Les principaux formats de fichiers bioinformatiques

Sarah Maman

Format FASTA

Sans doute le format de fichier **le plus répandu** car trés simple et l'un des plus pratiques.

>gi|22777494|dbj|BAC13766.1| glutamate dehydrogenase [Oceanobacillus iheyensis]

MVADKAADSSNVNQENMDVLNTTQTIIKSALDKLGYPEEVFELLKEPMRILTVRIPVRMDDGNVKVFTGY

RAQHNDAVGPTKGGIRFHPNVTETEVKALSIWMSLKSGIVDLPYGGAKGGIICDPREMSFRELEALSRGY

VRAVSQIVGPTKDIPAPDVFTNSQIMAWMMDEYSKIDEFNNPGFITGKPIVLGGSHGRESATAKGVTIVL

NEAAKKKGIDIKGARVVIQGFGNAGSFLAKFLHDAGAKVVAISDAYGALYDPEGLDIDYLLDRRDSFGTV

TKLFNNTISNDALFELDCDIIVPAAVENQITRENAHNIKASIVVEAANGPTTMEATKILTERDILIVPDV

LASAGGVTVSYFEWVQNNQGFYWSEEEIDNKLHEIMIKSFNNIYNMSKTRRIDMRLAAYMVGVRKMAEAS

Un fichier au format FASTA peut contenir plusieurs séquences. Chaque séquence (écrite sous forme de lignes de 80 caractères maximum), est précédée d'une ligne de titre (nom, définition ...) qui doit commencer par le caractère ">".

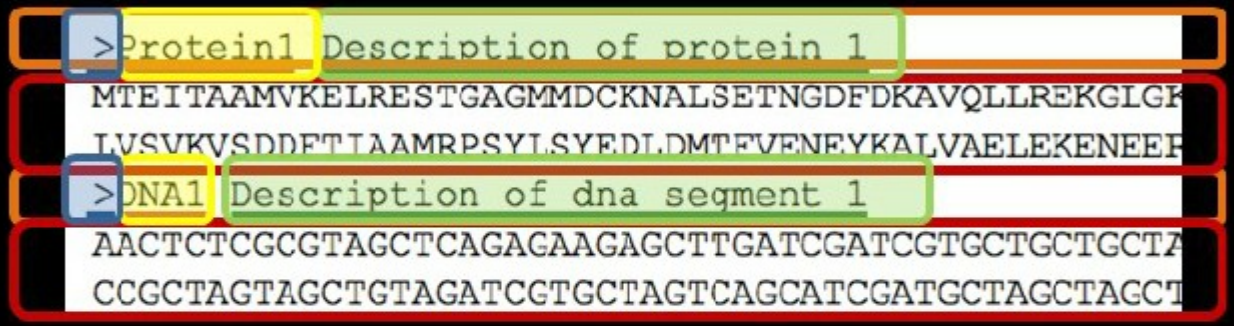
gi|22777494 : l'identifiant gi ("GenInfo Identifier") est le numéro d'identification d'une séquence (acides aminés ou nucléotides). Si une séquence est modifiée, un nouveau numéro de GI est attribué.

Format FASTA

Fasta: text file

Most basic file format to represent nucleotide or amino-acid sequences.

Each sequence is represented by:
– A single description line (≤ 80 characters)
– The sequence (≈ 70-80 characters per line, one or several lines)



Description line The sequence

> Start of the description line

DNA1 Sequence ID and a space

Description .... Description of the sequence

FASTQ, SAM et BAM

4 types de formats de fichiers sont couramment utilisés :

FASTQ : format basé sur du texte pour stocker une séquence biologique (généralement la séquence nucléotidique) et des scores de qualité liés à cette séquence (les 2 sont codés par des caractères ASCII sur plusieurs lignes - exemple : la ligne 1 commence avec le caractère @). C'est le fichier de données brutes issues du séquenceur.

SAM ("Sequence Alignment/Map") : format basé sur du texte délimité avec une section en-tête (facultative) et une section alignement. BAM : codage binaire du ficher SAM correspondant.

GTF ("Gene Transfer Format") : format basé sur du texte délimité par des tabulations et des champs. Ce format est utilisé par beaucoup de logiciels pour décrire la structure des transcrits (introns, exons, sites de démarrage, UTR, ...) et le lien entre les transcrits et le gène auquel ils sont associés.

BAM ("Binary Alignment/Map") : format compressé au format de compression BGZF. L'objectif de BGZF est de fournir une bonne compression tout en permettant un accès aléatoire efficace au fichier BAM pour des requêtes indexées.

Format FASTQ

C'est un format basé sur du texte pour stocker à la fois une séquence biologique (séquence nucléotidique habituellement) et ses scores de qualité.

Une valeur de qualité Q est un nombre entier qui traduit la probabilité que l'appel de la base correspondante est incorrect.

Fichier ci-dessous : première ligne = nom de la séquence après le symbole @ (et, éventuellement, la description) / deuxième ligne = la séquence / quatrième ligne = scores de qualité codés sous forme de lettres.

@sequence 1

ATCGATCAAATAGTCCATTTCACAGTTTGGATTTGGGGTCACAGTTTAAGCAGTTTCAACT

+

!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCC

- 1 séquence = 4 lignes dans le fichier

```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT
+
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

- 1 ère ligne = identifiant de la séquence

```
@EAS139:136:FC706VJ:2:2104:15343:197393 1:Y:18:ATCACG
```

EAS139	the unique instrument name
136	the run id
FC706VJ	the flowcell id
2	flowcell lane
2104	tile number within the flowcell lane
15343	'x'-coordinate of the cluster within the tile
197393	'y'-coordinate of the cluster within the tile
1	the member of a pair, 1 or 2 *(paired-end or mate-pair reads only)*
Y	Y if the read fails filter (read is bad), N otherwise
18	0 when none of the control bits are on, otherwise it is an even number
ATCACG	index sequence

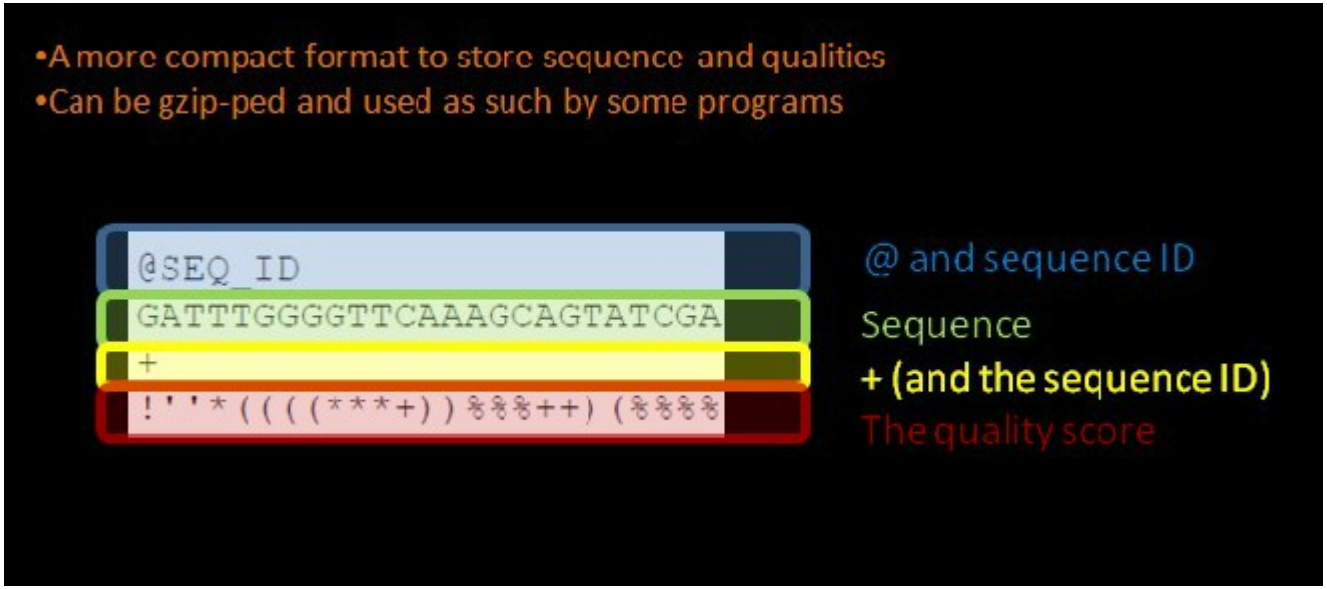
Format FASTQ (suite)

- 4ème ligne = Qualité

```
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

- Appelée aussi Phred quality score (Sanger format)

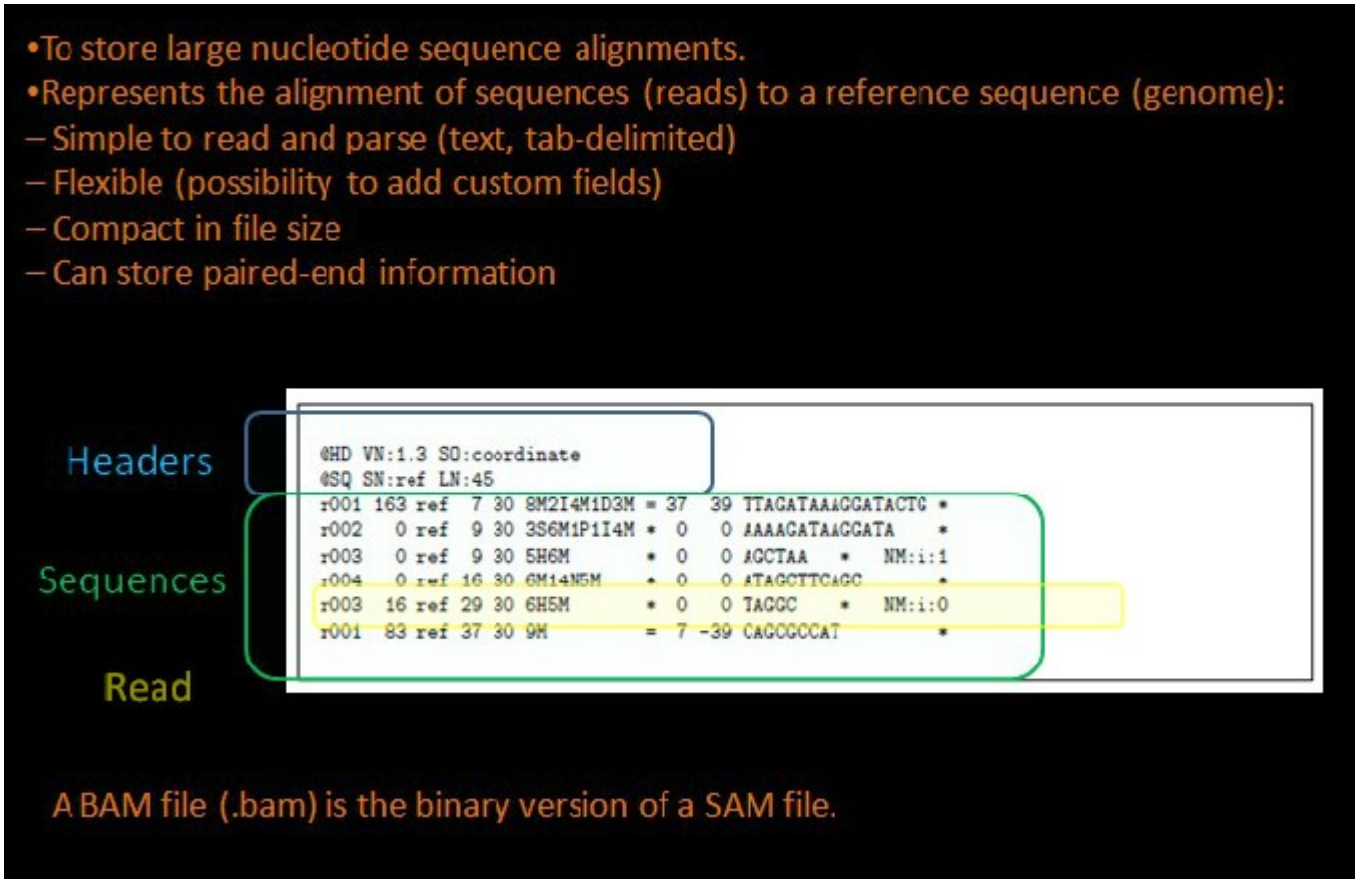
$Q_{\text{sanger}} = -10 \log_{10} p$ Probabilité qu'une base soit incorrecte



Format SAM

SAM : Sequence Alignment/ Map format

Les formats SAM et BAM sont les formats standards d'alignement



Format SAM

Table 1. Mandatory fields in the SAM format

No.	Name	Description
1	QNAME	Query NAME of the read or the read pair
2	FLAG	Bitwise FLAG (pairing, strand, mate strand, etc.)
3	RNAME	Reference sequence NAME
4	POS	1-Based leftmost POSition of clipped alignment
5	MAPQ	MAPping Quality (Phred-scaled)
6	CIGAR	Extended CIGAR string (operations: MIDNSHP)
7	MRNM	Mate Reference NaMe ('=' if same as RNAME)
8	MPOS	1-Based leftmost Mate POSition
9	ISIZE	Inferred Insert SIZE
10	SEQ	Query SEQuence on the same strand as the reference
11	QUAL	Query QUALity (ASCII-33=Phred base quality)

Format BAM

BAM = SAM compressé – Version binaire

--> version compact et indexée pour représenter une séquence de nucléotides alignés.

Indexed BAM : *.bam.bai

Les outils de post process et les visualisateurs utilisent le format BAM pour éviter d'extraire toutes les informations. Par conséquent, le disply du fichier est beaucoup plus rapide vu que seules certaines parties sont accessible au servuer de visualisation.

Voici les étapes bioinformatiques utiles pour générer un BAM :

1 – La plateforme de séquençage vous fournit les séqeunces sous forme de fichiers FASTQ

2 – Il est possible de vérifier la qualité de vos séqeunces avec l'outil FASTQC report.

3 – N'hésitez pas à «éliminer les séquences de trop mauvaise qualité --> cf sig-learning.

4 – Mapper le FASTQ sur un génome de référence indexé à l'aide de BWA (par exemple).

5 – L'indexation du génome de référence est réalisée au niveau du cluster de calcul pour un partage des références.

6 – Les résultats du mapping sont obtenus sous forme d'un fichier SAM.

7 – La suite d'outils bioionformatiques samtools vous permet ensuite de convertir vos SAM en BAM, et de visualiser le BAM obtenu :

```
samtools view -S -b -o my.bam my.sam
```

8 – Le BAM n'est utilisable que si ce dernier est trié et indexé : samtools sort my.bam my.sorted puis samtools index my.sorted.bam

Les fichiers texte tabulés

Il s'agit de formats de Localisation/Annotation/Visualisation

Les 5 formats sont le plus couramment utilisés sont :

BED

GFF --> GTF (dérivé du GFF)

WIG

BEDGRAPH

Ces fichiers ont 1 ligne par zone.

Format BED

BED pour Browser Extensible Data

3 champs obligatoires ; chr, start, stop.

9 autres champs sont optionnels et peuvent contenir :

- Le brin (forward oureverse)

- Le nom de l'intervalle

- De l'information sur l'intervalle (annotation)

```
chr1  213941196  213942363
chr1  213942363  213943530
chr1  213943530  213944697
chr2  158364697  158365864
chr2  158365864  158367031
chr3  127477031  127478198
chr3  127478198  127479365
chr3  127479365  127480532
chr3  127480532  127481699
```

Les fichiers texte tabulés (suite)

Format GFF

GFF pour General Feature Format

Format utilisé pour localiser et décrire toute zone caractéristique d'un génome (ex : un exon)

Contient 8 champs : Nom, Source, Type, Début d'intervalle, Fin d'intervalle, Score, Brin, Cadre

```
SEQ1   EMBL   atg   103   105   .   +   0
SEQ1   EMBL   exon   103   172   .   +   0
SEQ1   EMBL   splice5   172   173   .   +   .
SEQ1   netgene   splice5   172   173   0.94   +   .
SEQ1   genie   sp5-20   163   182   2.3   +   .
SEQ1   genie   sp5-10   168   177   2.1   +   .
SEQ2   grail   ATG   17   19   2.1   -   0
```

Format GTF

GTF pour Gene Transfert Format, dérivé du GFF

Contient les mêmes champs + 2 pour l'annotation

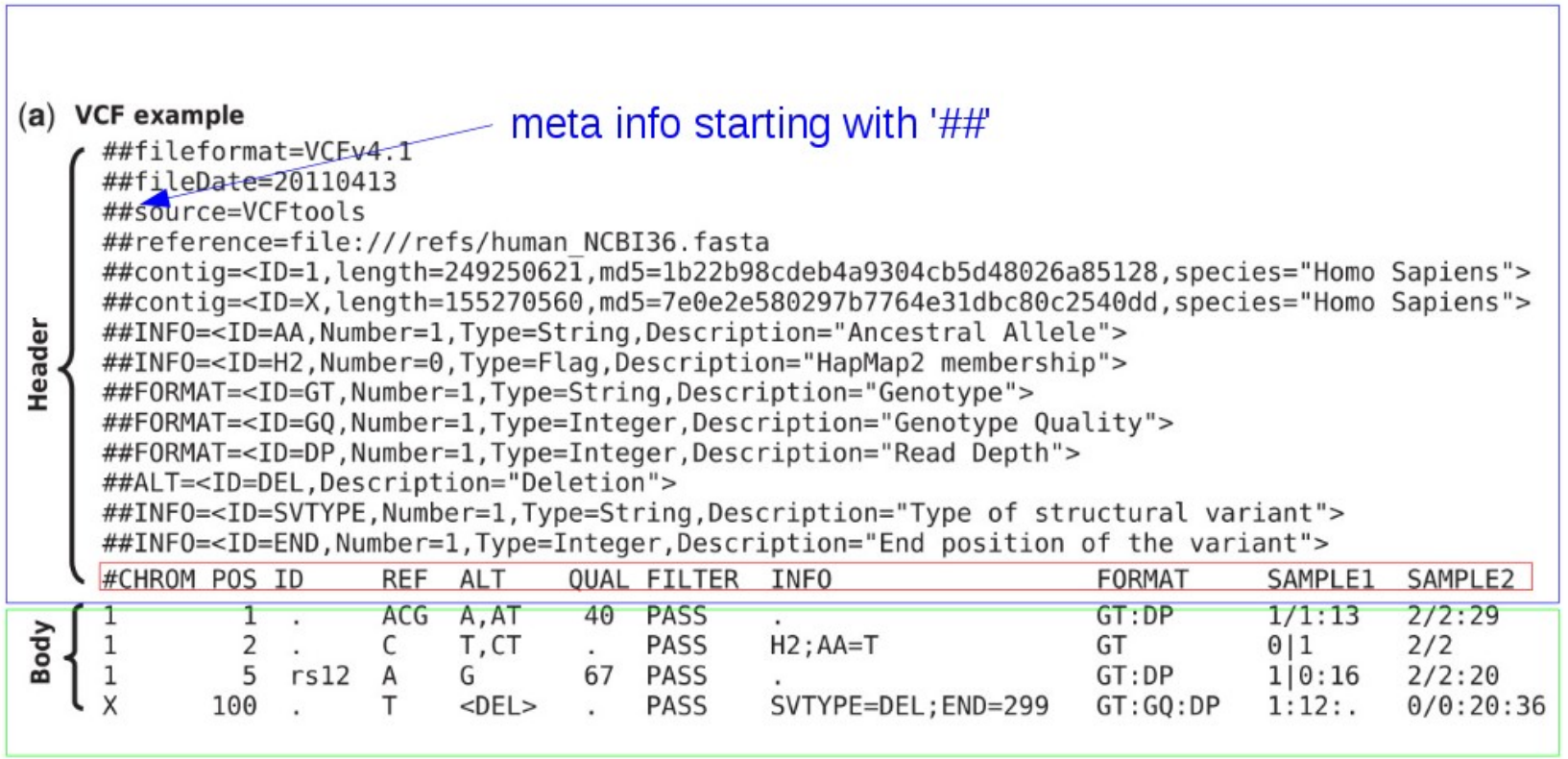
```
381 Twinscan   CDS          380   401   .   +   0   gene_id "001"; transcript_id "001.1";
381 Twinscan   CDS          501   650   .   +   2   gene_id "001"; transcript_id "001.1";
381 Twinscan   CDS          700   707   .   +   2   gene_id "001"; transcript_id "001.1";
381 Twinscan   start_codon  380   382   .   +   0   gene_id "001"; transcript_id "001.1";
381 Twinscan   stop_codon   708   710   .   +   0   gene_id "001"; transcript_id "001.1";
```

Les formats « Variant Calling »

4. Formats « Variant Calling »

2 formats sont couramment utilisés : Format Pileup (format sécifique de l'outil samtools mpileup, moins utilisé maintenant), Format VCF.

Le format VCF est le format par défaut d'un grand nombre de SNP caller dont GATK.



Format VCF

VCF = standard for storing sequence variation

http://samtools.github.io/hts-specs/VCFv4.1.pdf

Reflexions générales

Difficile / impossible de travailler avec les données NGS --> FASTQ dans Word ....

--> Lecture des fichiers impossible dans les logiciels de bureautique couramment utilisés

Difficile sur une station locale (manque de ressources) :

* 1 alignement = 4 processeurs + 15 gb Ram (à multiplier par le nombre d'échantillons)

* Espace de stockage nécessaire important

* Gestion des sauvegardes

--> Serveur d'application connecté sur cluster de calcul et baie de stockage

1 - Solution commerciales (CLC Bio, NextGene, ...etc)

2 - Galaxy ...

Merci pour votre écoute

Sources et références :
http://biow.sb-roscoff.fr/ecole_bioinfo/training_material/data_formats/file_formats_Alban_Lermine_Olivier_Inizan_2013-11.pdf
Joe Fass <jnfass@ucdavis.edu> and his « Next Generation Sequence Alignment » slides
The Sequence Alignment/Map format and SAM tools. Li et al. 2009 Bioinformatics 25 2078-2079
The variant call format and VCFtools. Daneck et al.2011 Bioinformatics 27 2156-2518.