illumina: Entreprise Californienne de biotechnologie fondé en 1998, qui réalise: R&D, production et vente d'instruments de séquençage d'ADN, de réactifs et de produits connexes

Jira : Logiciel de gestion de projet, d'incidents et de suivi de buds développé par l'entreprise Atlassian

LBGB: Laboratoire de Bioinformatique pour la Génomique et la Biodiversité

LIMS: Laboratory Information Management System

MGI: Filiale du groupe BGI fondé en 2016 dont les missions sont : R&D, production et vente d'instruments de séquençage d'ADN, de réactifs et de produits connexes

NCBI: National Center for Biotechnologiy Information, est un institut national des Etats Unis d'Amériques pour l'information biologique moléculaire. Il dévellope notament la base de données de génomes GenBank et la base de données des publications PubMed

NGL: Next Generation LIMS

NGS: Next Generation Sequencing

Oxford Nanopore: Entreprise Anglaise de biotechnologie fondé en 2005, qui réalise: R&D, production et vente d'instruments de séquençage d'ADN, de réactifs et de produits connexes

PacBio : Pacific Biosciences est une entreprise Californienne fondé en 2004, qui réalise : R&D, production et vente d'instruments de séquençage d'ADN, de réactifs et de produits connexes

Path: Chemin d'accès à un fichier ou à un répertoire dans le système de fichier

PERL: Pratical Extraction and Report Language

RAM: Random Access Memory (Accès Mémoire Aléatoire)

Slurm : Simple Linux Utility for Resource Management qui est un logiciel open source d'ordonnancement des tâches informatiques

1 Introduction

1.1 LBGB au sein du Genoscope et du CEA

Le Genoscope (CNS) a été créé en 1996 pour participer au projet mondial de séquençage du génome humain (Human Genome Project) qui à débuté en 1990 et s'est terminé en 2003. Il a notament participé au séquençage du chromosome 14. Le Genoscope est impliqué dans le développement de programme de génomique en France dans le cadre du projet France génomique. Aujourd'hui les projets phares du Genoscope sont les projets Tara (Pacific, Océans, Artic ...), qui ont pour objectifs l'étude des écosystèmes marins; Le projet ERGA, dont l'objectif est de créer une base de données de références de haute qualité des génomes d'espèces européennes.

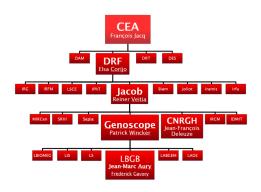


FIGURE 1 – Organigramme situant l'équipe du LBGB au sein du Genoscope et du CEA

Le Laboratoire de Bioinformatique pour la Génomique et la Biodiversité (**LBGB**) dirigé par Jean-Marc Aury, fait partie du Genoscope qui est une composante de l'institut de biologie François Jacob (**IBFJ**) de la direction de la recherche fondamentale (**DRF**) du Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (**CEA**), qui a été fondé le 18 octobre 1945 par Charles de Gaulle. L'intégration du genoscope au CEA a été réalisée en 2007, et en 2017 il devient une composante de l'IBFJ.

1.2 Contexte et missions du LBGB

Les missions qui sont confiées au LBGB sont de réaliser le contrôle qualité des données de séquences issues des différents séquenceurs, d'effectuer l'assemblage¹ des séquences et l'annotation² des génomes, dans l'objectif de mettre à disposition des laboratoires collaborateurs les données avec un premiers niveau da valorisation. Le laboratoire est divisé en plusieurs groupes de travail. Le groupe « production » (dont je fais partie), le groupe « assemblage », le groupe « annotation » et le groupe « évaluation des technologies de séquençage ».

Les missions du groupe de « production » sont de tester des logiciels tiers, de développer et maintenir des scripts utilisant ces logiciels pour gérer efficacement la prise en charge des données en sortie de séquençeur. Cette prise en charge peut répondre à une demande de la production et des laboratoires du Genoscope et du CNRGH, mais aussi pour des laboratoires extérieur. L'objectif principale est la mise en place et le maintient de pipelines automatisant l'ensemble. Le groupe s'appuie sur un travail de vielle et d'évaluation technologique pour chacune de ses missions.

1.3 Présentation du workflow NGS

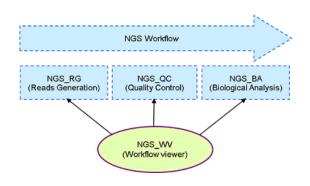


FIGURE 2 — Workflow de génération, de contrôle qualité et d'analyse biologique des fastq

Le workflow NGS est composé de trois pipelines pour les technologies Illumina et Oxford Nanopore. Le premier (ngs_rg³), permet la génération des reads⁴ et des fichiers de séquences correspondant aux échantillons. Le second (ngs_qc⁵), permet de réaliser leurs contrôle qualité. Le dernier (ngs_ba⁶), permet de faire les analyses biologiques inter-échantillons ((readset))⁷.

Ces trois pipelines sont automatisés dans le workflow et permettent de réaliser la distribution des données de séquençage, par projet, échantillons, runs⁸ et technologies de séquençage. Ils réalisent aussi le nettoyage, l'analyse de ces fichiers et mettent à jour la base de données de référence NGL. Les trois pipelines du workflow NGS sont monitorés par NGS Worqflow Viewer (NGS_WV), qui est une application web permettant de surveiller l'avancement des pipelines pour les runs pris en charge par le NGS-workflow.

1.4 La technologie MGI

Le genoscope et le CNRGH ont récement fait l'aquisition de séquenceurs MGI (2 DNBSEQ-G400 et 1 DNBSEQ-T7).



 $\begin{array}{llll} FIGURE & 3 & - \text{ Sequenceurs DNBSEQ-G400} \\ \text{(en haut)} & \text{et DNBT7 (en bas) de MGI} \\ \text{https://en.mgi-tech.com/products/} \end{array}$

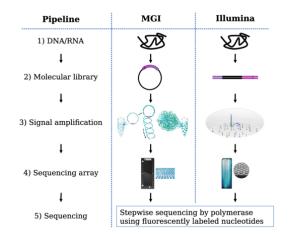


FIGURE 4 — Différences entre Illumina et MGI de technologie NGS

Il s'agit de séquenceurs à haut débit et très haut débit, dont les principales différences entre MGI et Illumina sont dans la création des librairies⁹ et la méthode d'amplification d'ADN. Les librairies sont double brins circulaire pour MGI, alors que pour Illumina elle est double brins linéaire. L'amplification ADN est réalisée en solution et forme des DNB (*DNA-nanoballs*¹⁰), puis déposée sur la Flowcell¹¹ pour MGI, alors que pour Illumina elle est réalisée après immobilisation sur les Flowcell.

Sequencers specifications							
	DNBSEQ-G400	DNBSEQ-T7	HiSeq 4000	NovaSeq 6000			
Max Number of Flow Cells	2	4	2	2			
Max Lane/Flow Cell	4	1	4	4			
Run Time	\sim 14-37 h	\sim 20-30 h	~ 24-84 h	~ 13-44 h			
Data ouput/Run	0.27-1.4 Tb	1-6 Tb	0.9-1.8 Tb	1-6 Tb			
Max Reads/Run	1.8 billions	5 billions	10 billions	20 billions			
Max Read Length	$2 \times 200 \text{ bp}$	$2 \times 150 \text{ bp}$	$2 \times 150 \text{ bp}$	$2 \times 250 \text{ bp}$			

Table 1 – Spécification des séquenceurs

2 Objectifs

L'objectif principale de ma mission est la mise en place d'un workflow NGS pour les séquenceurs de MGI. Plus précissément il s'agira de créer un pipeline de génération de fichier de séquences (ngs_rg_mgi¹²) et un pour le contrôle qualité de ces fichiers (ngs_qc_mgi¹³). Le workflow devra créer et mettre à jour l'état des runs, des lanes¹⁴ et de readset¹⁵ dans ngl, réaliser le contrôle qualité des fichiers de séquences, au format fastq, obtenu après démultiplexage¹⁶ des runs. Il devra mettre à jour l'avancement du traitement d'un run dans NGL, en y insérant les statistiques obtenues lors du démultiplexage, les résultats des contrôles qualités, etc. Puisque l'objectif est d'obtenir un premier niveau de valorisation des fichier de séquences, permettant aux autres groupes (« assemblage », « anotation ») de prendre en charge ces fichiers avant de les mettrent à disposition des laboratoires collaborateurs.

Je dois également, rechercher et réaliser des évaluations de nouveaux outils pour les différents pipelines des différentes technologies de séquençage. En vue d'un potentiel ajout ou de remplacement d'outils. Il sera donc necessaire de maintenir les pipelines des différentes technologies de séquençage en conséquence.

3 Matériels et Méthodes

3.1 Le cluster de calcul et Slurm

Le Genoscope possède (dire le nombre de noeuds et leurs spécificité.) expliquer small, normal, Xlarge et xxlarge. Il y a 12 noeuds de calculs pour la *production* sur le nouveau cluster *inti*, ces derniers disposent de 16 cœurs et de 257 Go de RAM(mémoire vive). L'accès à l'utilisation des clusters est réalisé par le logiciel Slurm.

3.2 La base de données de référence NGL et la gestion des projets

Le Genoscope dispose de sa propre base de données de référence NGL. Celle-ci est divisée en plusieurs parties. NGL_BI¹⁷, est la partie de la base de données utilisée par les équipes de bioinformatique. NGL_SEQ¹⁸, est la partie de la base de données utilisée dès la réception des échantillons et jusqu'au séquençage de ces derniers. Il y a également les parties NGL_sub¹⁹, NGL_reagent²⁰ et NGL_projects²¹. La gestion et le suivi du développement informatique sont réalisés par le système de tickets Jira.

3.3 Le langage de programmation Perl

L'écriture du workflow des pipelines pour les séquenceurs MGI est réalisée dans le langage de programmation Perl. L'utilisation de ce langage est rendu necessaire pour des raisons historique du laboratoire, puisque de nombreuses librairies et modules qui ont été utilisé dans l'écriture des pipelines sont écrits en Perl.

C'est pour toutes ces raisons qu'il m'a été nécessaire d'apprendre à coder en Perl. j'ai donc commencé par réaliser un programme permettant de faire des analyses statistiques élémentaires sur des fichiers fastq, tel que le taux de GC, la moyenne du score de la qualité, ainsi que plusieurs autres métriques. Le programme est capable de gérer les fichiers fastq issue de séquençage single end²² et paired end²³. Cela m'a permis de prendre en main les librairies Perl utilisées pour les différents pipelines déja en place. Ainsi que de m'habituer à l'environement de travail, l'utilisation du lancement de job sur les noeuds de calculs et l'utilisation des modules²⁴ pour les différents pipelines.

3.4 Logiciels de Base Calling (bcl2fastq - bcl-convert)

Ces deux logicels de Base Calling (bcl2fastq et bcl-convert), sont tout deux développé et commercialisés par Illumina. Cette évaluation entre ces deux logiciels est nécessaire pour déterminer les changements qu'il y aura à faire dans les pipelines de génération de fichiers de séquences pour les technologies Illumina. En vue du remplacement de bcl2fastq (qui sera bientôt obsolète) par bcl-convert.

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer les conditions optimales de bcl2fastq (temps total, temps CPU, pourcentage d'utilisation CPU en fonction des ressources disponibles sur les noeuds du cluster (inti) réservé à la prodution, avec l'objectif de pouvoir appliquer les mêmes conditions à bcl-convert. Les conditions optimales sont déterminées en fonction des paramètres suivants de bcl2fatq (l'équivalent de bcl-convert est indiqué entre crochets) :

- \bullet r [bcl-num-decompression-threads] : nombre de $threads^{25}$ accordé pour la décompréssion et la lecture des $Bases\ Calls^{26}$
- p [bcl-num-conversion-threads] : conversion des Bases Calls en fastq
- w [bcl-num-compression-threads] : écriture et compréssion des fichiers fastq

Tous ces tests sont réalisés sur le même noeud de calcul, dans l'objectif de minimiser les biais. La comparaison est effectuée sur le temps total de génération des fastq et le démultiplexage, ainsi que le temps CPU et le pourcentage d'utilisation des CPU.

3.5 Les pipelines de génération de fichiers de séquences pour les technologies Illumina et Nanopore

Les pipelines de générations de fichiers de séquences pour les technologies Illumina et Nanopore réalisent dans un premier temps le *Base Calling* permettant la création des fichiers de séquences corespondant aux échantillons et des fichiers de statistiques de ces derniers. Ils créer les runs, les pistes, et les readset dans NGL_BI en y insérant les metriques, graphiques et fichier permettant leurs évaluations.

Concernant le pipeline de génération de fichiers de séquences pur la technologie MGI, il s'agira de dévelloper un pipeline simillaire à celui d'Illumina en prenant en compte que le Base Calling est directement réalisé par les séquençeurs. Les métriques, graphiques et fichiers de statistiques sont également différents d'Illumina. Il sera donc necessaire de trouver comment obtenir les métriques, graphiques et fichiers, ou de les calculer, générer à partir des données générer lors du Base Calling par le séquençeur permmetant de les insérer dans NGL_BI

3.6 Les pipelines de contrôle qualité des fichiers de séquences pour les technologies Illumina et Nanopore

Les pipelines de contrôle qualité des fichiers de séquences réalisent différentes étapes de contrôle qualité et de nettoyage des fichiers de séquences. Il réalise le contrôle qualité et l'estimation de duplicat des fichiers avant et après netoyage (trimming), il retire le

 $PhiX^{27}$ (pour les technologies Illumina), réalise l'assignation taxonomique des séquences, réalise un allignement des séquences si un génome de référence existe, réalise le calcul du pourcenatage de séquences qui ont leurs reads forward (brin sens) et reverse (brin anti-sens) qui se chevauche et réalise la distribution des fichier de séquences netoyés dans leurs répertoires de projet, d'échantillon, de type de technologie et de run.

Concernant le pipeline de contrôle qualité des fichiers de séquences pour la technologie MGI il s'agira de développer un pipeline similaire à celui d'Illumina en prenant en compte qu'avec cette technologie il n'y a pas de PhiX à enlever dans les fichiers de séquences.

4 Résultats

4.1 Résultats des évaluations de bcl2fastq et bcl-convert

4.1.1 Détermination des meilleurs paramètres pour bcl2fastq

Après avoir effectué différentes combinaisons des paramètres, il a été mis en évidence que la variation du paramètre r et w en fixant le paramètre p, n'apportait pas de différences significatives pour le temps total d'exécution, le temps cpu ou le pourcentage d'utilisation cpu, comme on peut l'observer sur la figure 5, pour p fixé à 12. Des resultats similaires ont été obtenus pour p égale à 4, 8 et 16.

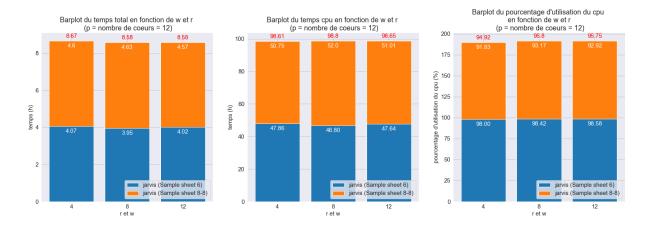


FIGURE 5 — Digrammes en bâtons du temps total d'éxécution (à gauche), temps cpu (au milieu) et du pourcentage d'utilisation des cpu (à droite) en fonction des paramètres r et w

Il y a deux sample sheet²⁸, car le nombre de bases considérés des reads index entre les lanes est différent, obligeant à réaliser deux appels différents au logiciel pour générer les fastq et le démultiplexage. Ci dessous, la figure 6, représente les résultats obtenus en faisant varier p et en fixant les paramètres r et w à 4 (ces deux paramètres sont fixés à 4 pour pouvoir comparer les 4 résultats). On observe que plus on augmente le nombre de cours et le nombre de threads pour p, plus l'execution est rapide. On observe que le temps

cpu augmente bien avec le nombre de cœurs et que le pourcentage d'utilisation des cpu est optimal (> 90%).

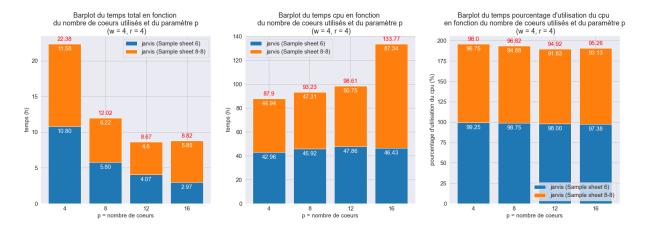


FIGURE 6 – Digrammes en bâtons du temps total d'éxécution (à gauche), temps cpu (au milieu) et du pourcentage d'utilisation des cpu (à droite) en fonction du paramètre p

Au vue des résultats obtenus nous avons décidé que les meilleurs paramètres étaient de fixer p à 12, puisque le gain apporté en augmentant à 16 est faible. Néanmoins nous le conserverons pour réaliser la comparaison avec bel-convert, tout comme p fixé à 8, car il nous permettrait de réaliser deux générations de fastq et de démultiplexage en simultané sur un seul noeud de calcul.

4.1.2 Comparaison entre bcl2fastq et bcl-convert

J'ai donc fait varier les paramètres p, r et w de manière à ce que chacun des paramètre soient égale au nombre de cœurs accordés aux deux logiciels. On observe bien, sur la figure 7, que plus on augmente le nombre de cœurs pour chacun des logiciels (et donc le nombre de threads pour p, r et w) plus la génération des fastq et le démultiplexage est rapide. De plus on remarque que bcl-convert permet de réduire le temps d'environs 1/3 par rapport à bcl2fatq.

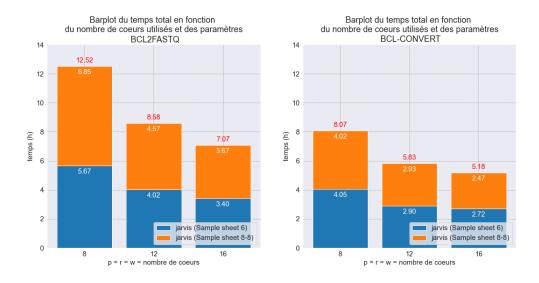


FIGURE 7 – Temps total de génération des fastq pour bcl2fastq et bcl-convert

J'ai également échangé avec le service technique d'Illumina à propos des fichiers de sortie et de l'arborescence de bcl-convert. En effet il s'avère que l'arborescence et les fichiers de sortie sont très différents entre les deux logiciels. Ces échange avaient pour objectif de savoir s'il on pouvait obtenir une arboresnce similaire à bcl2fastq, pour minimiser l'impact du changement de logiciel sur les pipelines. Le changement de bcl2fstq, qui sera bientôt obsolète, par bcl-convert va nous obliger à réaliser de gros changements dans tous les pipelines qui utilisent ces fichiers de sortie et va demander aussi au laboratoire de séquençage de s'adapter à la nouvelle sample sheet de bcl-convert.

4.1.3 Migration de bcl2fastq vers bcl-convert

Le logiciel bcl-convert étant plus rapide d'environ 1/3 par rapport à bcl2fastq et que ce derniers sera bientôt obsolète. Sachant également, que le nombre de coeurs disponible par noeuds pour la partition production du cluster de calcul est de 16 coeurs. Nous avons décidé t'attribuer l'intégralité des coeurs d'un noeud de « production », c'est à dire 16 coeurs. L'intégralité des changement entre les deux logiciels à été consignés dans un cahier des charges. Il contient, la commande à lancé pour réaliser le Base Calling, modules à charger dans l'environement, le chemin relatif des fichiers de sorties, ainsi qu'un exemple d'arborescence des fichiers de sorties. Ce qui permettera au développeur qui ce chargera de cette migration de suivre ce cahier des charge et ainsi faciliter la migration. Dû à la pression actuelle autour de la technologie MGI, c'est un autre développeur qui sera en charge de réaliser cette migration.

4.2 Le pipeline NGS_RG_MGI

description des étapes les plus importantes et de l'intéret de les insérer dans NGL.

4.3 Le pipeline NGS_QC_MGI

description des étapes les plus importantes et de l'intéret de les insérer dans NGL.

5 Discussions

5.1 Le pipeline NGS_RG_MGI

???????????????????

5.2 Le pipeline NGS_QC_MGI

???????????????????

6 Perspectives

6.1 Workflow MGI

Concernant le workflow de MGI, il nous faut dans un premier temps déterminer les outils et méthodes necessaires (utilisation de ceux du workflow d'Illumina ou de nouveaux). Une fois ceci déterminé il restera à écrire les deux pipelines, celui de génération de reads (ngs_rg_mgi) et celui de contrôle qualité (ngs_rg_mgi). L'objectif sur le long terme est d'arriver à un workflow totalment automatisé, comme celui d'Illumina.

6.1.1 Le pipeline NGS_RG_MGI

ajout démidage, maintient pipeline.??????????

6.1.2 Le pipeline NGS_QC_MGI

maintient pipeline.?????????

6.2 Évaluation d'outils

Il y aura aussi l'évaluation d'autres outils utiles pour les pipelines, comme des outils de *trimming*, *filtering*, d'assignation taxonomique, etc.

Notes

- ¹Reconstruction d'un génome à partir de fragments de ce dernier
- ²Documenter le plus exhaustivement possible les informations de l'assemblage permmettant de prédire la fonction d'une molécule
 - ³Next Generation Sequencing reads generation
 - ⁴Lecture d'une séquence par un séquenceur d'un fragments d'ADN
 - ⁵Next Generation Sequencing quality control
 - ⁶Next Generation Sequencing biological analysis
 - ⁷Un lot de séquences est une instance de séquences (ou reads) d'un échantillon
 - $^8{\rm S\acute{e}quençage}$ d'un ou plusieurs échantillons sur un séquenceur
- ⁹Collection de fragment d'ADN issue du génome complet d'un organisme ou plusieurs organismes (méta-génomique) et clonés dans un vecteur (le plus souvanet dans des plasmides)
 - ¹⁰Nanobilles d'ADN générées par la réplication de l'ADN circulaire
 - $^{11}\mathrm{Lame}$ d'absorbtion des fragments d'ADN et cuve réacteur du séquençage
 - ¹²Next Generation Sequencing reads generation mgi
 - $^{13}Next\ Generation\ Sequencing$ quality control mgi
 - ¹⁴pistes présentes sur la *flowcell*
 - ¹⁵Lot de séquences
 - $^{16}{\rm S\'{e}paration}$ des différents reads d'une lane en fonction de l'index d'échantillon
 - ¹⁷NGL Bioinformatic
 - ¹⁸NGL Sequencing
- ¹⁹NGL submission (base de données des soumissions de projet (example la soumission d'un projet au NCBI))
 - ²⁰NGL reagent (base de données des réactifs)
 - ²¹NGL projects (base de données des projets en cours et passé)
 - $^{22} {\rm Lecture}$ dans un seul sens des reads par le séquenceur
 - ²³Lecture dans les deux sens des reads par le séquenceur
- ²⁴Un module contient un ou plusieurs logiciels tiers ou dévellopé par les équipes du genoscope. Il est néccessaire de les charger dans notre environement de travail pour pouvoir utiliser ces logiciels.
 - $^{25} \mathrm{Processus}$: instructions du langage machine d'un processeur.
 - 26 Fichier d'attribution des bases nucléiques en fonction des pics du chromatogramme lors du séquençage
- ²⁷Parties du génome du phage *Lambda* qui sont ajoutés sur les pistes des flowcell avant le séquençage, permettant de contrôler le bon déroulé du séquençage.
 - ²⁸Fichier contenant les informations et instructions pour la génération des fastq et le démultiplexage