# TRAITEMENT BIOINFORMATIQUE DE DONNÉES RNA-Seq

http://genoweb.toulouse.inra.fr/~formation/9_Galaxy_RNAseq_FP/

# Formateurs

- Cédric Cabau
- Céline Noirot
- Matthias Zytnicki

# Plan

- Introduction au RNAseq
- Vérification de la qualité
- Algorithmes d'alignement
- Visualisation

- Reconstruction de transcrits
- Quantification de gènes
- Quelques statistiques

# _01 Rappels biologiques

# Un peu de vocabulaire

- **Transcriptome** : Ensemble des transcrits d'un organisme
- **RNAseq de novo** : Etude du transcriptome sans génome de référence.
- **Read** : Lecture
- **Fragment** : Paire de lecture

# Rappels biologiques

## Qu’est-ce qu’un gène ?

# Rappels biologiques

## Qu'est-ce qu'un gène ?

- **Gène :** unité fonctionnelle de l'ADN qui contient les instructions nécessaires à la création d'un produit fonctionnel


- **Promoteur :** zone de fixation des ribosomes
- **TSS :** site de départ de transcription
- **Exon :** région codante de l'ARNm inclus dans le transcrit
- **Intron :** région non codante

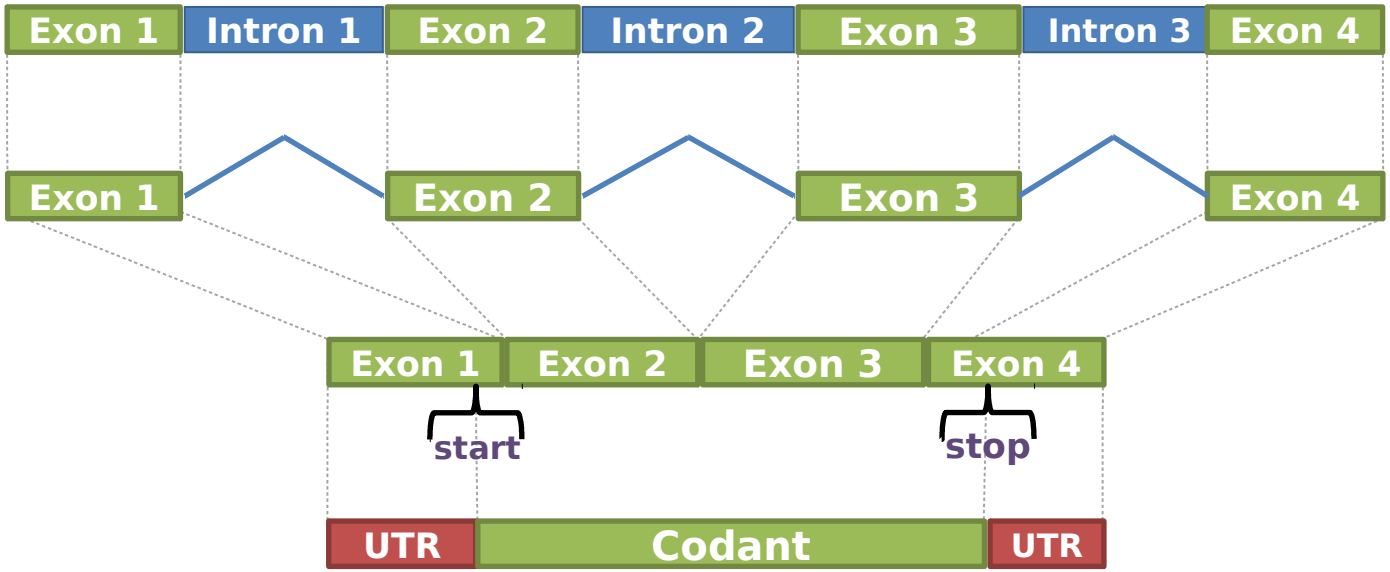
# Rappels biologiques

## Qu’est-ce qu’un transcrit?

# Rappels biologiques

## Qu'est-ce qu'un transcrit ?

o **Epissage :** Excision des introns avant traduction



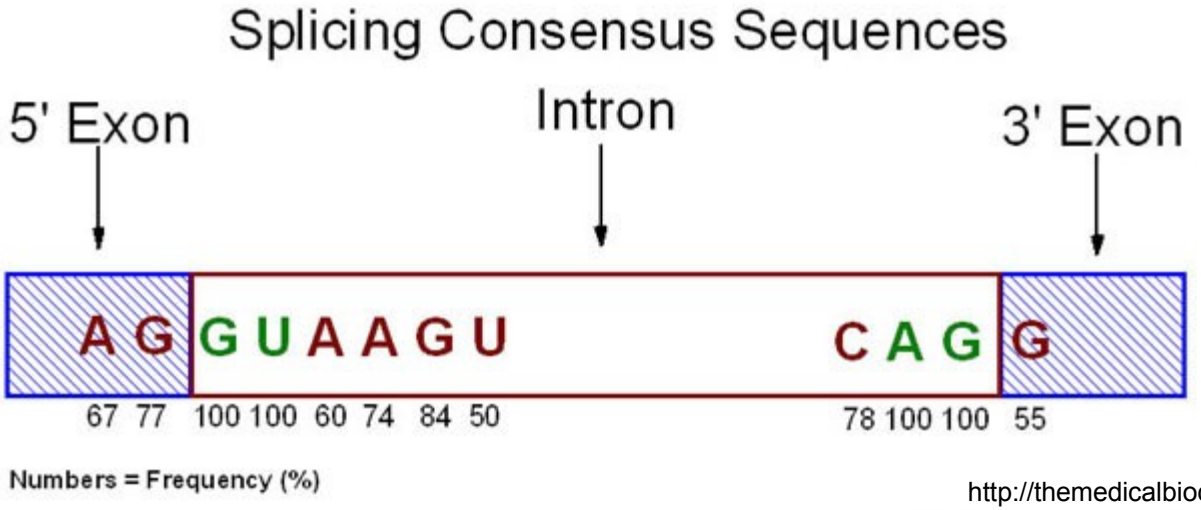

o **Transcrit :** portion d'ADN transcrite en molécule d'ARN
o **UTR :** région transcrite mais pas traduite

# Rappels biologiques

## Qu'est-ce qu'un site d'épissage?

- **Site** d'**épissage canonique :**

  - plus de **99%** de **GT** et **AG** comme sites **donneurs** et **accepteurs**




http://themedicalbiochemistrypage.org/rna.php

# Rappels biologiques

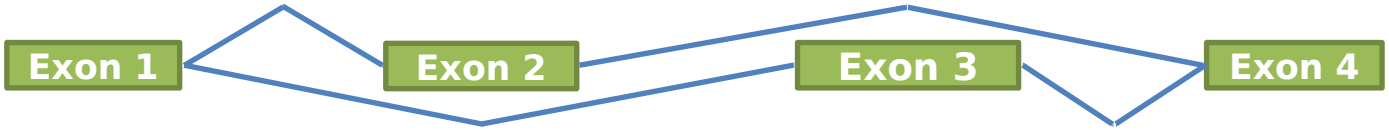
## Epissage alternatif et isoformes

- Excision d'exon


- Rétention d'intron


- TSS alternatif

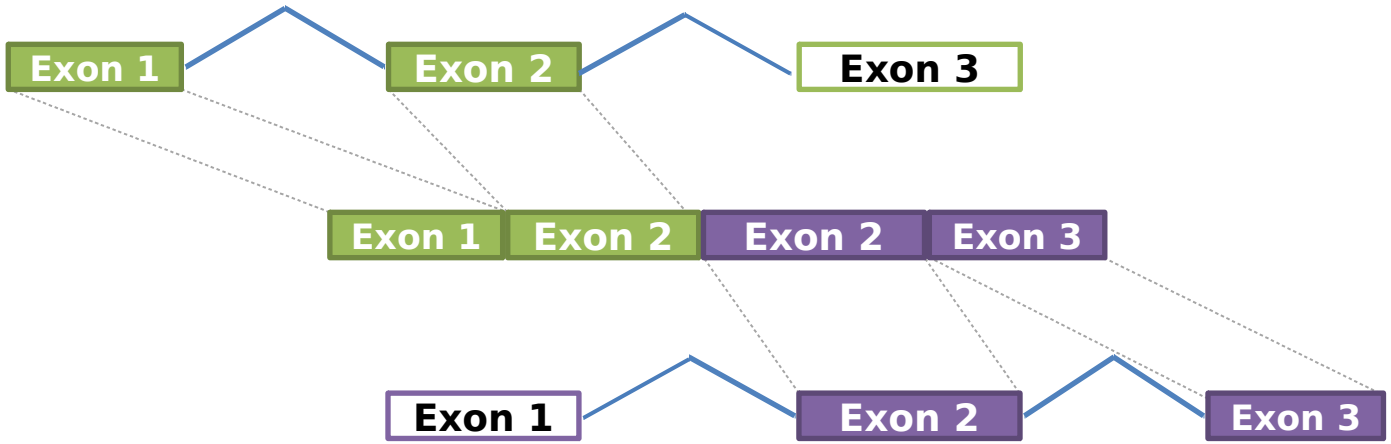

- Exons exclusifs



# Rappels biologiques

## Et plus encore ?

- **Fusion** de **gènes** ou **Trans-épissage**

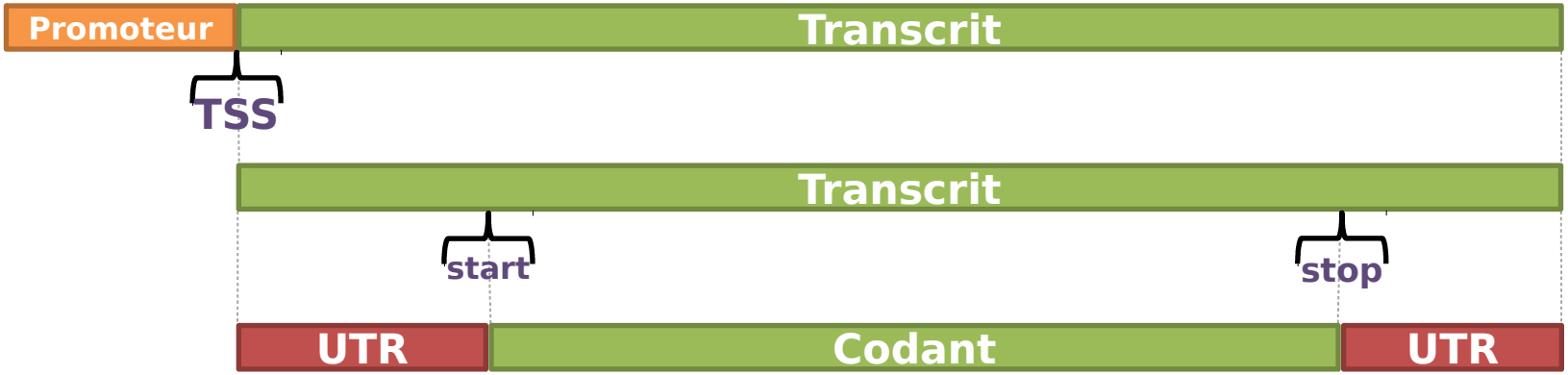



- **Chimère biologique**

# Rappels biologiques

## Gène procaryote / gène eucaryote

- Pas d'intron chez les procaryotes



# Le RNA-Seq

# Modes d'étude du transcriptome

- EST
- rt-PCRq
- puce d'expression
- tiling array

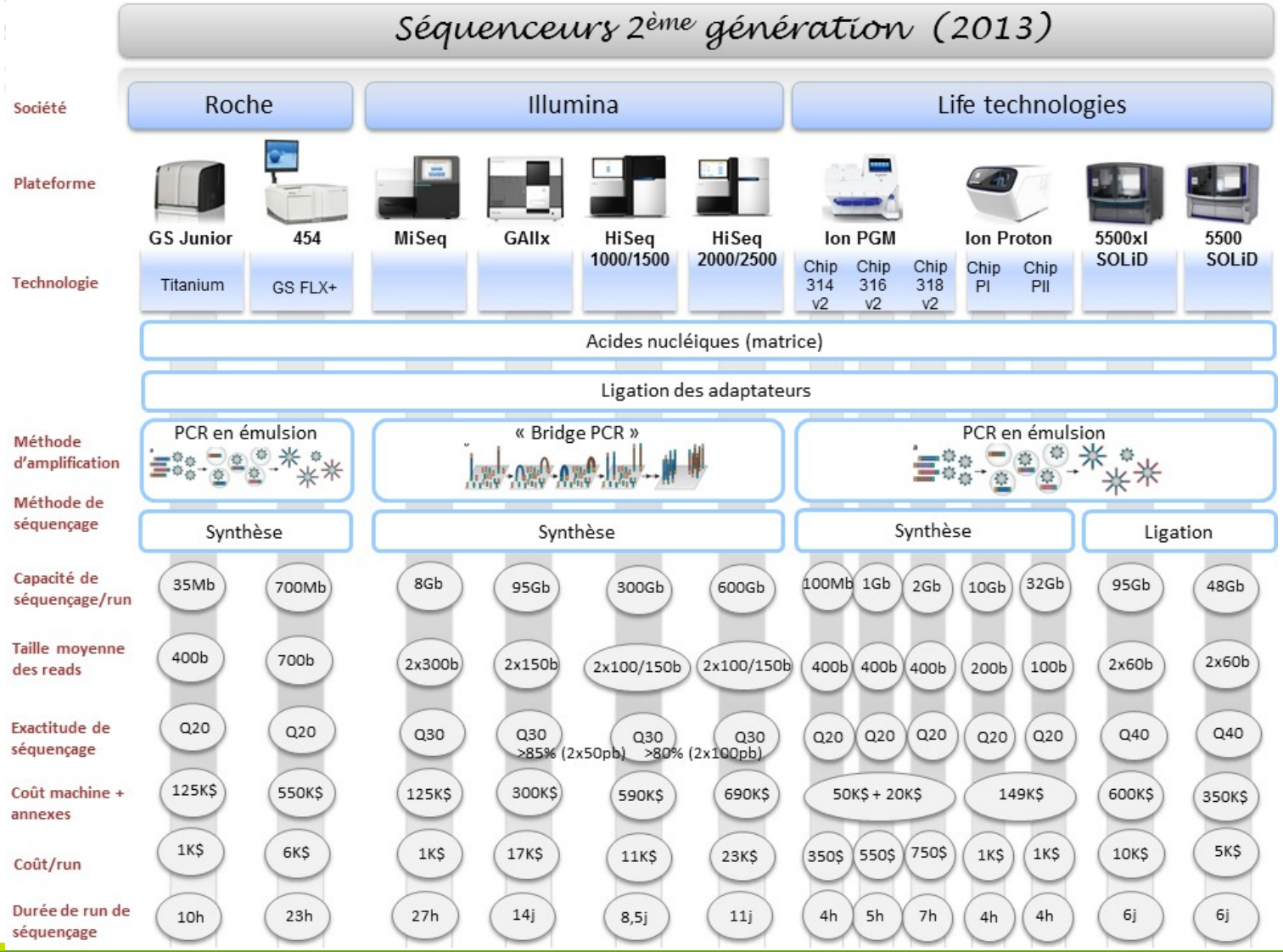
- RNA-Seq

**Quelles sont les principales différences ?**

# Modes d'étude du transcriptome

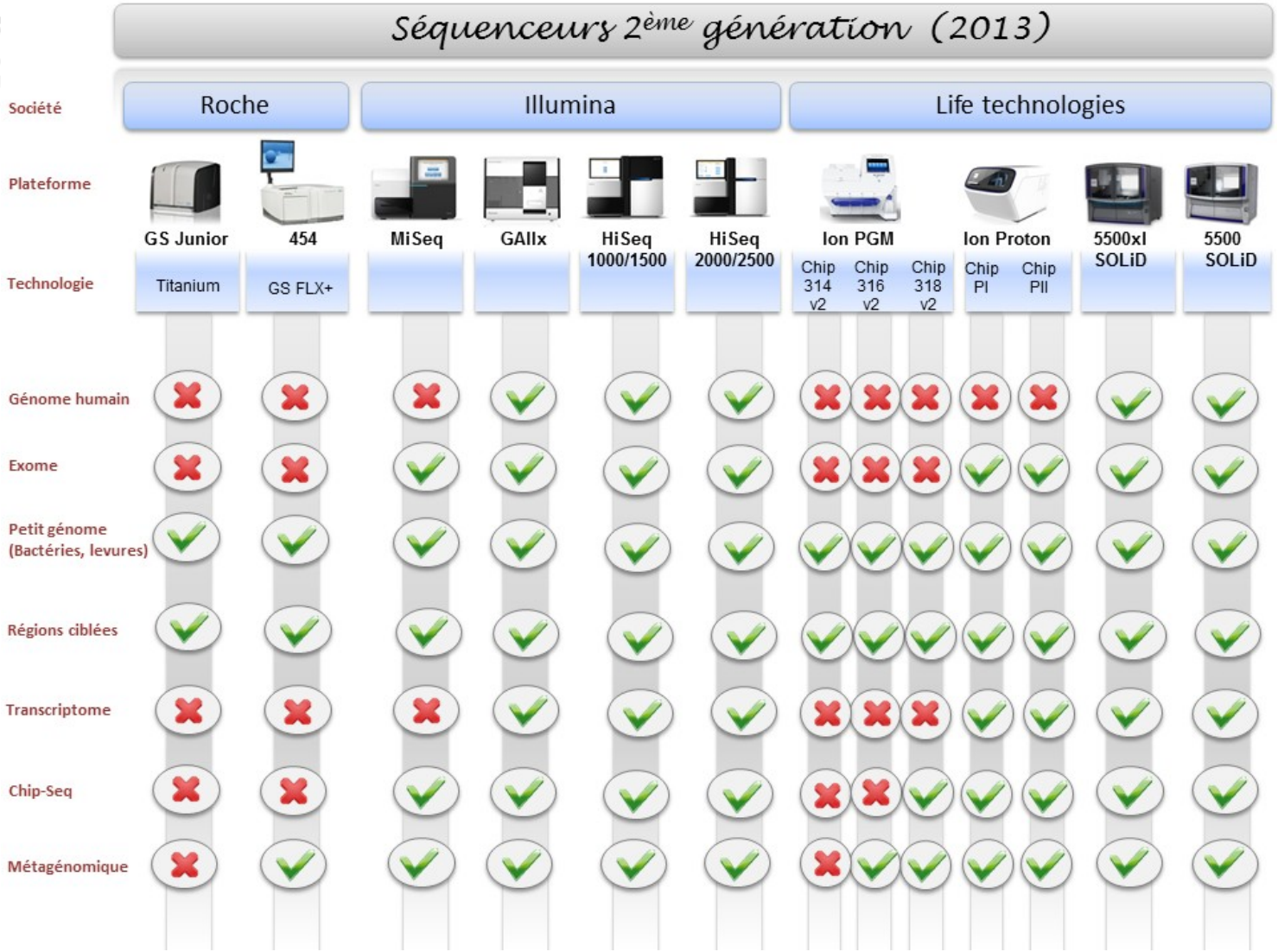
- Pas besoin d'avoir de connaissance sur la séquence
- Spécificité de ce que l'on mesure
- Augmente l'échelle de mesure
- Quantification directe
- Très bonne reproductibilité
- Différents niveau d'étude : gènes, transcrits, spécificité allèlique, variant de structure
- Découverte de nouveaux : transcrits, isoformes, (ncRNA), structures (fusion...)
- Détection possible of SNPs, ...

# Les séquenceurs




http://www.biorigami.com/?p=5492

# Les séquenceurs




http://www.biorigami.com/?p=5492

# Illumina sequencing vocabulary

**Flowcell : 1 plaque**
**( en général 1 run )**

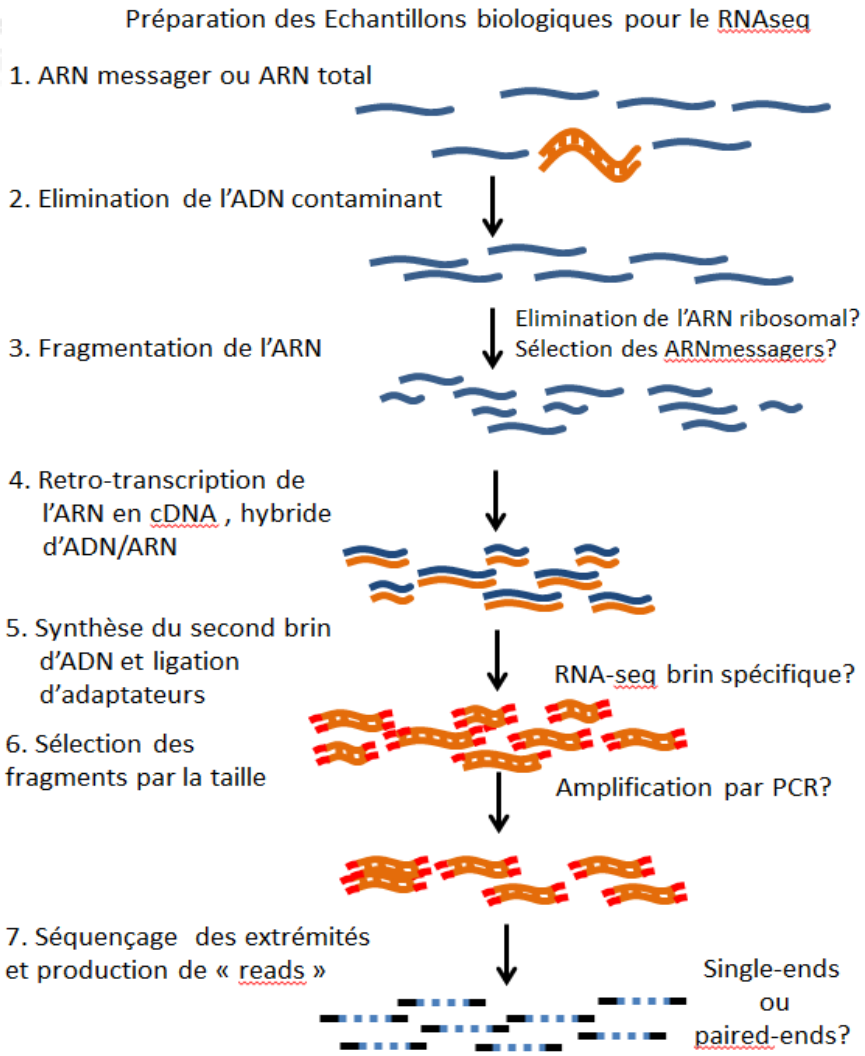
Lane : ligne de séquençage

- 1 Flowcell : 8 Lane

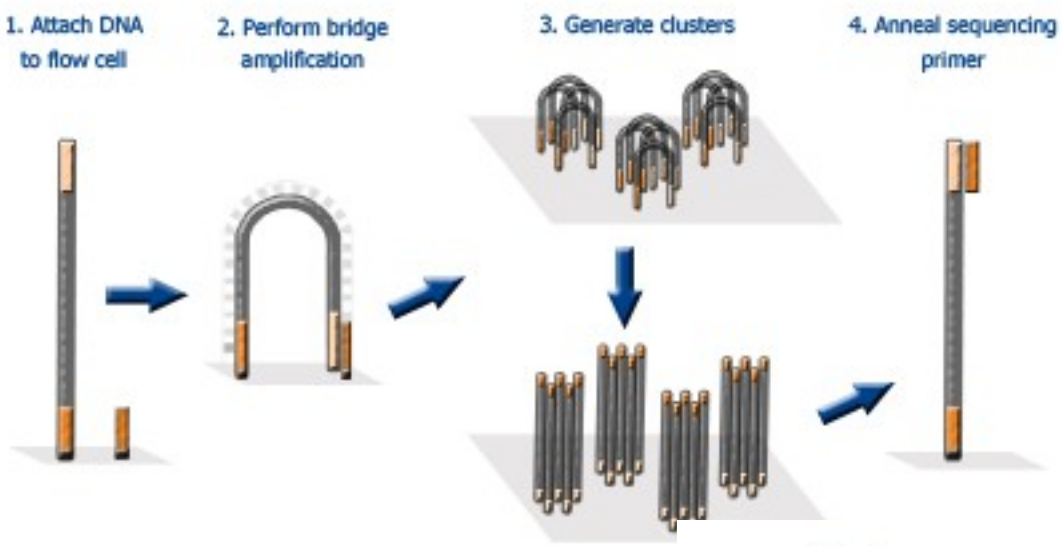
- 1 flowcell Hiseq 2500 : 2 Milliard de reads single ou 4 Milliard de reads paired.

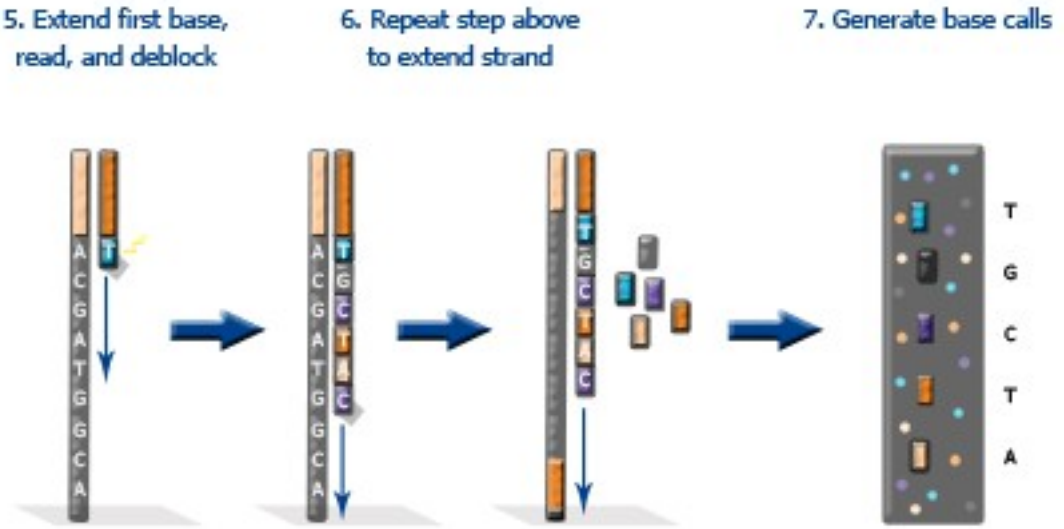
- Hiseq 2000 / Hiseq 2500 : séquençage possible de 2 flowcells en parallèle.

# Le protocole RNAseq



# Séquençage illumina



# Quels choix quand on fait du RNA-Seq ?

- **Déplétion / enrichissement**
- **Paired-end / single-end**
- Séquençage en tenant compte du **sens du brin**
- **Nombre de séquence / de réplicats**
- **Multiplexage**

# Déplétion / Enrichissement

- Déplétion :
  - Suppression des rRNA
- Enrichissement polyA :
  - Pas de transcrits sans queue PolyA ou partiellement dégradés

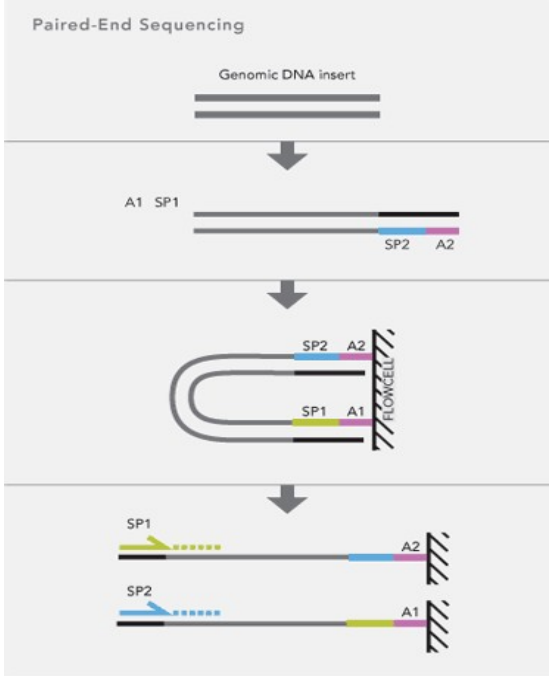
- Résultats semblables d'après :

*Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling, BMC Genomics , 2014*

# Paired-end

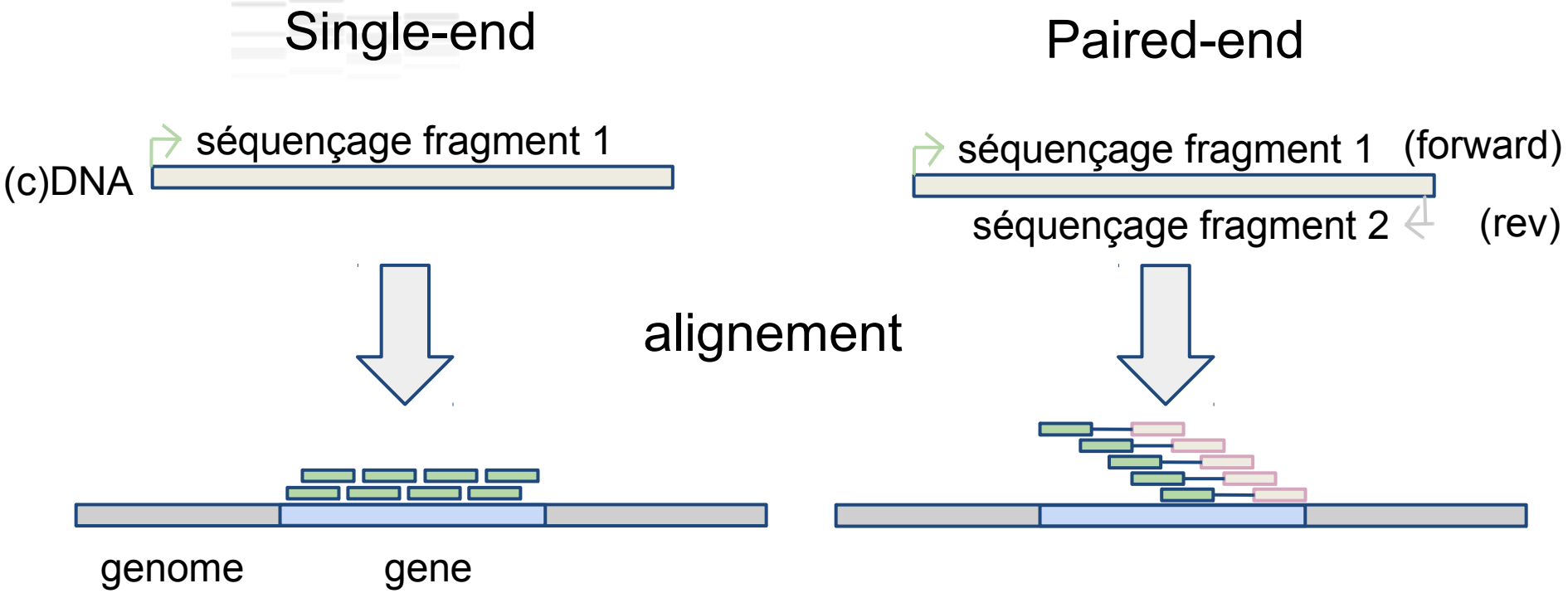
Protocole différent (Adaptateurs spécifiques)

- Améliore le mapping
- Aide a la détection de variant alternatif
- Plus généralement aide à la détection de : variation structurale de génome (insertion/délétion), CNV, réarrangement génomique



Adapter (A1 and A2) with sequencing primer sites (SP1 and SP2) are ligated onto DNA fragments. Template clusters are formed on the flow cell by bridge amplification and then sequenced by synthesis from the paired primers sequentially.

# Single-end *vs* Paired-end




- La taille des cDNA détermine la taille d'insert (p. ex. 200-500 pb).
- Les fragments sont habituellement en Forward-Reverse.

# L'intérêt des librairies brin spécifique

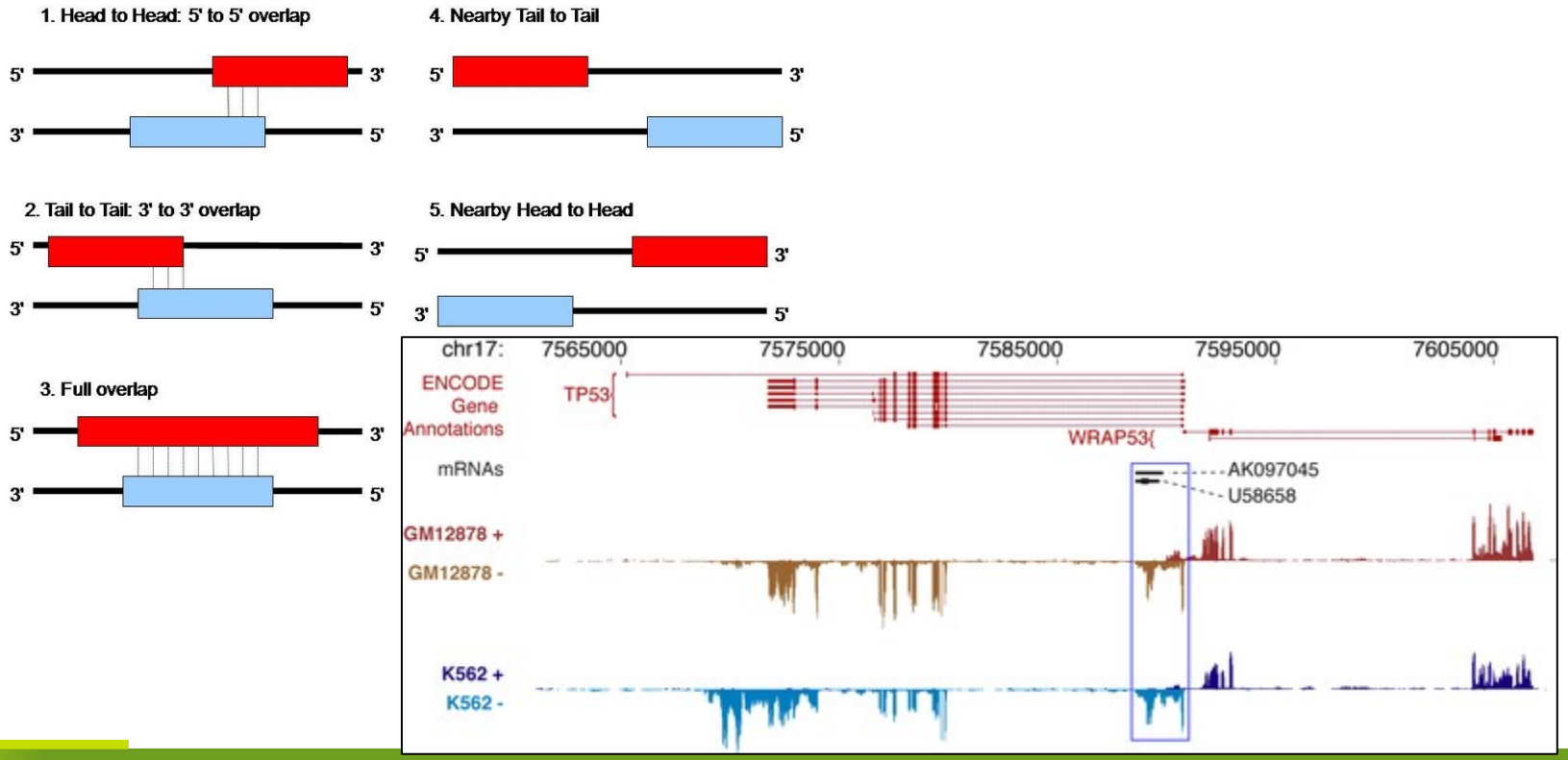
Nat Methods. 2010 Sep;7(9):709-15. Epub 2010 Aug 15.

**Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods.**

Levin JZ, Yassour M, Adiconis X, Nusbaum C, Thompson DA, Friedman N, Gnirke A, Regev A.

Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA.
jlevin@broadinstitute.org

Abstract



# Profondeur / Répétitions ?

- Equilibre **profondeur /** nombre de **répétitions** :
  - directives du consortium ENCODE en 2011
  - **plus de deux répétitions biologique**

*Chez l'**humain 100M de lectures** sont suffisantes pour détecter **90 % des transcrits** de **81 % des gènes** du **transcriptome humain**.*

- **20M de lectures** (75bp) permettent de détecter des **transcrits exprimés à un niveau moyen ou faible** chez le **poulet**.

- **10 M de lectures** permettent que **90% des transcrits** (**zebrafish**) soient **couverts par 10 lectures en moyenne**.

*(Plus d'informations : Toung et al. 2011 ; Wang et al. 2011 ; Hart et al. 2013)*

# Profondeur / Répétitions ?

❖**Pourquoi augmenter le nombre de répétitions biologiques ?**

Généraliser les résultats à la population

- Estimer avec plus de précision la variation de chaque transcrit individuellement *(Hart et al. 2013)*

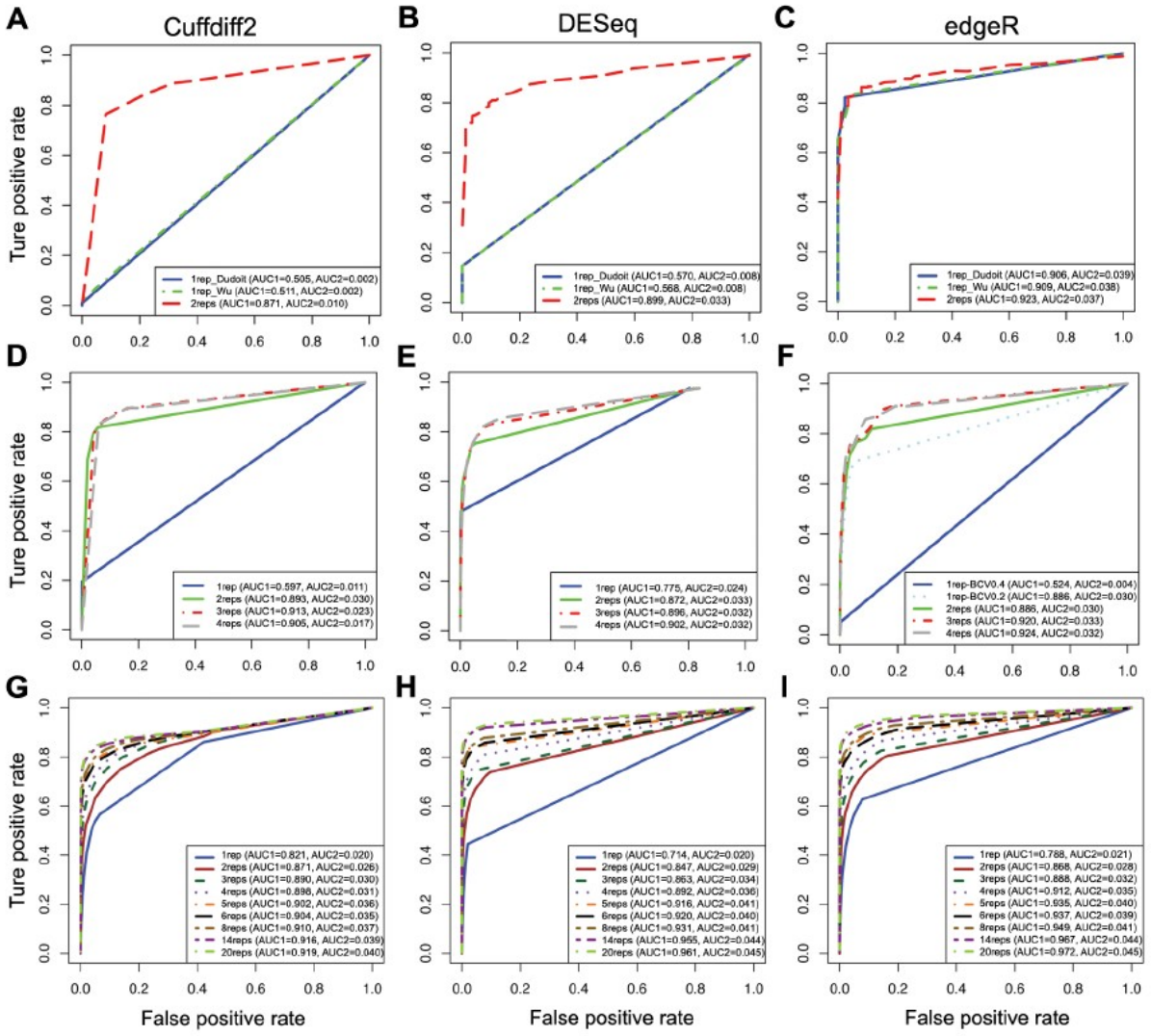
- Améliorer la détection des transcrits différentiels et le contrôle du taux de faux positifs : **VRAI à partir 3** *(Zhang et al. 2014, Sonenson et al. 2013, Robles et al 2012)*

# Profondeur / Répétitions ?

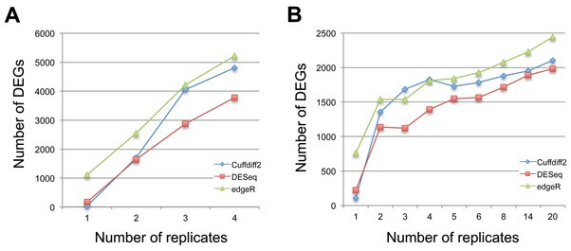
MAQC

L'effet du nombre de réplicats sur le taux de vrai positifs et de faux positifs

K_N



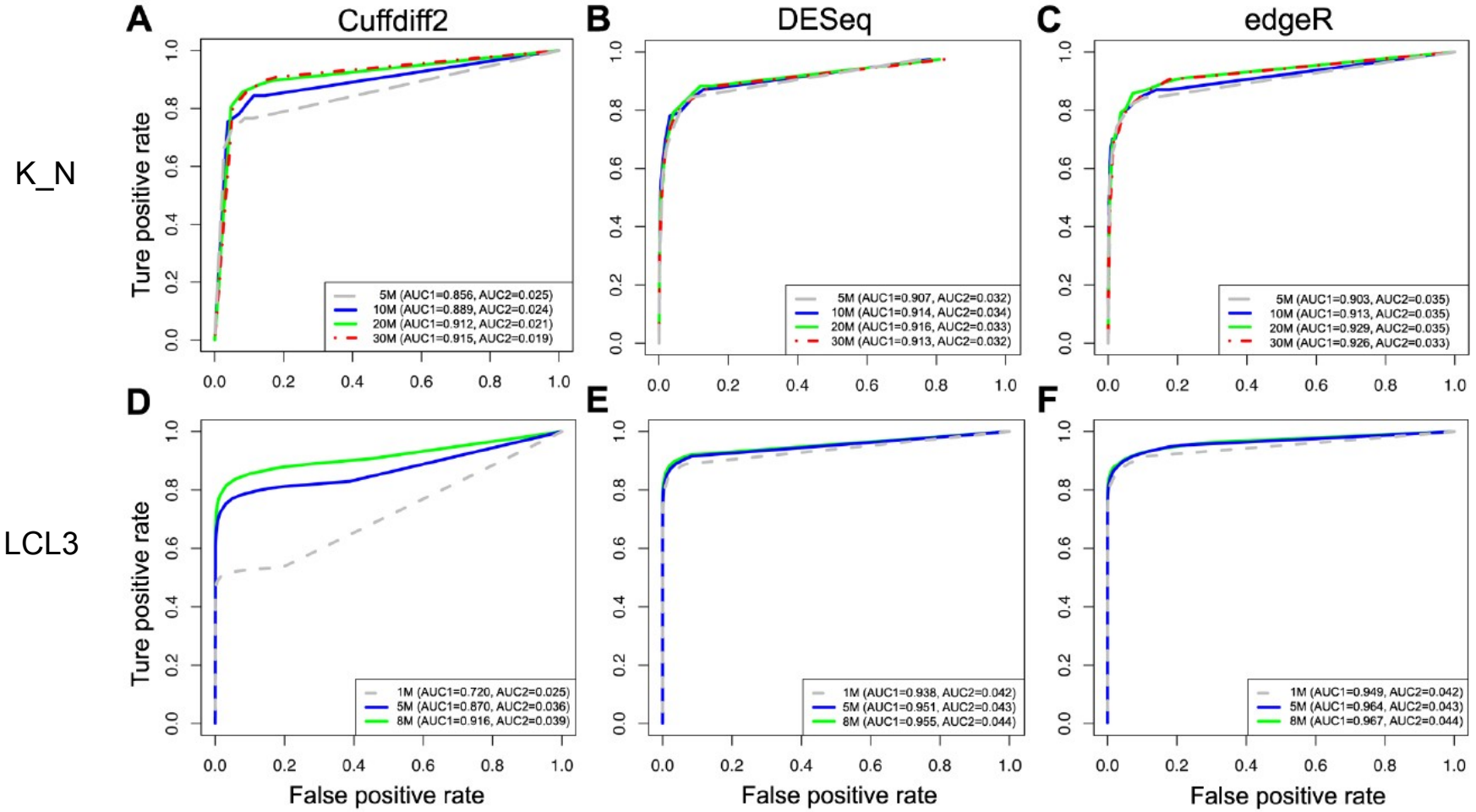

K_N




LCL2

# Profondeur / Répétitions ?

L'effet de la profondeur.



# Profondeur / Répétitions ?

**Quel choix ? Plus de profondeur *ou plus de* répétition ?**

- **Ça dépend !** (Haas et al. 2012, Liu Y. et al 2013)

- Détection de transcrits différentiels :
  - (+) répétitions biologiques
- Construction/annotation transcriptome :
  - (+) profondeur & (+) conditions
- Recherche de variants :
  - (+) répétitions biologiques & (+) profondeur

# A quelles questions biologiques PEUT répondre le RNA-seq ?

- L'**analyse d'expression différentielle** (différence d'expression) au niveau du transcriptome
- L'étude de l'**épissage alternatif** (isoformes) et recherche de **nouveaux transcrits**
  - amélioration des annotations structurales existantes
- La recherche d'**allèles spécifiques** et la **quantification** de leur **expression**
- La construction d'un **transcriptome *de novo*** (organismes non modèles)

# Stratégie d'analyse en fonction des données disponibles

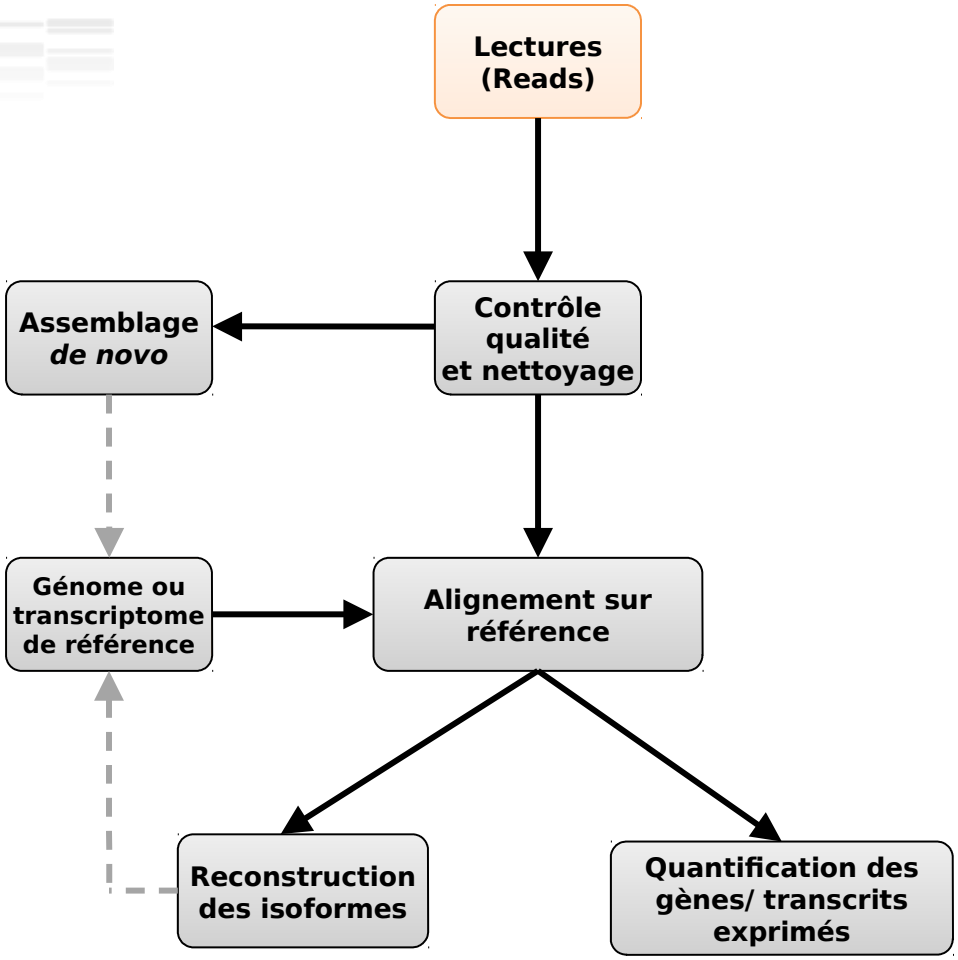
- **De novo :**
  - Pas de génome/transcriptome de référence
  - Outils en évolution permanente
  - Ressources (cpu/disque) +++
- **Transcriptome de reference**
  - Dépendant de la qualité de l'annotation structurale
  - Peu couteux
- **Génome de référence**
  - Permet une approche combinée :
    - sur **transcriptome**
    - recherche de **nouveaux transcrits**
  - Ressources ++
  - Alignement épissé

# Pipeline d'analyse RNA-Seq : avec référence

- **Contrôle qualité**
- **Pre-nettoyage** des lectures
  - **suppression** des **adaptateurs** de **séquençage**
  - (**suppression** des **adaptateurs** de **multiplexage**)
- **Nettoyage** des lectures
  - **tronquer** les **extrémités** de **mauvaise qualité** des lectures
- **Alignement** des **lectures sur** la **référence**
  - gènes ou génome complet
- **Reconstruction de nouveaux isoformes**
- **Comptage** des gènes / transcrits

# _02 Obtenir des séquences de qualité

# Workflow d'analyse RNA-Seq



# Plan : Données brutes et qualité

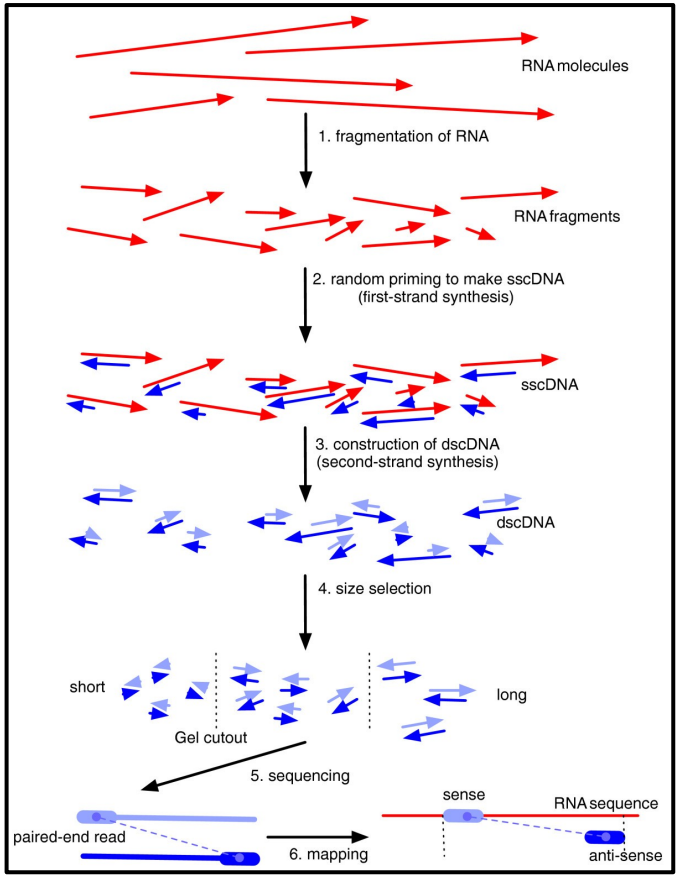
- Les biais connus
- Vérification de la qualité avec FastQC
- Nettoyage des lectures avec Sickle

# Biais spécifiques au RNA-Seq

- Influence du mode de préparation de la banque
  - amplification hexamèrique aléatoire (**Random hexamer priming**)
- Influence du séquençage
  - biais de position, de composition en séquence (contenu en GC)
  - influence de la longueur des transcrits
- « Mapabilité » du génome/transcriptome

# Préparation de la banque

- **Extraction ARN total**
- **Déplétion** (queue polyA)
- **Fragmentation**, **reverse transcription** avec des **hexamères aléatoires** -> **dscDNA**
- **Séquençage**




*Roberts et al. Genome Biology 2011, 12:R22*

# Biais : *random hexamer priming*

- Fort biais de composition des 13 premières nucléotides en 5’
  - spécificité de séquence de la polymérase

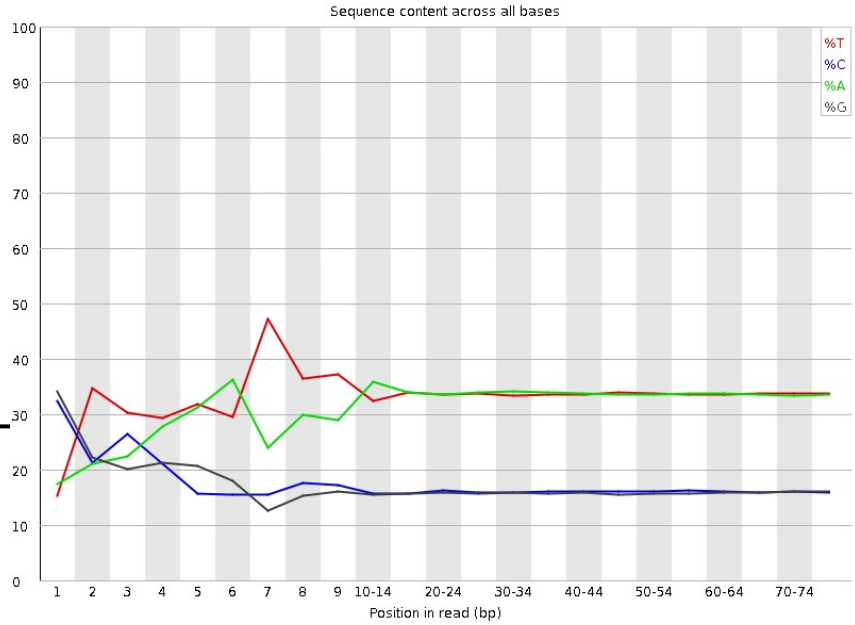
*Published online 14 April 2010* *Nucleic Acids Research, 2010, Vol. 38, No. 12 e131*
*doi:10.1093/nar/gkq224*

## Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming

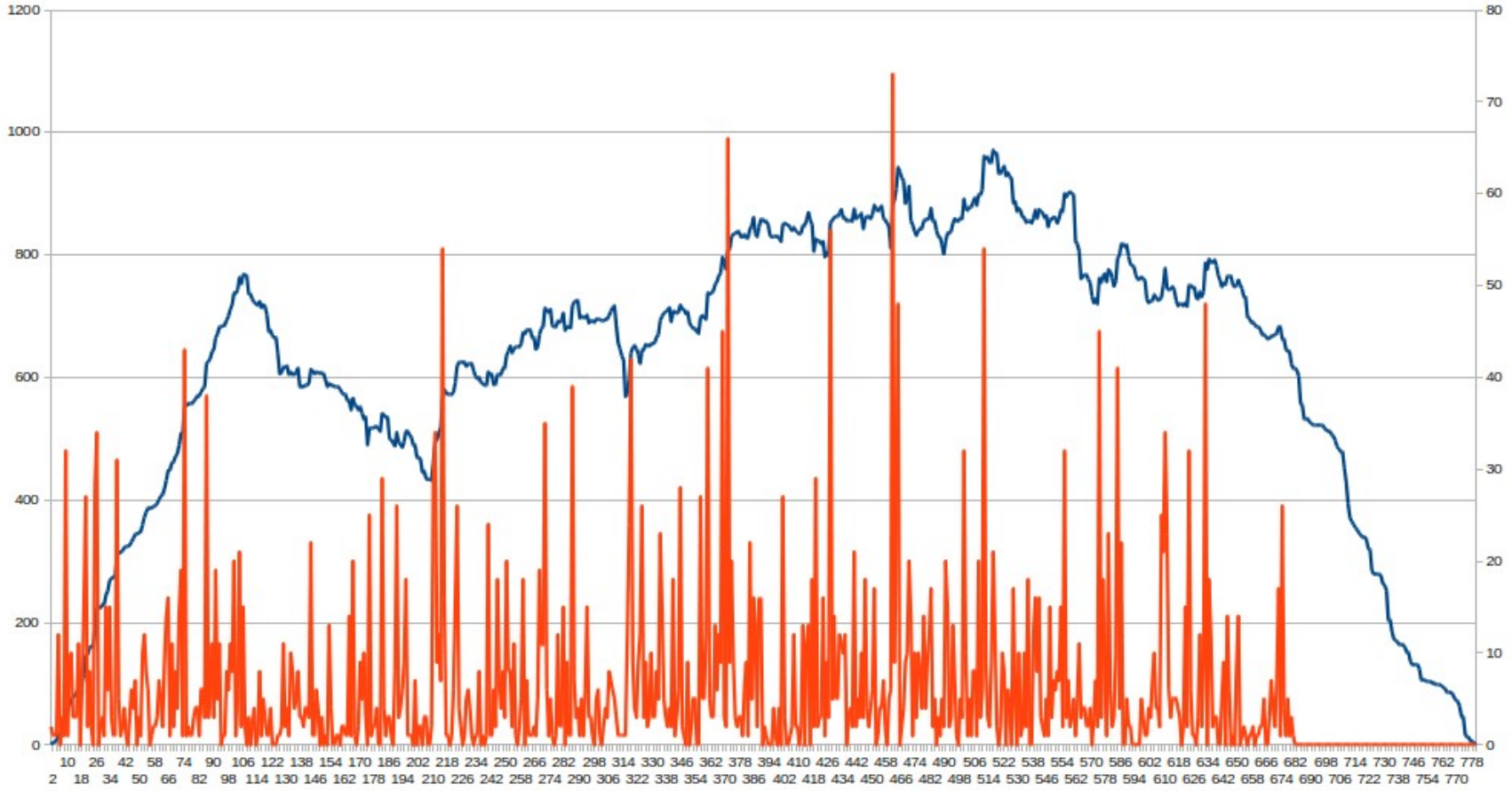
Kasper D. Hansen[1,*], Steven E. Brenner[2] and Sandrine Dudoit[1,3]

**ABSTRACT**

Generation of cDNA using random hexamer priming induces biases in the nucleotide composition at the beginning of transcriptome sequencing reads from the Illumina Genome Analyzer. The bias is independent of organism and laboratory and impacts the uniformity of the reads along the transcriptome. We provide a read count reweighting scheme, based on the nucleotide frequencies of the reads, that mitigates the impact of the bias.



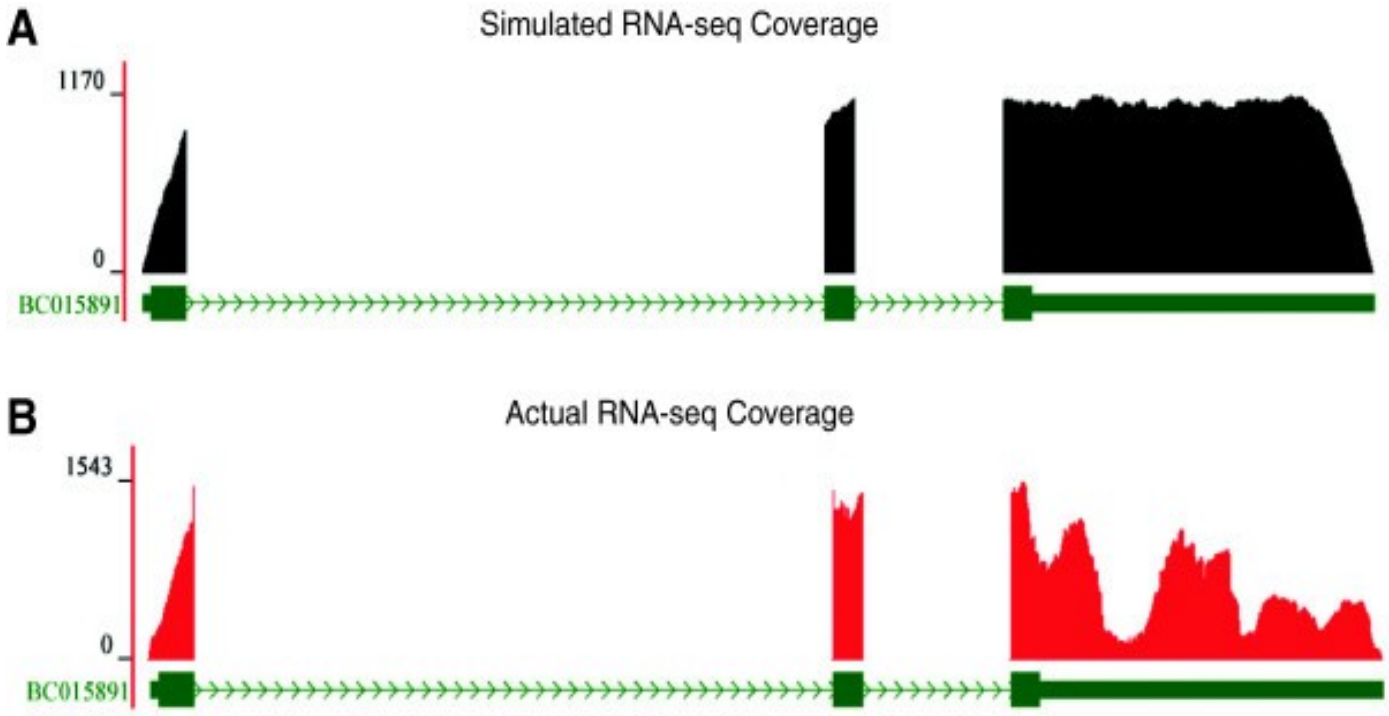
# Biais : *random hexamer priming*




Orange = reads start sites

Blue = coverage

# Biais : *Préparation de la librairie*



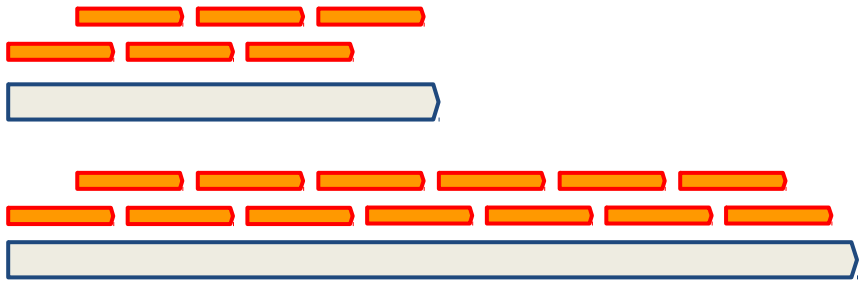

IVT-seq reveals extreme bias in RNA sequencing, Lahens et al 2014

http://genomebiology.com/2014/15/6/R86

# Biais : longueur des transcrits

- La capacité, en utilisant des **comptages** obtenus par **RNA-Seq**, a observer un transcrit comme étant **différentiellement exprimé** est **directement reliée** à sa **longueur**.

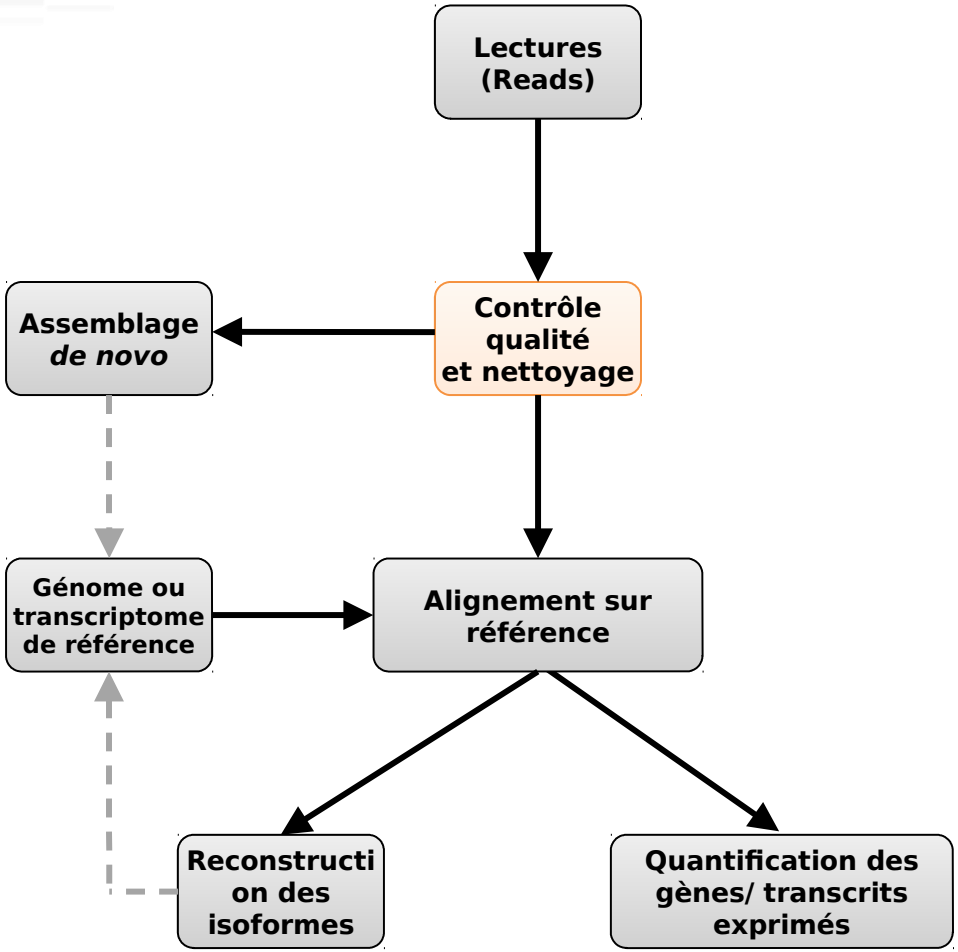
- Pour un **même gène** ayant **deux isoformes**, l'une faisant la moitié de l'autre, exprimé en **même abondance dans deux conditions différentes** :
  - L'isoforme la plus courte sera deux fois moins « comptée » que la plus longue



# Biais : « mappabilité »

- Les étapes bioinformatiques peuvent être **influencées** par :
  - La **qualité** de la **référence**
    - ✓**assemblage**
    - ✓**finition**
  - La **composition** de la **séquence**
  - **zones répétées**
  - La **qualité** de l'**annotation**

# Workflow d'analyse RNA-Seq



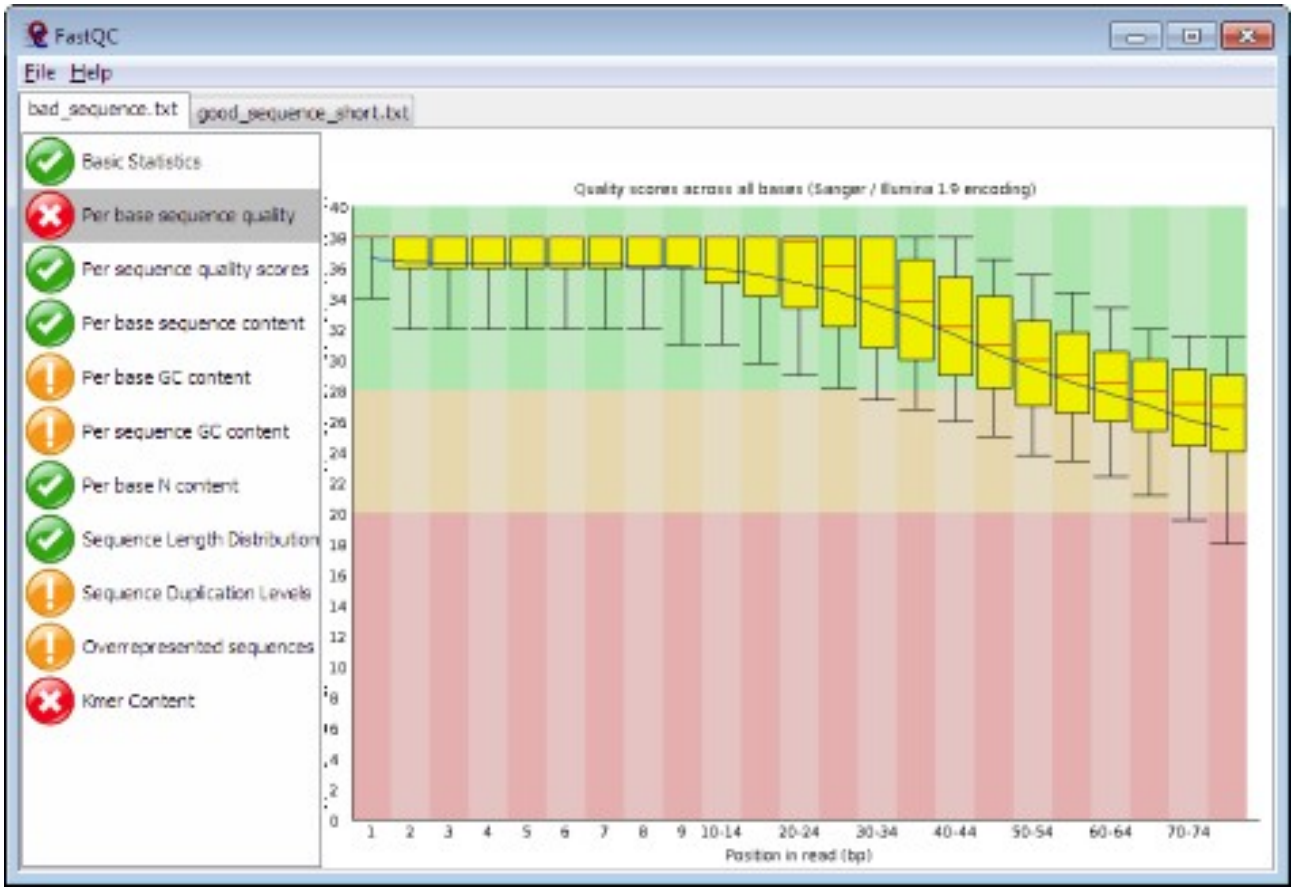
# Contrôle qualité

## Objectifs :

- Vérifier que les séquences sont **conformes au niveau de prestation attendu (taille, nombre, qualité,…)**
- Vérifier que les séquences peuvent **répondre au questions biologiques** posées :
  - **Biais techniques**
  - **Biais biologiques**
- Aider au paramètres pour le nettoyage des données

# Contrôle qualité avec FastQC

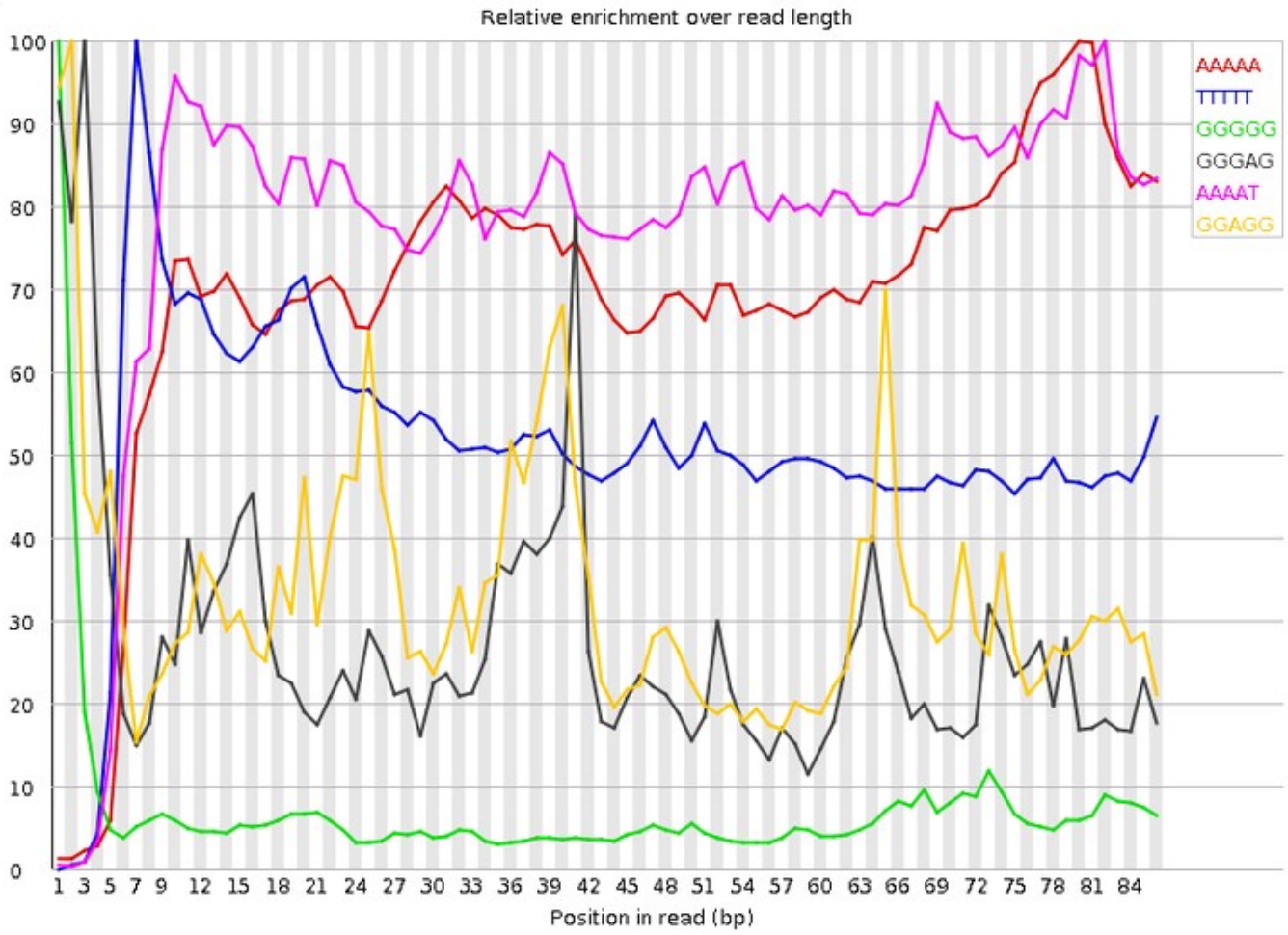
- orienté DNA-Seq




*http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc*

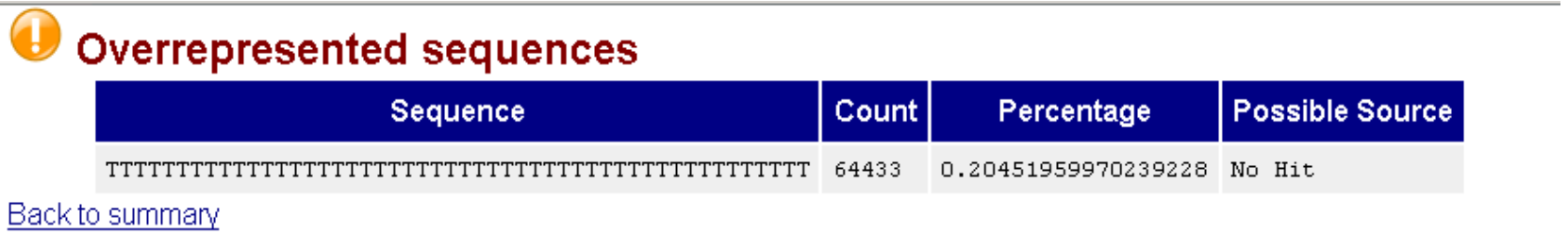
# Contrôle qualité

Kmer content



# Contrôle qualité

Over-expressed sequences



Overrepresented sequences

| Sequence | Count | Percentage | Possible Source |
|---|---|---|---|
| TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT | 64433 | 0.20451959970239228 | No Hit |

Back to summary

→ Détecter les adaptateurs

# Nettoyage des données

## Nettoyage « optionnel »

- **L'alignement permettra de supprimer les lectures**
  - De mauvaise qualité
  - D'adaptateurs
  - Contaminantes

- **Les outils :**
  - Cutadapt : Nettoyage des adaptateurs & Tags
  - Prinseq : Nettoyage des lectures de mauvaise qualité
  - Sickle : Nettoyage des lectures de mauvaise qualité

# Nettoyage des données

**Principe de Sickle :**

- Traite les paires ensemble
  - Fenêtre glissante : 10% de la taille des reads
  - Calcul de la qualité moyenne des lectures

exemple : Longueur = 23

| A | C | T | T | G | A | T | C | A | T | G | C | A | T | C | G | A | T | C | G | T | A | G |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 25 | 20 | 18 | 18 | 10 |

# Travaux pratiques

Présentation des objectifs

- **Aborder** les **différentes étapes** indispensables au **traitement bioinformatique** de **données RNA-Seq** à travers un **exemple** issu de **données réelles**

- Séquençage de la tomate :

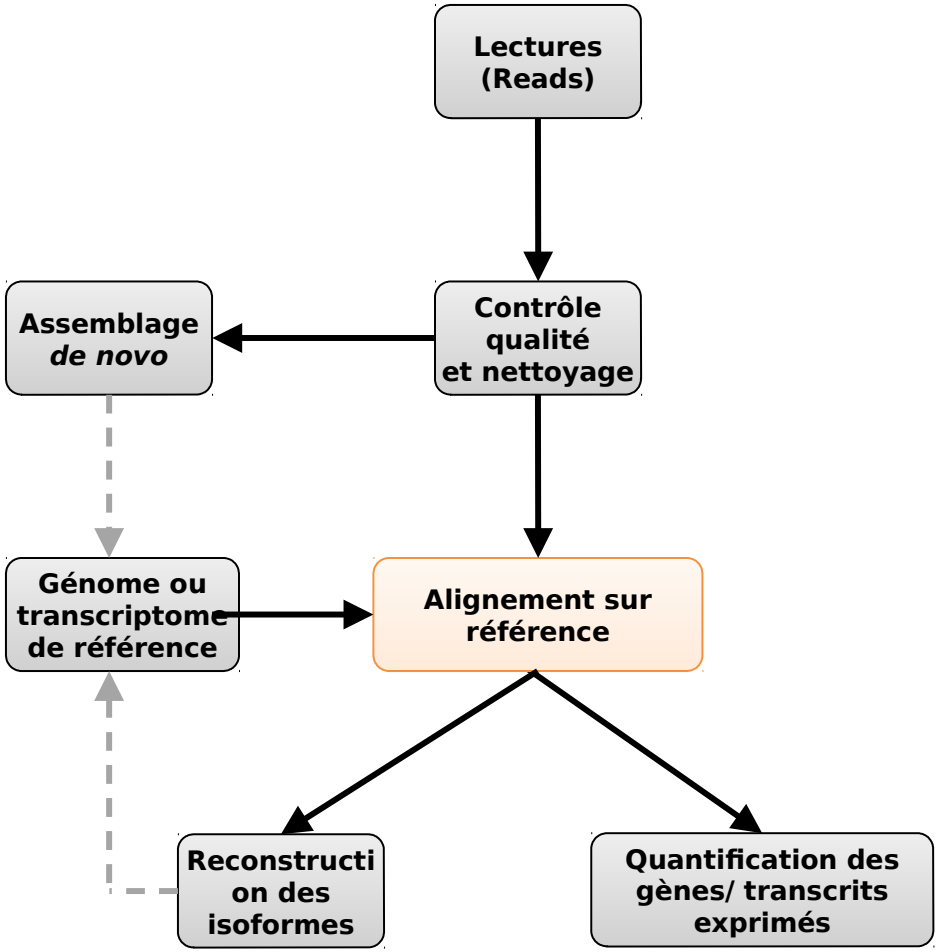
  - Wt : wild type, PAIRED

  - Mt : mutant  type , PAIRED

# _03

# MAPPING

## et Visualisation



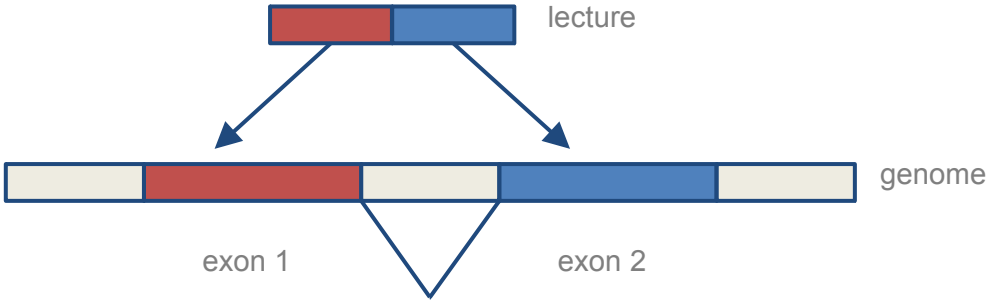
# Alignement épissé

## Objectifs :

- **Aligner** les **lectures** issues du séquençage de **dscDNA** (transcrits) sur le **génome**, en tenant compte de l'**épissage alternatif**
- Être capable d'**exploiter** les listes des **jonctions exons-exons connues**, mais également d'en **détecter** de **nouvelles**
- Tout cela dans un **temps raisonnable**…

# Introduction

## Définition




**Le *mapping* est la *prédiction* du *locus* dont est originaire la lecture.**

- **Prédiction :** chaque outil propose un/plusieurs locus.
- **Locus :** le résultat est un ensemble de positions génomiques (ex.: chr1:100..150)

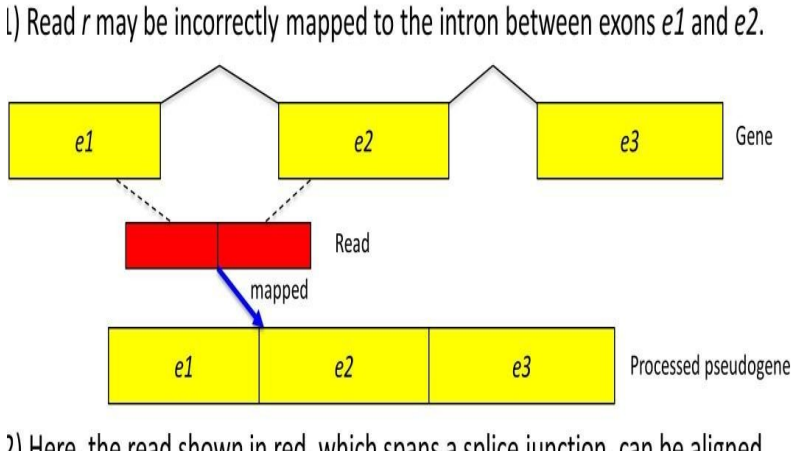
- Mapping ARN ≠ Mapping ADN

- Mapping ≠ Alignement

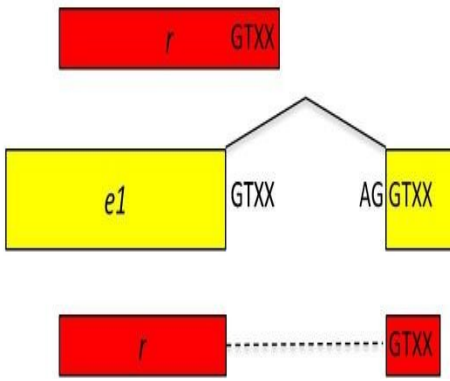
Les outils de mapping font de mauvais alignements (sauf aux jonctions).

# Cas difficiles

- Beaucoup de différences (erreurs séquençage, locus muté)
- Séquence répétée
- Lecture sur 3+ exons
- Gène ou pseudo-gène ?



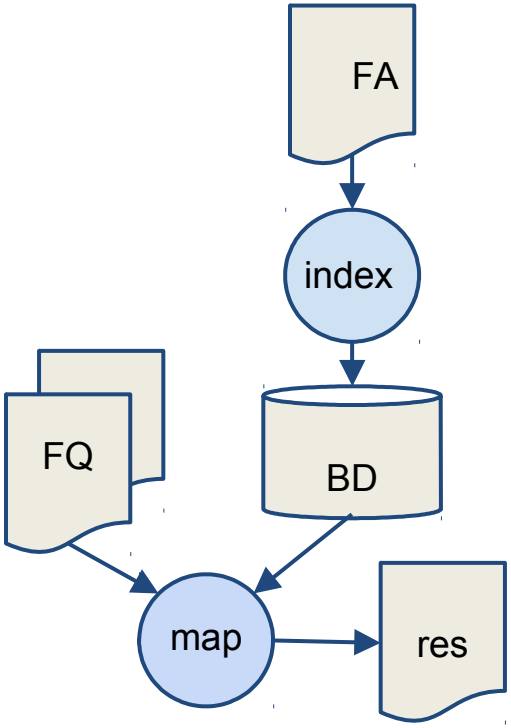

- Fin de la lecture sur un exon propre
- Lecture sur une jonction non-connue d'un gène peu exprimé



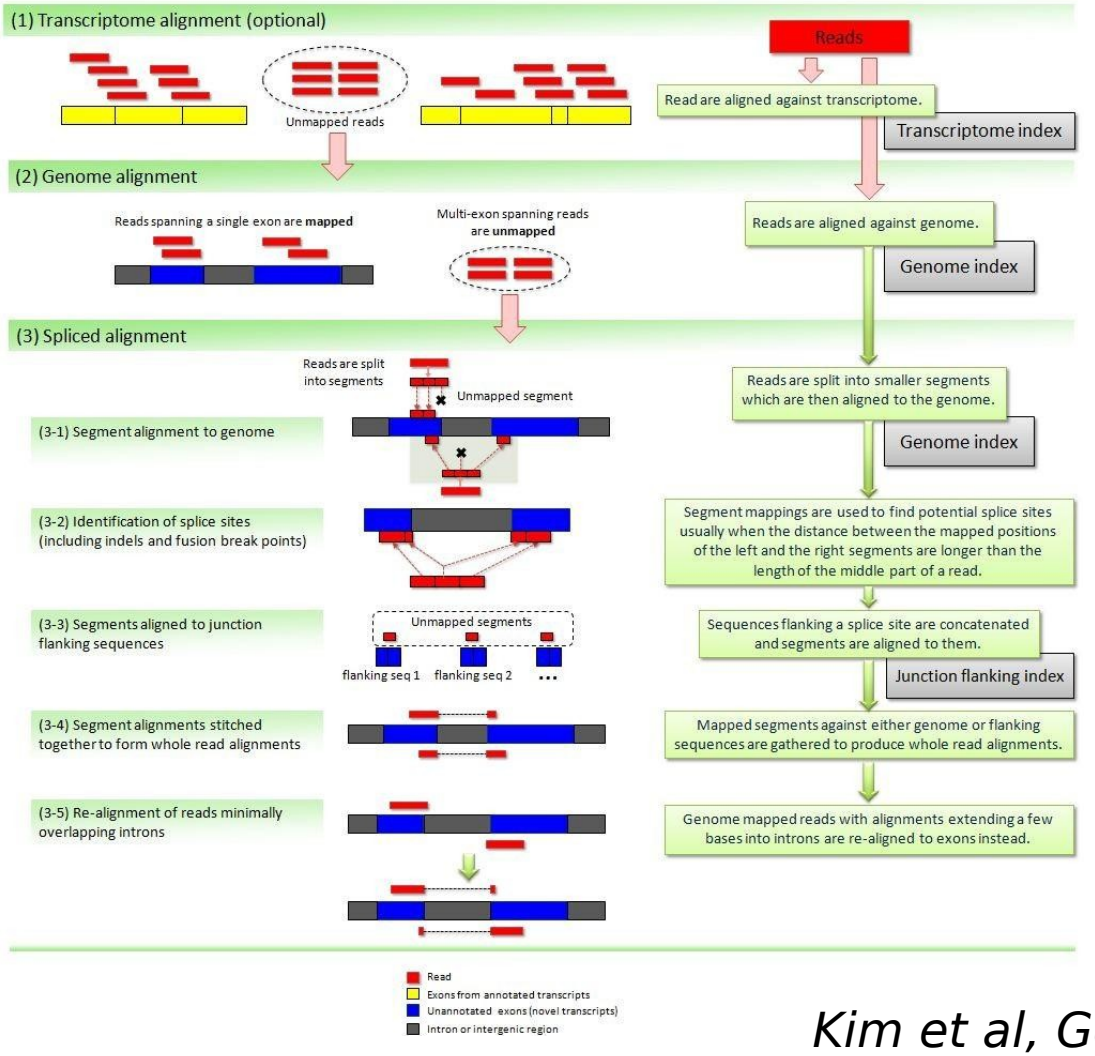

*Kim et al, Genome Biology, 2013*

# Étapes de mapping

- *Indexation du génome une fois pour toutes*
- *Mapping des lectures en utilisant l'index*



# Tophat2

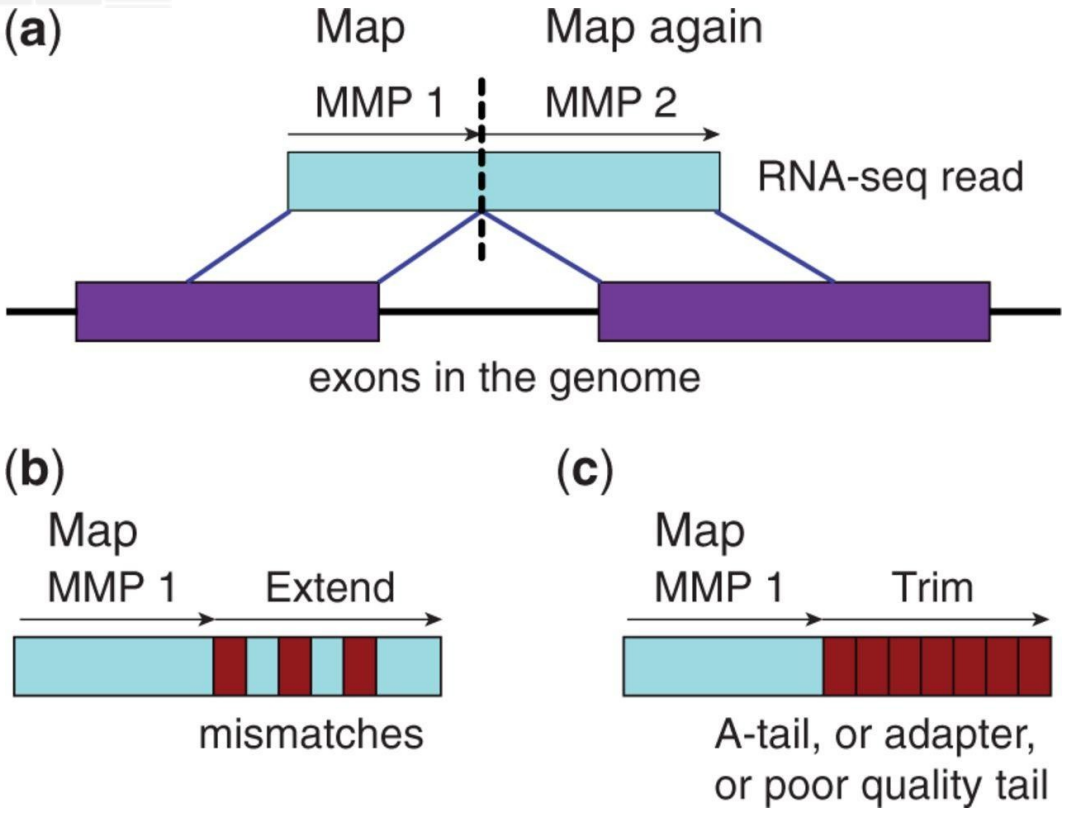



Tophat2 est constitué de beaucoup d'étape pour résoudre chaque cas difficile.

Chaque étape contient des heuristiques dont les paramètres sont à fixer.

*Kim et al, Genome Biology, 2013*

# **STAR** is an ultrafast universal RNA-seq aligner




*Dobin et al, Bioinformatics, 2011*

# Outils existants

- Tophat2 (le plus utilisé, le plus suivi)
- Star (runner-up)
- Crac (français !)
- GSNAP
- RUM
- MapSplice
- Gem
- …

# Outils existants

La plupart des outils

- utilise des sites de jonctions donnés par l'utilisateur pour "s'aider"
- suppose des sites canoniques GT-AG

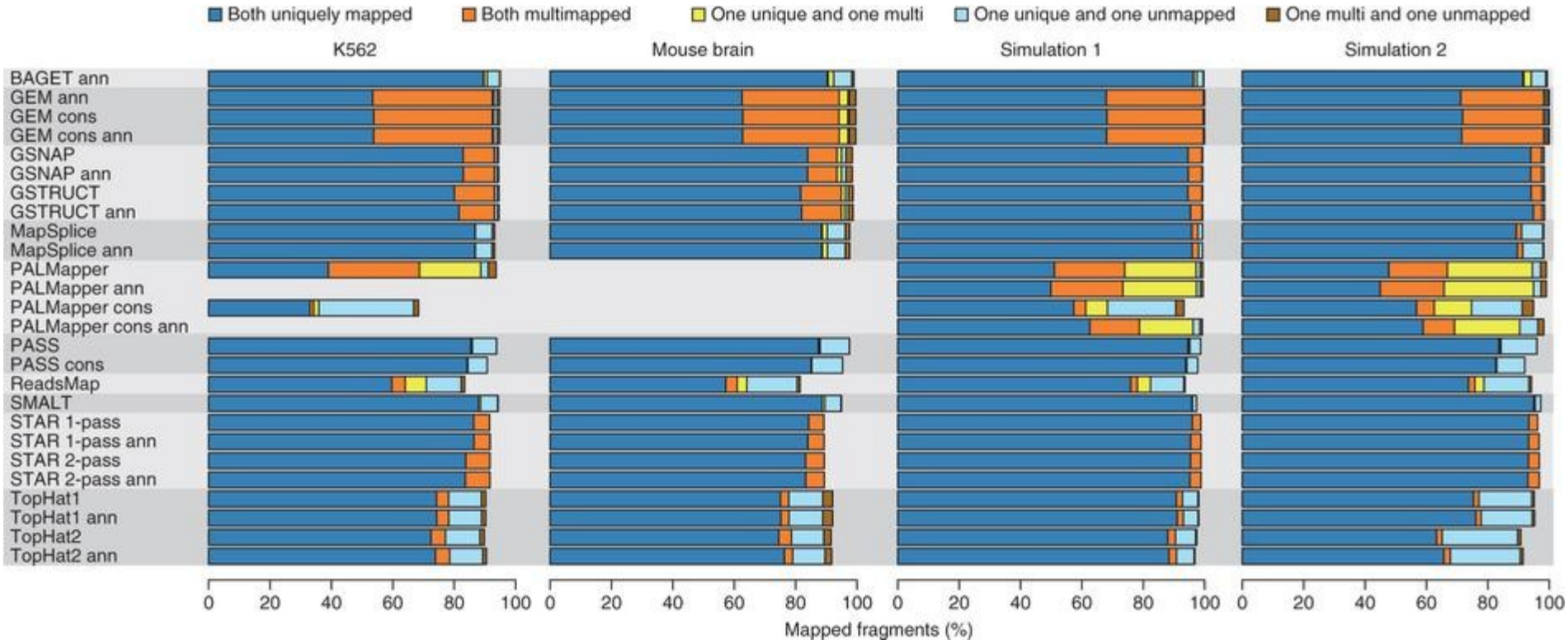
Comment évaluer un outil ?

- Sensibilité (mappe le plus de lectures)
- Spécificité (ne se trompe pas)
- … sur les lectures et sur les jonctions
- Temps
- Mémoire

En général, les critères sont contradictoires.

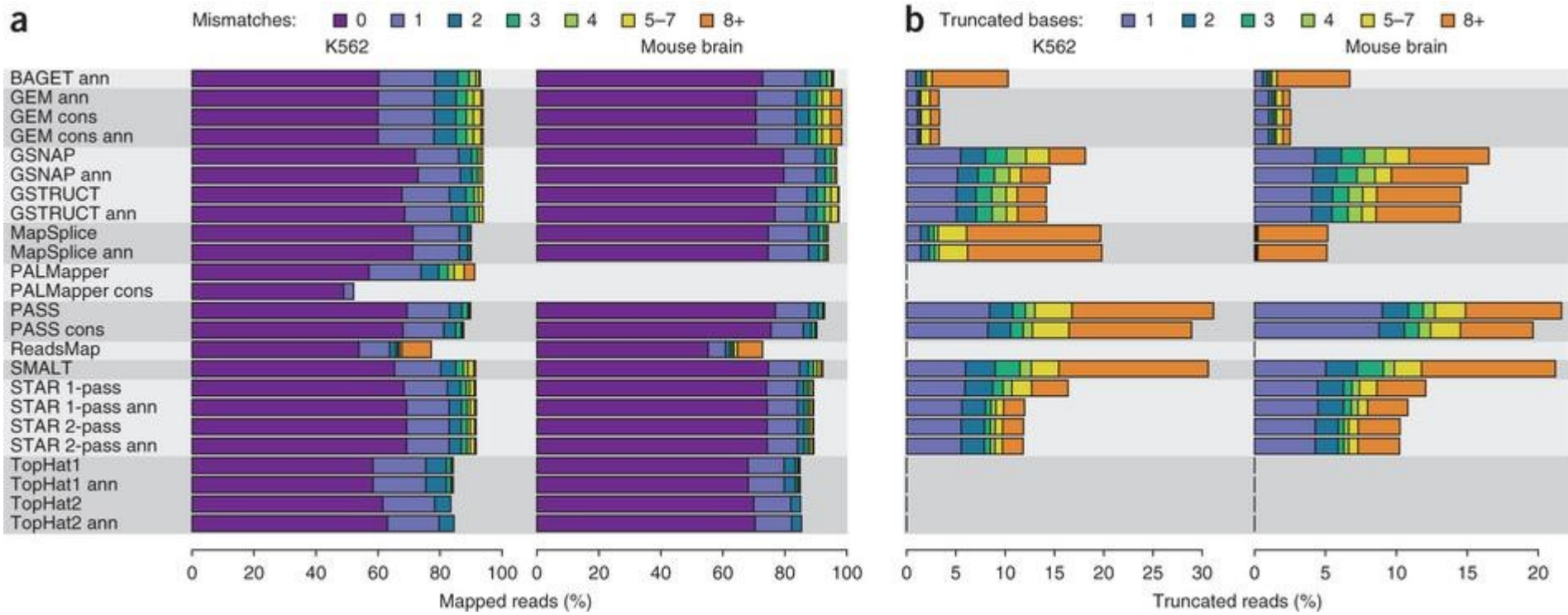
# RGASP 3

The RNA-seq Genome Annotation Assessment Project (Engström et al., Nature Methods, 2013)



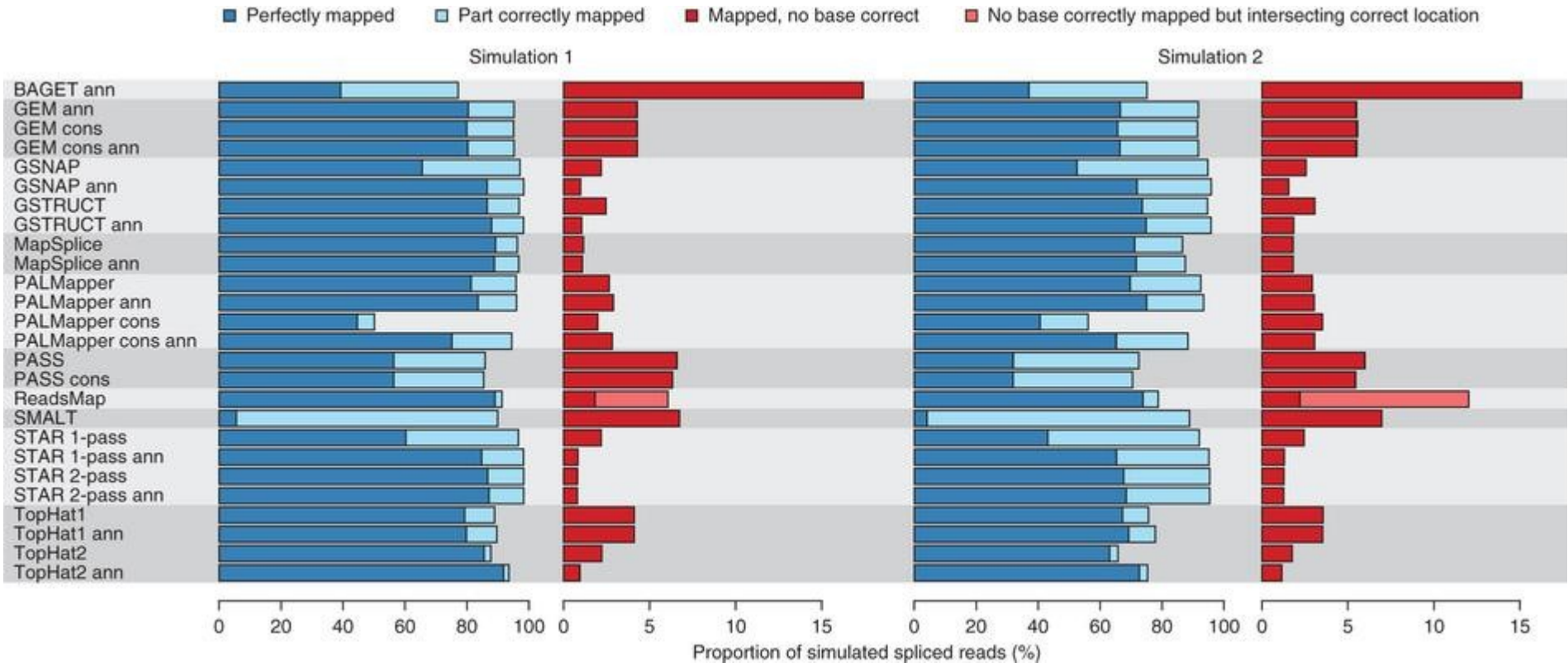
# RGASP 3

The RNA-seq Genome Annotation Assessment Project (Engström et al., Nature Methods, 2013)



# RGASP 3

The RNA-seq Genome Annotation Assessment Project (Engström et al., Nature Methods, 2013)



# RGASP 3

The RNA-seq Genome Annotation Assessment Project (Engström et al., Nature Methods, 2013)

## Les phrases clés

« Mapping properties are largely dependent on software algorithms even when the genome and transcriptome are virtually identical »

« Exon detection results based on K562 data were similar for GEM, GSNAP, GSTRUCT, MapSplice, STAR and TopHat »

# RGASP 3

The RNA-seq Genome Annotation Assessment Project (Engström et al., Nature Methods, 2013)

| STAR | vs | TopHat2 |
|---|---|---|
| + | # lectures alignées | - |
| - | # lectures correctement alignées | + |
| - | Sensibilité aux variations | + |
| - | Sensibilité aux annotations | + |

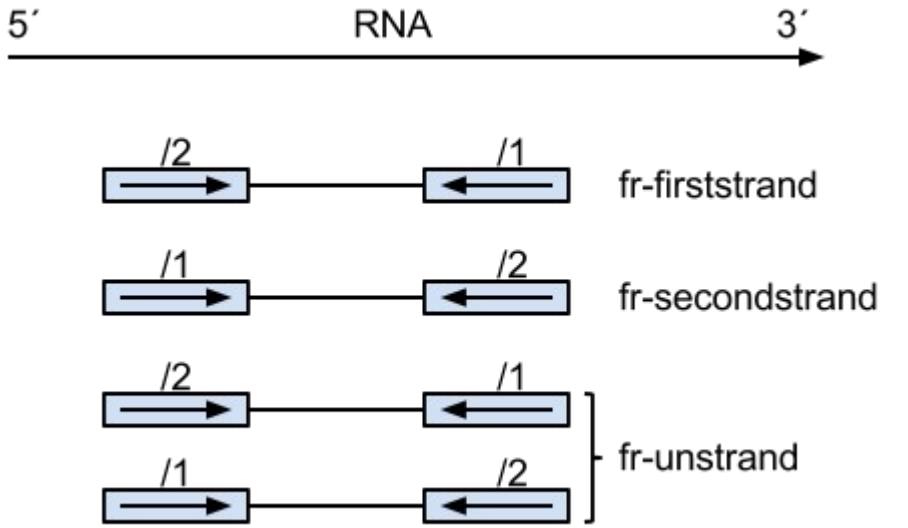
# Alignement : données initiales

- **Lectures (brutes / nettoyées ?)**
- **Génome de référence éventuellement annoté :**
  - Séquence nucléique (fasta)
  - Annotation structurale (GTF)
- **Ou trouver un génome et un transcriptome de référence ?**
  - Ensembl
  - NCBI
- **Exo : trouver votre génome préféré et son annotation.**

# Tophat

- En **entrée** :
  - **lectures** (**.fastq**)
  - **index bowtie2** de la **référence**
  - annotation structurale du génome (.gtf) [optionnel]
  - *jonction (.bed) [optionnel]*
  - *insertions / délétions (.bed) [optionnel]*

- Les options :
  - si paired, type de librairie.



# Tophat

## Attention aux paramètres par défaut !

❖**Dans le manuel :**

Please Note TopHat has a number of parameters and options, and their default values are tuned for processing mammalian RNA-Seq reads.

If you would like to use TopHat for another class of organism, we recommend setting some of the parameters with more strict, conservative values than their defaults.

Usually, setting the maximum intron size to 4 or 5 Kb is sufficient to discover most junctions while keeping the number of false positives low.

*http://tophat.cbcb.umd.edu/manual.shtml*

# Format GTF : Gene Transfert Format

- **Dérivé** du format généraliste GFF (General Feature Format)
- Contient l'**annotation structurale** du **génome** (gène, transcrits)

*Format :*

**<seqname>** <source> **<feature>** <start> **<end>** <score> **<strand>** <frame> **[attributes]** [comments]

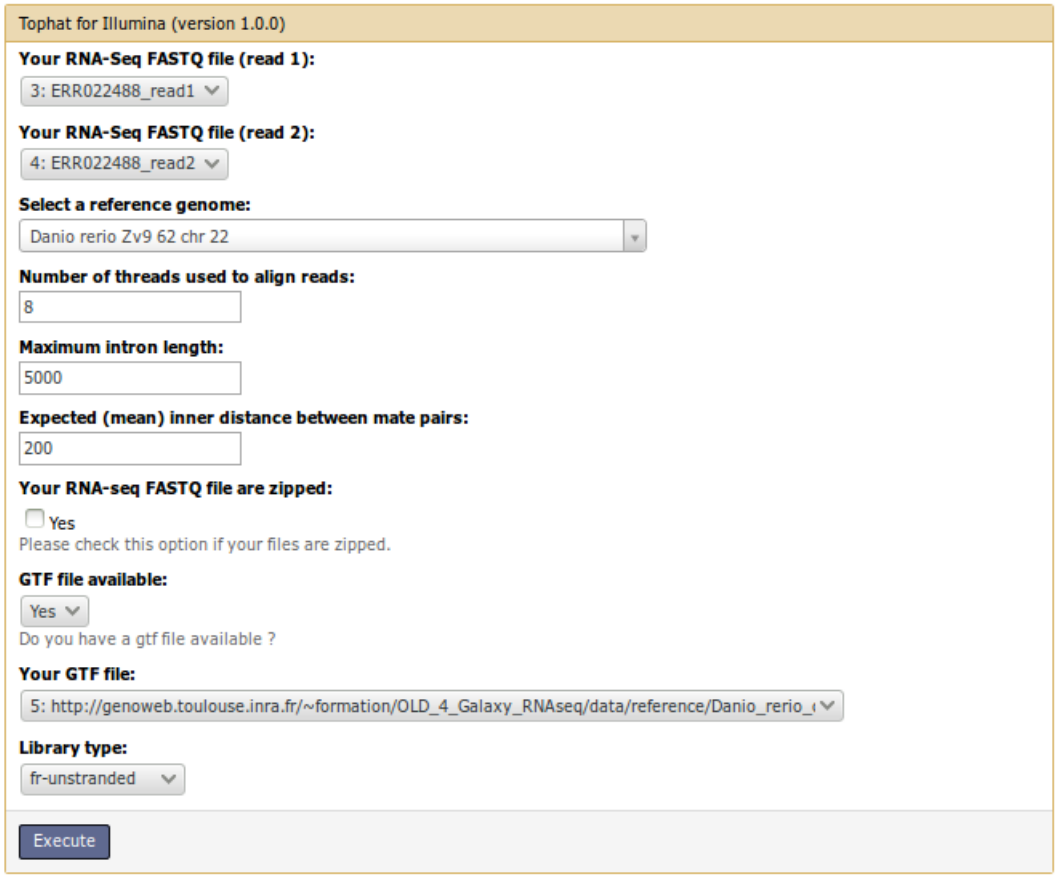
*Exemple :*

**3R** protein_coding **exon** 380 **509** . **+** . **gene_id "FBgn0037213"; transcript_id "FBtr0078961";**
**exon_number "1"; gene_name "CG12581"; transcript_name "CG12581-RB";**

- **Le champ attribut doit :**
  - **Commencer** par le ***gene_id*** : identifiant **unique** du gène
  - **Être suivi** par ***transcript_id*** : identifiant **unique** du transcrit prédit
- Les identifiants du chromosome (**Fasta** et **1ère colonne** du **GTF**) doivent être les **mêmes**

*http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQformat.html#format4*

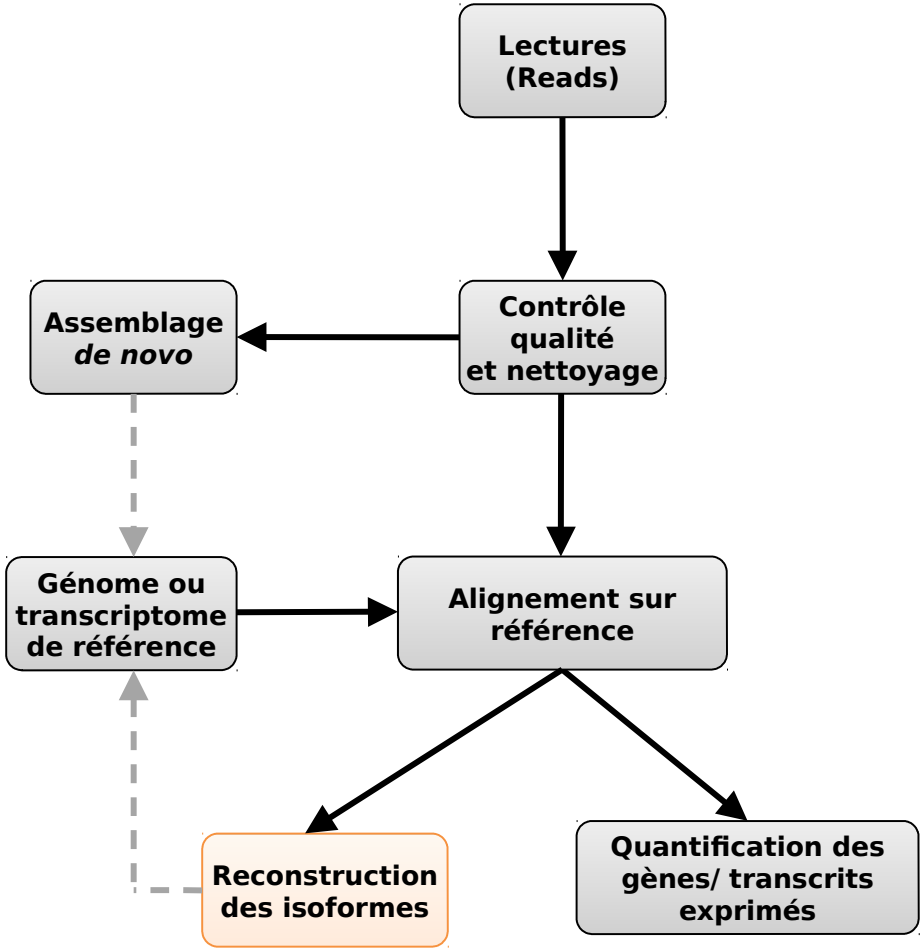
# TP : Mapping avec Tophat




❖ ***Lancer Tophat maintenant ! Avant de continuer la présentation.***

*http://tophat.cbcb.umd.edu/manual.shtml*

# TP : Visualisation avec IGV

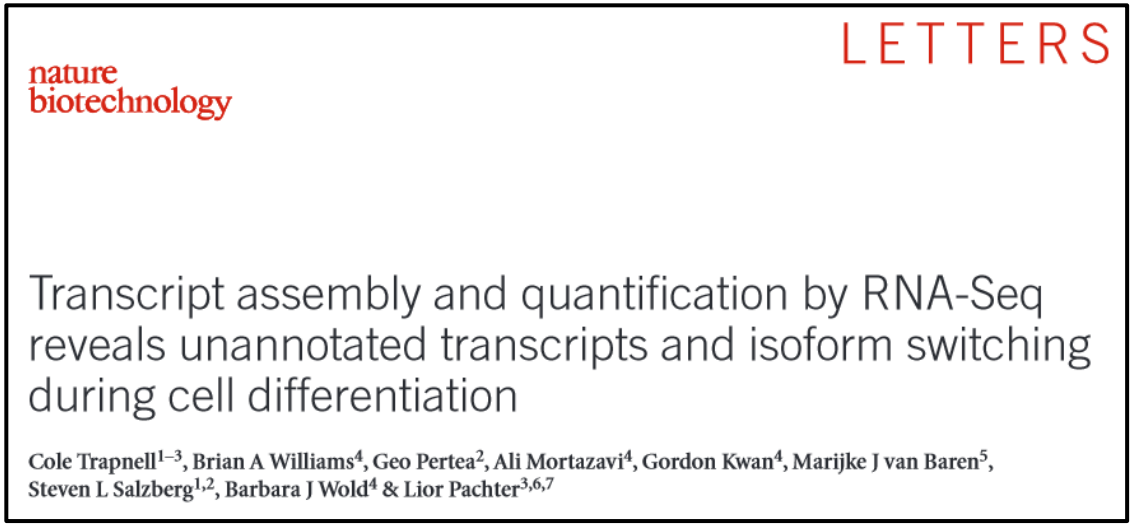



# _04 Reconstruction de transcrit

# Cufflinks

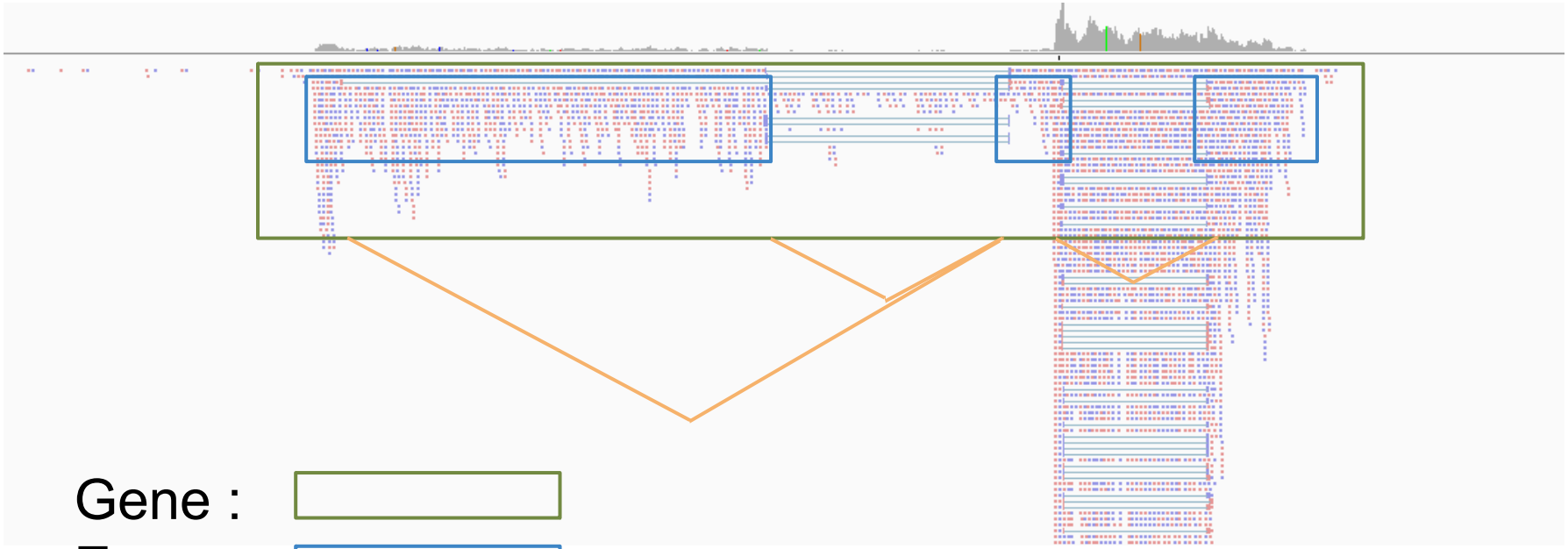
❖ Pipeline / suite logiciel de traitement RNA-Seq :

- **assemble** les **transcrits** (cufflinks)
- quantifie l'abondance des transcrits (cufflinks)
- compare les annotations des transcrits (cuffcompare)
- analyse l'expression différentielle des transcrits (cuffdiff)




*http://cufflinks.cbcb.umd.edu/*

# Modélisation



Gene :

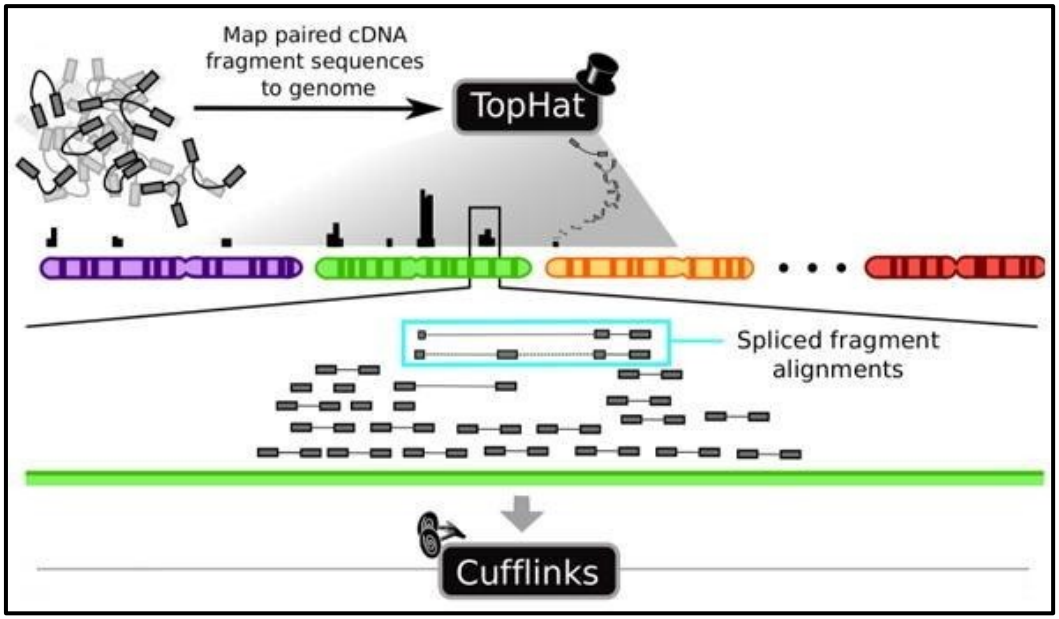
Exons :

Jonctions (dans les paires & les Reads)

# Cufflinks

## **Reconstruction** de **transcrits**

- Fragments divisés en ***loci* non chevauchants**
- Chaque ***locus*** est **assemblé indépendamment**




*Trapnell et al. Nat Biotechnol. 2010*

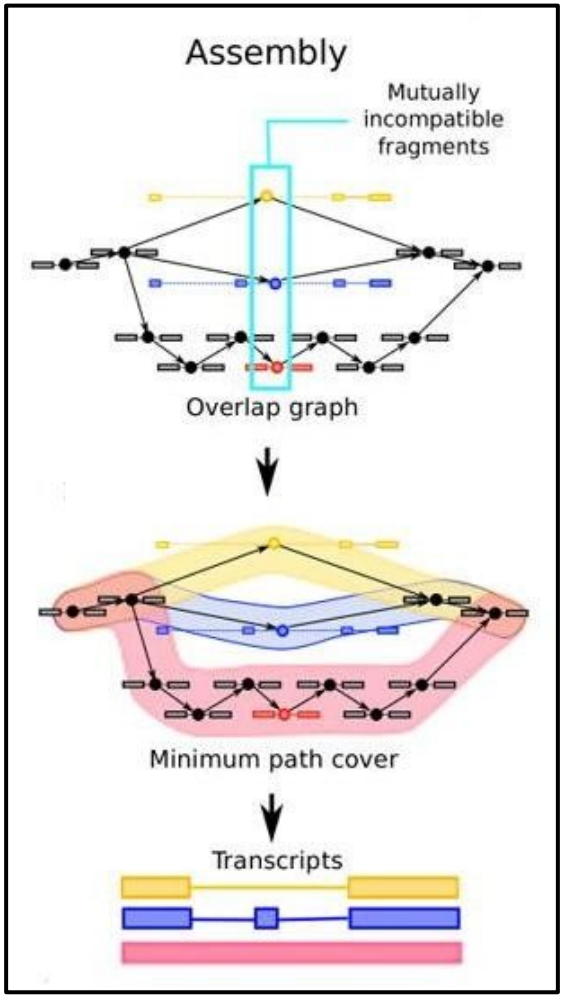
# Cufflinks

## **Reconstruction** de **transcrits**

- **Les différents chemins** :
  - trouver les **positions** des **gènes**
  - trouver les **exons**
  - trouver les **jonctions :**
    - **entre les paires**
    - **dans les séquences**

- **Stratégie** de **construction** du **modèle** :
  - trouver le **nombre minimum de modèles qui expliquent les lectures** :
    - **minimum de chemins**
    - **Nb de lectures incompatibles**

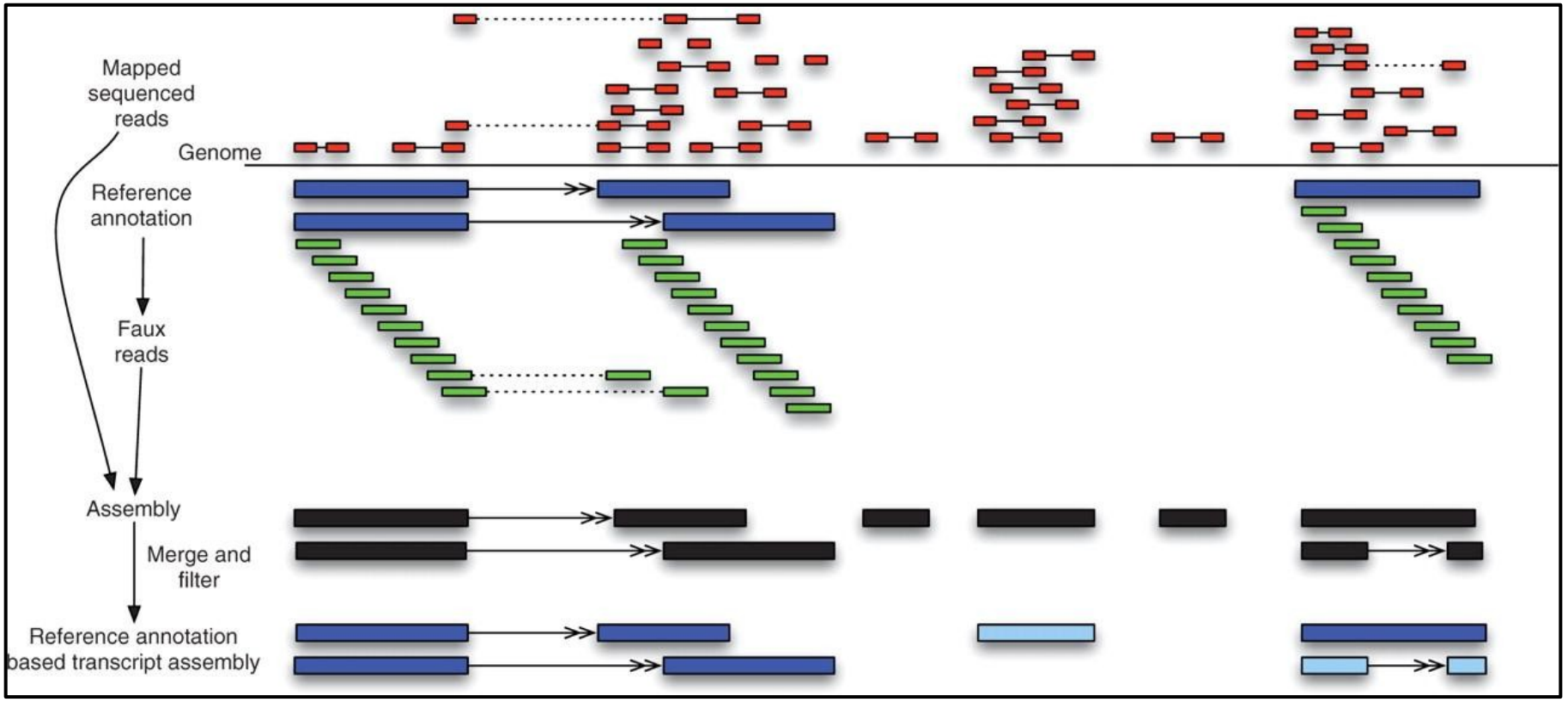
    = **nb minimum** de **transcrits** nécessaires
    - **1 chemin = 1 isoforme**




*Trapnell et al. Nat Biotechnol. 2010*

# Cufflinks

## Reference Annotation Based Transcripts Assembly




*Roberts et al. Bioinformatics 2011*

# Cufflinks

- Reference fasta (génome)
- Référence gtf (transcriptome)
- 1 bam par échantillon
- Quelles sont les stratégies possibles pour identifier le **maximum** de transcrits ?

# Cufflinks

## **Reconstruction** des **transcrits**

- En **entrée** :
  - **lectures** (**.sam**/**.bam**)
  - Use guide transcript assembly : **annotations** (**.gtf**)

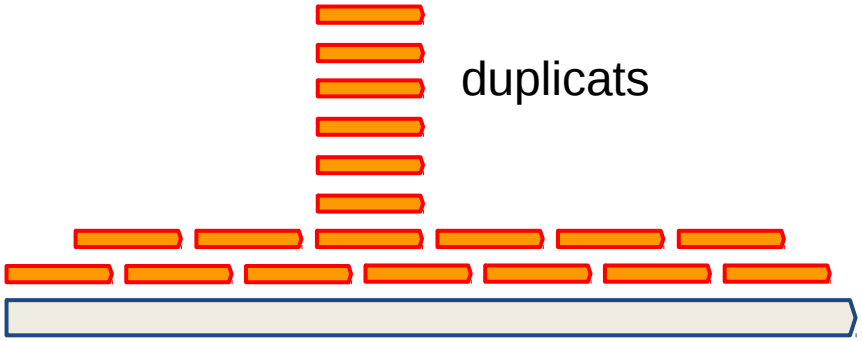
- En **sortie** :
  - **transcrits** (**.gtf**) :
    - positionnement et quantification des isoformes
  - **gènes** (**.fpkm_tracking**) :
    - F/RPKM des gènes
  - **isoformes** (**.fpkm_tracking**) :
    - F/RPKM des isoformes

# Fusion d'aligements

- Samtools : suite logicielle permettant la manipulation de fichiers SAM/BAM/CRAM
- **Samtools view** : visualisation / conversion
- **Samtools merge** : fusion de fichiers d'aligement
- Il existe aussi samtools index, flagstats, rmdup ...

# Données redondantes

- Que faire dans ce cas ?

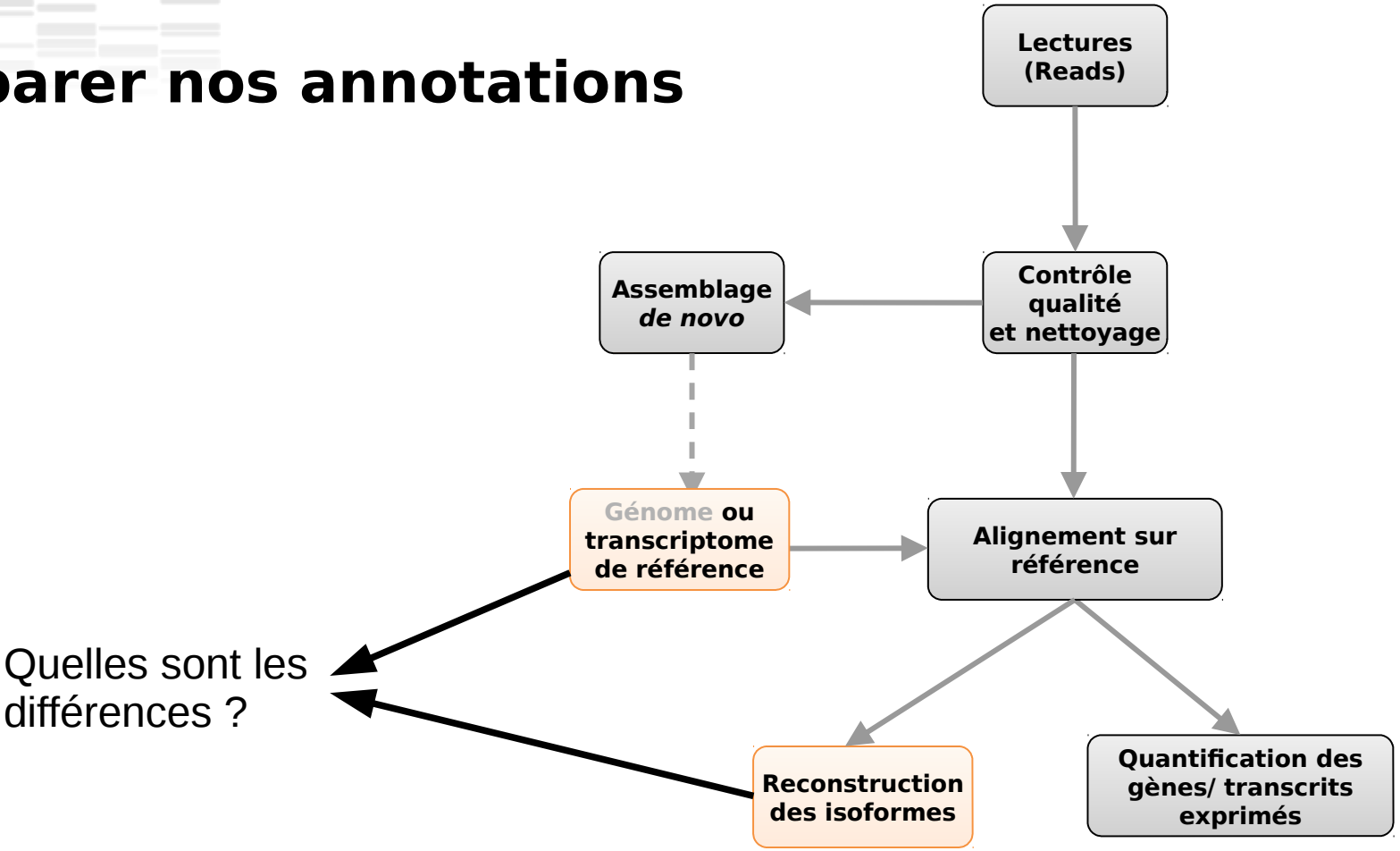



Les duplicats sont dus à des erreurs de préparation ou séquençage.

- Cas en pair-ends.

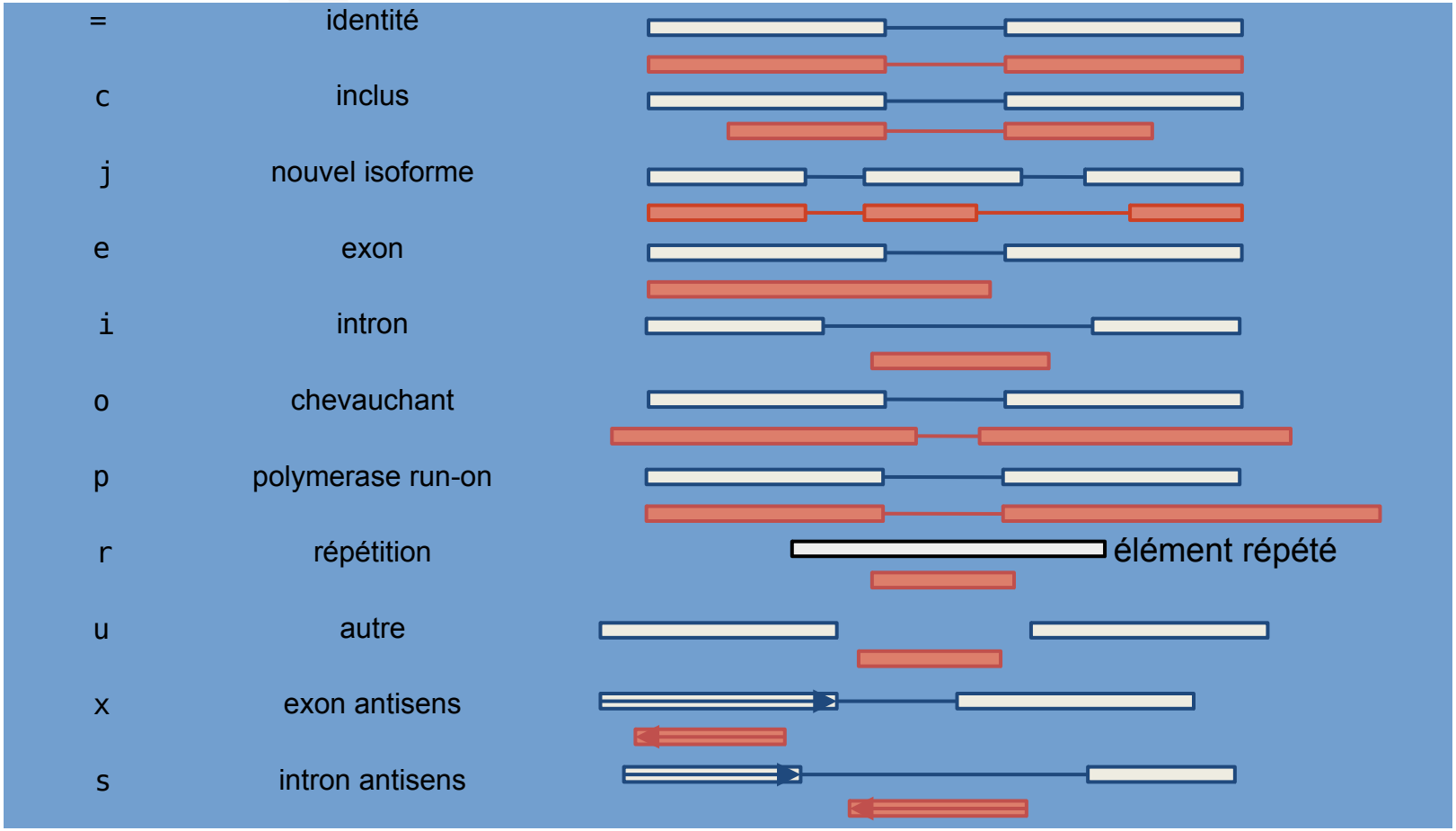
# Cufflinks - Cuffcompare

## Comparer nos annotations



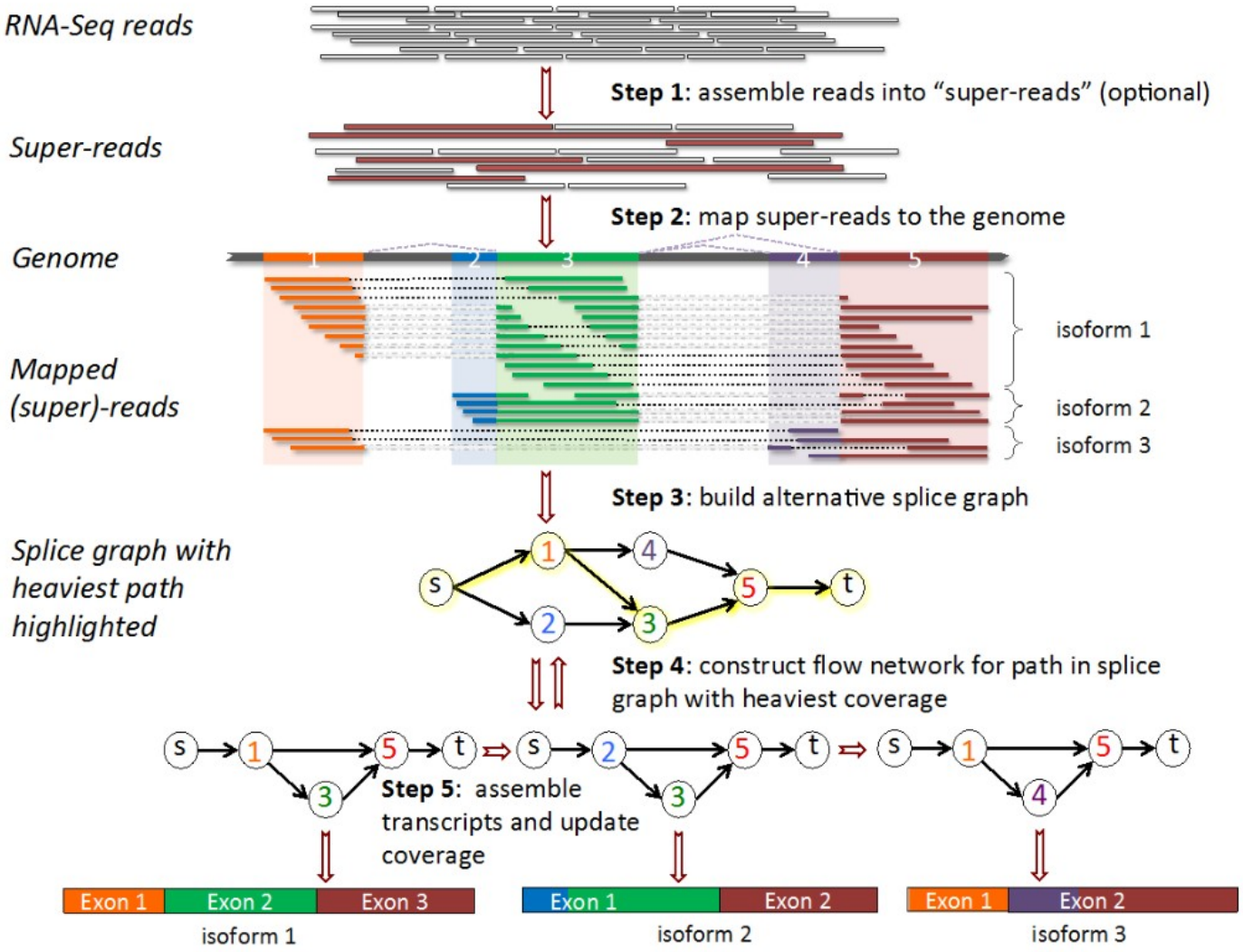
# Cufflinks - Cuffcompare

## Class code de cuffcompare




*http://cufflinks.cbcb.umd.edu/manual.html#class_codes*

# StringTie

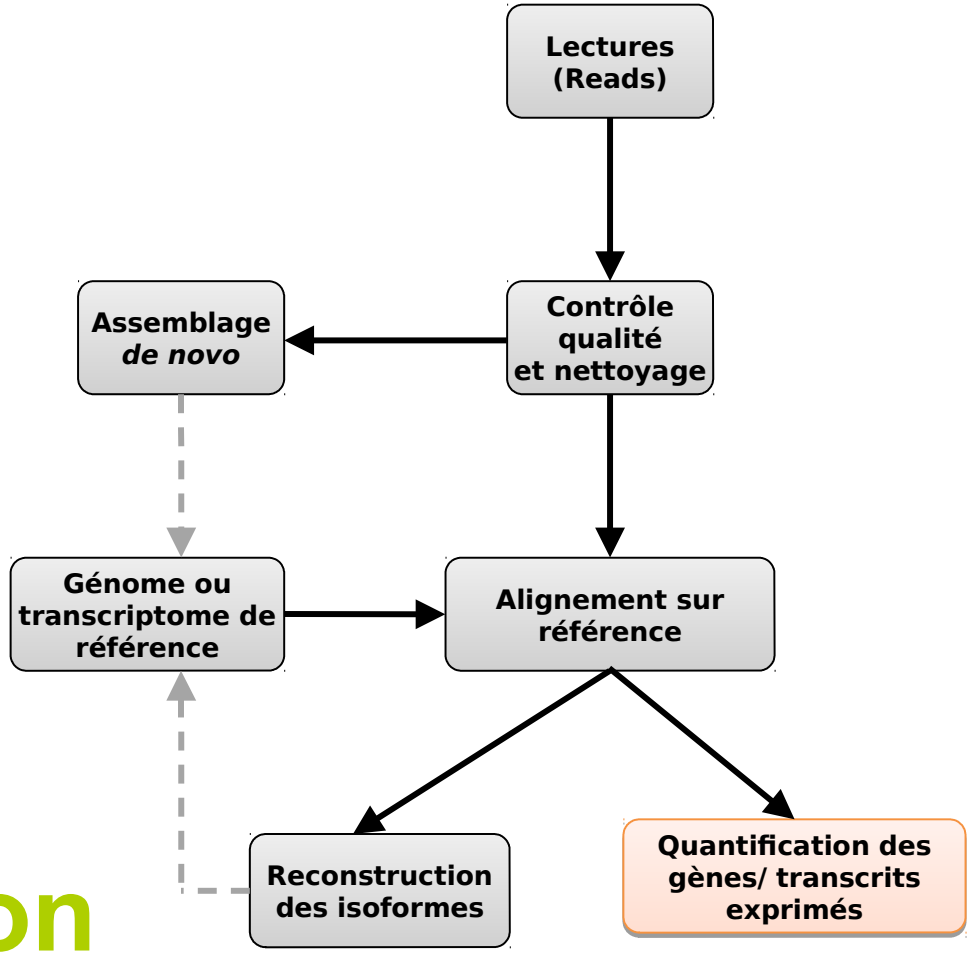



*Pertea et al. Nature Biotechnology 2015*

# TP - Découverte de transcrit

- Fusionner les alignements (samtools merge)
- Supprimer les duplicats (samtools rmdup)
- Détecter les nouveaux transcripts (cufflinks)
- Ouvrir le nouveau transcriptome dans IGV

# _05 Quantification



# Quantification

## Que cherche-t-on à compter ?

- Quel *feature* compter ?
  - **gènes**
  - **exons**
  - **transcrits**

```
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      aggregate_gene  7529    9484    .       +       .       gene_id "FBgn0031208"
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     7529    8116    .       +       .       transcripts "FBtr0300689+FBtr0300690"; exonic_part_numbe
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     8193    8589    .       +       .       transcripts "FBtr0300689+FBtr0300690"; exonic_part_numbe
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     8590    8667    .       +       .       transcripts "FBtr0300689"; exonic_part_number "003"; gen
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     8668    9484    .       +       .       transcripts "FBtr0300689+FBtr0300690"; exonic_part_numbe
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      aggregate_gene  9836    21372   .       -       .       gene_id "FBgn0002121"
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     9836    11344   .       -       .       transcripts "FBtr0078170+FBtr0078171+FBtr0078169+FBtr007
c_part_number "001"; gene_id "FBgn0002121"
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     11410   11518   .       -       .       transcripts "FBtr0078170+FBtr0078171+FBtr0078169+FBtr007
c_part_number "002"; gene_id "FBgn0002121"
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     11779   12221   .       -       .       transcripts "FBtr0078170+FBtr0078171+FBtr0078169+FBtr007
c_part_number "003"; gene_id "FBgn0002121"
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     12286   12928   .       -       .       transcripts "FBtr0078170+FBtr0078171+FBtr0078169+FBtr007
c_part_number "004"; gene_id "FBgn0002121"
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     13520   13625   .       -       .       transcripts "FBtr0078170+FBtr0078171+FBtr0078169+FBtr007
c_part_number "005"; gene_id "FBgn0002121"
chr2L   Drosophila_melanogaster.BDGP5.25.62.gtf.gz      exonic_part     13683   14874   .       -       .       transcripts "FBtr0078170+FBtr0078171+FBtr0078169+FBtr007
```

- Comptage brut sur les gènes ou les exons ou les transcrits:
  - **featureCount**
- Estimation de l'abondance des transcrits reconstruits :
  - **Cufflinks**

- Dépend des données disponibles

| gene_id | untreated1 | untreated2 | untreated3 | untreated4 | treated1 |
|---|---|---|---|---|---|
| FBgn0000003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| FBgn0000008 | 92 | 161 | 76 | 70 | 140 | 88 | 70 |
| FBgn0000014 | 5 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| FBgn0000015 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| FBgn0000017 | 4664 | 8714 | 3564 | 3150 | 6205 | 3072 | 3334 |
| FBgn0000018 | 583 | 761 | 245 | 310 | 722 | 299 | 308 |
| FBgn0000022 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FBgn0000024 | 10 | 11 | 3 | 3 | 10 | 7 | 5 |
| FBgn0000028 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| FBgn0000032 | 1446 | 1713 | 615 | 672 | 1698 | 696 | 757 |

# featureCounts

- Mieux que Htseq-count
- Niveau exon, gène, transcrit.
- 1 read peut être attribué à plusieurs Feature.
- Reads avec alignement multiples peuvent être pris en compte.
- Brin-spécifique très bien géré.
- 2 Notions :
  - *feature* (e.g. exon)
  - *meta-feature* : agrégation de feature (e.g. gene)

# featureCounts options

Feature Counts (version 1.0.0)

**Your annotation file (gtf file):**

39: Cufflinks on merged: assembled transcripts

Give the name of the annotation file. The program assumes that the provided annotation file is in GTF format. Use -F option to specify other annotation formats.

**First SAM/BAM file:**

29: {WT_rep1_1_Ch6.fastq}-Tophat_mapped.bam

Give the names of input read files that include the read mapping results. Format of input files is automatically determined (SAM or BAM). Paired-end reads will be automatically re
each other. Multiple files can be provided at the same time.

**Add another BAM/SAM datasets**

**Add another BAM/SAM dataset 1**

**Other SAM/BAM files:**

32: {MT_rep1_1_Ch6.fastq}-Tophat_mapped.bam

Remove Add another BAM/SAM dataset 1

Add new Add another BAM/SAM dataset

**Specify feature type:**

exon

Only rows which have the matched matched feature type in the provided GTF annotation file will be included for read counting. `exon' by default

**Specify the attribute type used to group features (eg. exons) into meta-features (eg. genes), when GTF annotation is provided:**

gene_id

**Reads will be allowed to be assigned to more than one matched meta-feature:**

Yes

**Indicate if strand-specific read counting should be performed:**

unstranded

**Multi-mapping reads/fragments will be counted:**

Yes

**Only primary alignments will be counted:**

Yes

**inimum number of overlapped bases required to assign a read to a feature:**

30

Negative values are permitted, indicating a gap being allowed between a read and a feature.

**Optional paired-end parameters:**

Paired-end reads

# featureCounts : options

**Multi-mapping reads/fragments will be counted:**

Yes

**Only primary alignments will be counted:**

Yes

**inimum number of overlapped bases required to assign a read to a feature:**

30

Negative values are permitted, indicating a gap being allowed between a read and a feature.

**Optional paired-end parameters:**

Paired-end reads

**Fragments (or templates) will be counted instead of reads. The two reads from the same fragment must be adjacent to each other in the provided SAM/BAM file:**

Fragments NOT counted instead of reads

**Paired-end distance will be checked when assigning fragments to meta-features or features:**

Paired-end distance will NOT be checked.

**Minimum fragment/template length:**

50

Minimum fragment/template length, 50 by default.

**Maximum fragment/template length:**

600

Maximum fragment/template length, 600 by default.

**If specified, only fragments that have both ends successfully aligned will be considered for summarization:**

Not only fragments with both ends successfully aligned

**If specified, the chimeric fragments (those fragments that have their two ends aligned to different chromosomes) will NOT be included for summarization:**

The chimeric fragments will NOT be included

Execute

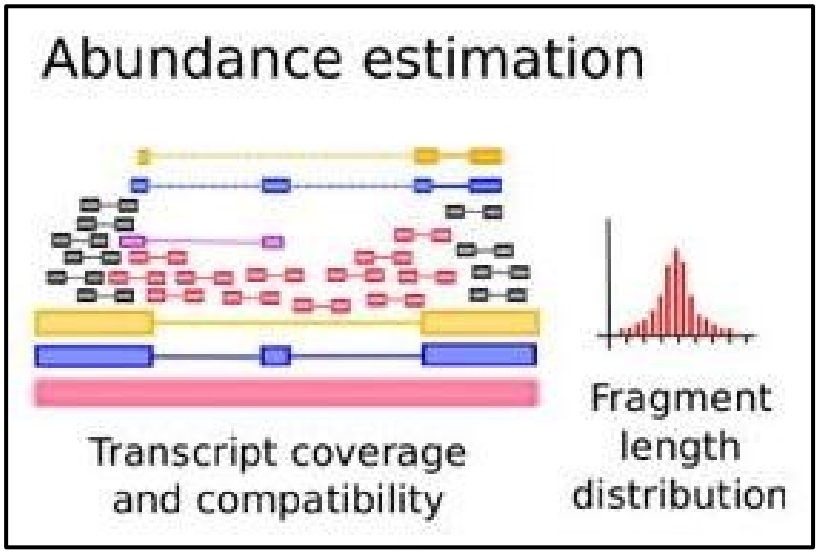
# Cufflinks

## Principes

- **Assignation des lectures** à un transcrit

- **Estimation** de l'**abondance** de **chaque transcrit** mesurée en :

  - **RPKM** (*single reads*)
  - **FPKM** (*paired-end reads*)




*Trapnell et al. Nat Biotechnol. 2010*

# Cufflinks

## RPKM / FPKM

❖Permet de corriger les **biais de longueur** des transcrits

❖**RPKM** :

**R**eads **P**er **K**ilobase of exon per **M**illion fragments mapped :

R = Nombre de read mappés

N = Nombre total de read de la librairie

L = taille des exons du gène en bp

$$RPKM = \frac{10^9 \times R}{N \times L}$$

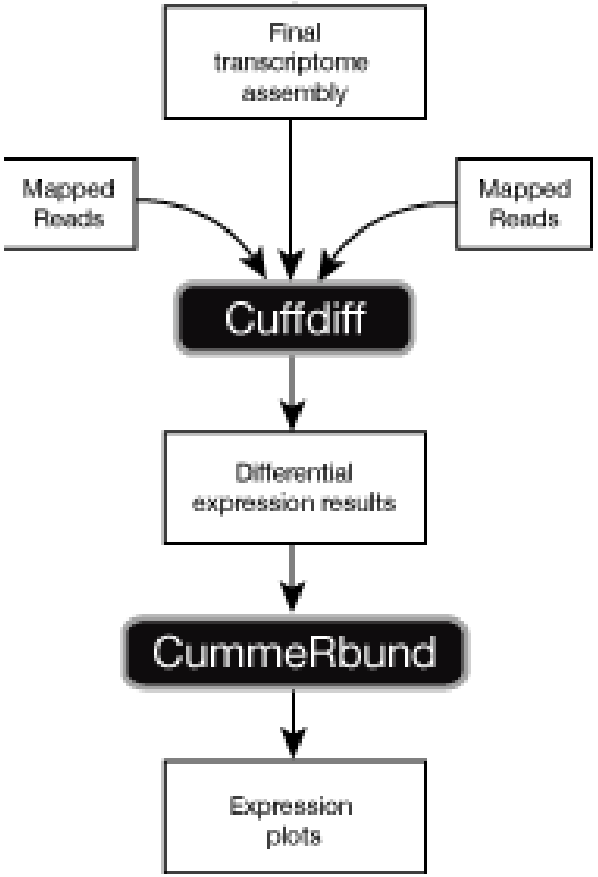
❖**FPKM :**

- **F**ragments **P**er **K**ilobase of exon per **M**illion fragments mapped
- **1 paire de lecture = 1 fragment**

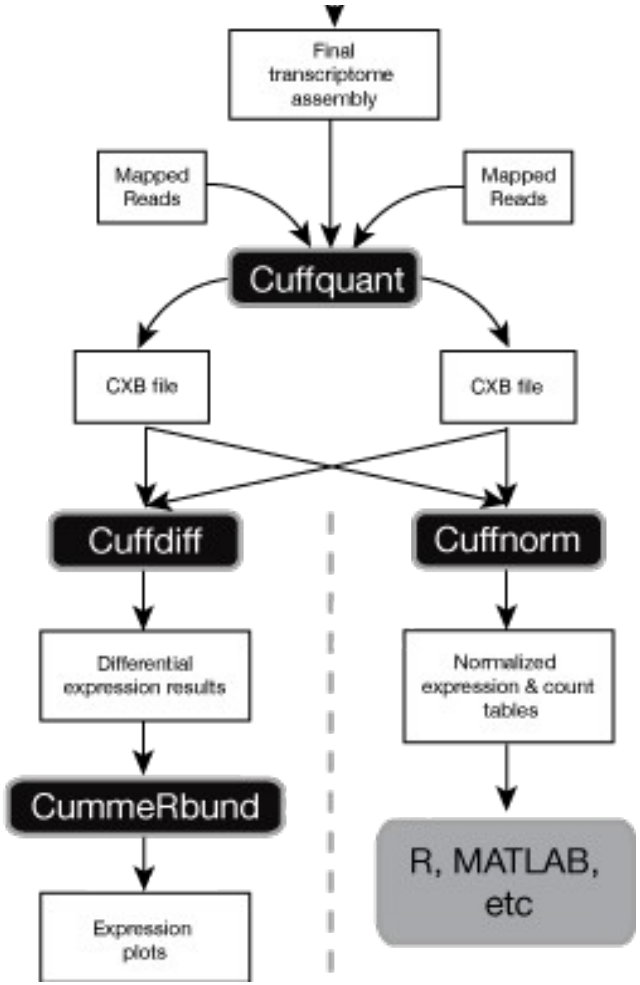
*Mortazavi et al. Nature Methods 2008*

# Cufflinks - Estimation de l'abondance

## <2.2.0




## >=2.2.0



# TP : Quantification

# L'expression différentielle

**But** : trouver les *gènes significativement* différentiellement exprimés entre 2 conditions.

**Méthode**:

- Normalisation
- Estimation de l'expression
- Test

**Outils :**

- DESeq, EdgeR, DESeq2, etc. (en R)
- CuffDiff (suite Tuxedo)

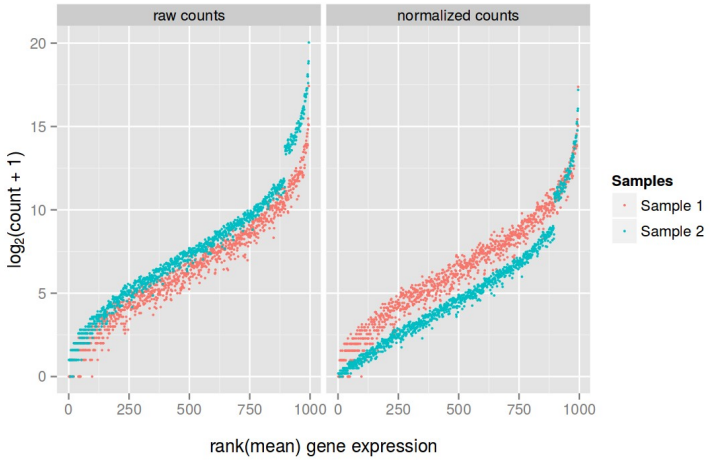
# Normalisation

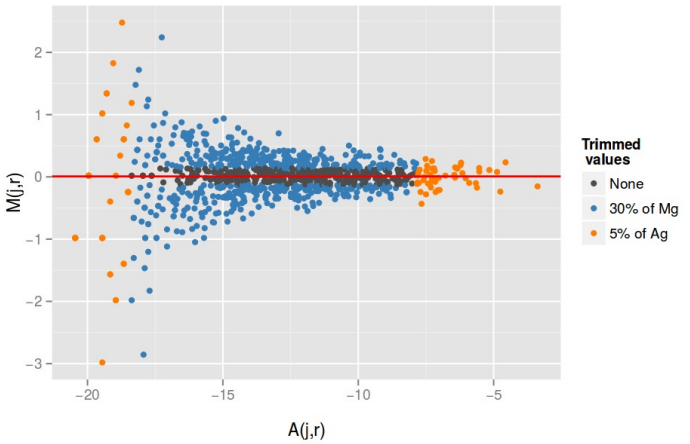
**Problème**: Le nombre de lectures est différent d'un réplicat à l'autre.

**Idée**: Appliquer à chaque échantillon un coefficient multiplicatif.

Rapporter par rapport au nombre total de lectures (RPKM)?

Autres méthodes (EdgeR)



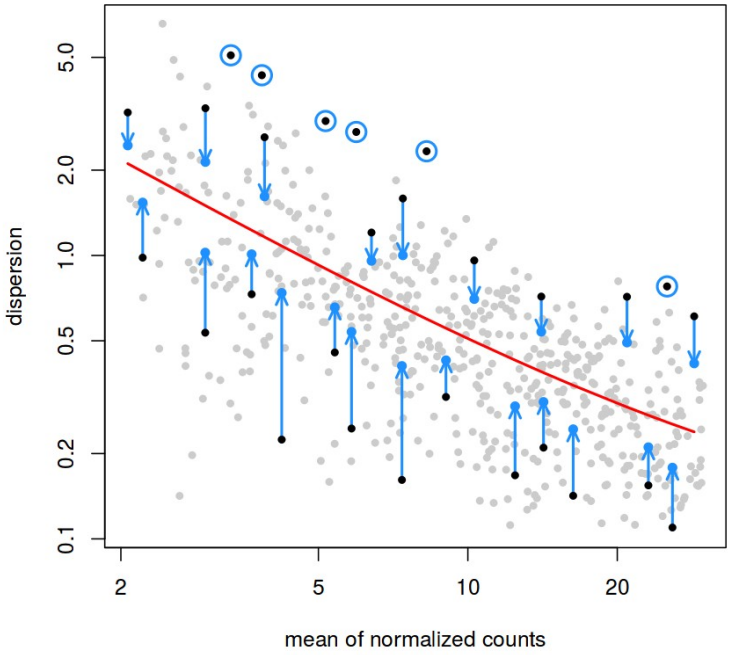

*Ignacio Gonzalez*

# Estimation de l'expression

**But** : modéliser l'expression d'un gène dans une/des conditions.

**Méthode**:

- Loi binomiale négative (poisson + surdispersion)
- Estimation de la moyenne et de la dispersion de l'expression.




*Ignacio Gonzalez*

# Test

**But** : Comparer les distributions d'expression dans 2 conditions.

**Résultats**: p-value et q-value (p-value avec correction de tests multiples)

# Pourquoi faire aussi compliqué ?

*Le FC est suffisant ?*
Comparer 1 *vs* 2 et 1000 *vs* 2000 n'est pas pareil.

*Faut-il des réplicats ?*
Revient à comparer 2 individus, pas 2 conditions.

*Et si je poole mes réplicats ?*
1 individu avec un gène très exprimé noie les comptages.
Comparer 100,100,100 *vs* 200,200,200 et 0,100,200 *vs* 0,0,600.

*Faut-il faire la correction aux tests multiples?*
Sur 30 000 tests, on est obligé de faire au moins un bon score !

# _06
# Conclusion

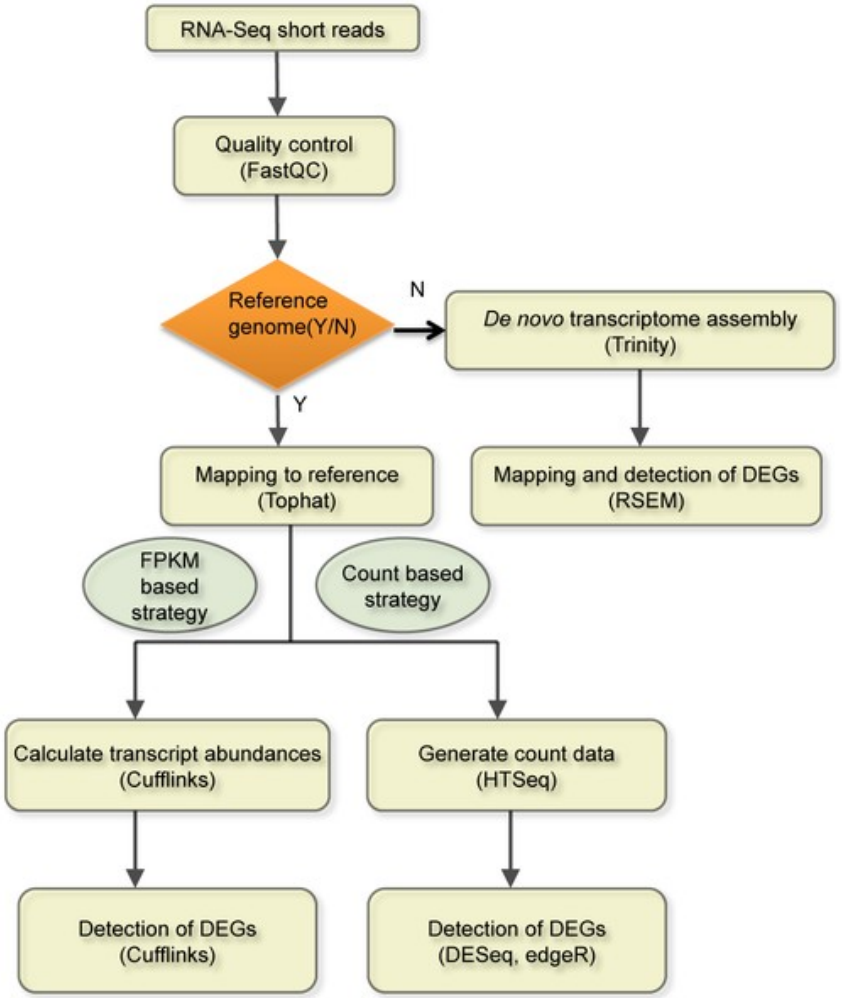
# Conclusion générale

- Workflow galaxy à construire
- Choix des outils dépendent des données disponibles et de la question biologique

Tous les outils sont dispo sur Migale et Galaxy

- Et maintenant en avant pour les stats !

Figure 1. The workflow of differential expression analysis for RNA-Seq data.




Zhang ZH, Jhaveri DJ, Marshall VM, Bauer DC, Edson J, et al. (2014) A Comparative Study of Techniques for Differential Expression Analysis on RNA-Seq Data. PLoS ONE 9(8): e103207. doi:10.1371/journal.pone.0103207
http://127.0.0.1:8081/plosone/article?id=info:doi/10.1371/journal.pone.0103207

# Liens utiles

- **Seqanswer** : *http://seqanswers.com/*
- **Biostar** : *https://www.biostars.org/*
- **RNA-Seq blog** : *http://rna-seqblog.com/*

# Remerciements


- Le groupe de travail « **Planification d'expériences et RNA-seq** » du **PEPI IBIS**


Satisfaction form :
http://bioinfo.genotoul.fr/index.php?id=79