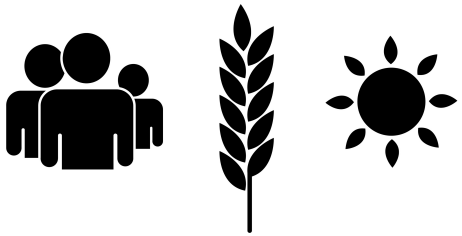
COMPARAISON ET ALIGNEMENT DE GÉNOMES COMPLETS

Hélène Chiapello, INRA – Unité MaIAGE

http://maiage.jouy.inra.fr

23 octobre 2018



Hélène Chiapello
Helene.chiapello@inra.fr

INRA
SCIENCE & IMPACT

Plan

Alignement de génomes

1. Introduction

2. Les indices de distance génomique (ANI, MASH)

3. Les outils d'alignement de génomes : principe et exemples

- Mummer
- BlastZ et YASS
- La famille d'outils « MAUVE »

4. Les formats d'alignement

5. Conclusion

Partie 1 : Introduction - Contexte

Sequencing Projects*

Complete Projects 14.970
Permanent Drafts 126.911
Incomplete Projects 77.162
Targeted Projects 1.531

Organisms: 315 554

Archaea 3 032
Bacteria 277 595
Eukarya 25 962
Viruses 8 965

Pour quelques genres bactériens (Streptocoques, Escherichia, Salmonella, Staphylocoques,…) : plus de 7000 génomes séquencés

*source GOLD : http://www.genomesonline.org/, oct 2018

Le développement d'outils performants de comparaison et d'alignement de génomes est un enjeu important de la génomique et de la bioinformatique

Défis

- Niveau d'assemblage et qualité hétérogène des données
- Les outils doivent passer à l'echelle
- Problèmes de visualisation des résultats
- Stratégies à adapter à une question biologique

Pourquoi comparer des génomes ?

Quelques enjeux clés en biologie :

- **Pour l'annotation des génomes :**
  - Aide à **l'assemblage** et à **l'annotation** de génomes « drafts »
  - Annotation de certains **éléments fonctionnels** des génomes (motifs, îlots,…)

- **Pour les analyses de phylogénomique :**
  - Analyse de la **microévolution** des génomes
  - Définition d'un **génome minimal ancestral**
  - Construction d'**arbres phylogénétiques**

La comparaison de génomes

Trois grands types d'approches:

- **L'évaluation de la diversité génomique :**
  - Métriques pour calculer des distances génomiques
  - Lien avec la distance évolutive
- **L'alignement des génomes :**
  - alignement global ou local des chromosomes complets ou partiels
  - identification des séquences conservées (codantes et non codantes)
- **La comparaison des protéomes :**
  - identification des familles de protéines (orthologues & paralogues)
  - annotation fonctionnelle des protéines

➢ Ces approches sont complémentaires

➢ L'évaluation de la diversité génomique va permettre de s'orienter vers des stratégies adaptées de comparaison de génomes

L'alignement de génomes chez les procaryotes

Contexte :

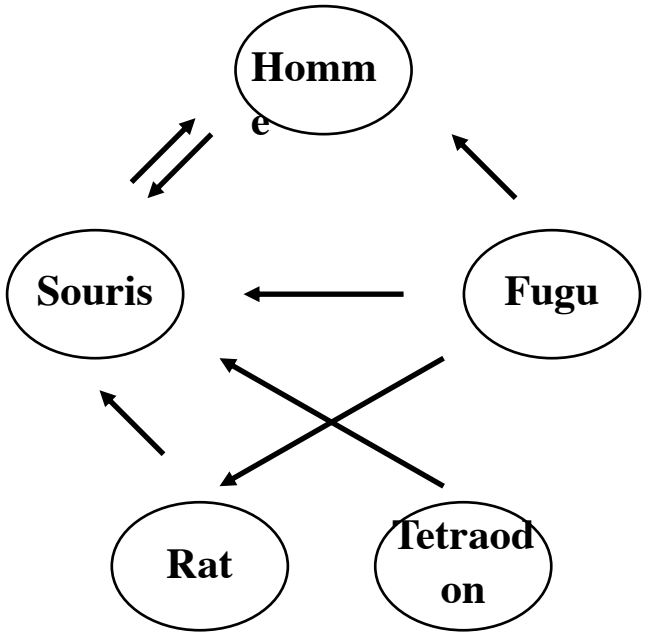
- **Séquences génomiques de grande taille** (en général entre 1 à 6 Mb pour un génome bactérien)
- **Grande diversité d'événements mutationnels** : mutations ponctuelles, insertions/délétions, et divers types de réarrangements (inversions, duplications, translocations).

Quelques exemples d'application:

- Analyse de la **structure et de l'évolution** des génomes, en particulier à l'échelle micro-évolutive
- Définition d'un **génome minimal ancestral**
- Identification de **l'origine d'un phénotype particulier** (pathogénicité, adaptation,…)
- Prédiction et analyse de la structure de certains **éléments fonctionnels** (motifs, îlots)
- Aide à **l'assemblage et à l'annotation** de génomes "drafts"

Et chez les eucaryotes ?

Un objectif central : améliorer l'annotation



Ureta-Vidal A *et al.* 2003. Nature Reviews. 4:251-262.

Les enjeux clés :

- La détermination de la structure des gènes
- La définition de régions synténiques
- La prédiction des éléments cis-régulateurs

Les spécificités :

- les séquences répétées (50 % du génome humain)
- les grandes duplications de segments chromosomiques (5 % du génome humain)
- les alignements pré-calculés avec des outils spécifiques et un génome de référence

Alignement de génomes : les besoins.

Des logiciels « récents », des besoins nombreux :

1. Amélioration des logiciels capables d'aligner deux génomes : **bases statistiques rigoureuses**
2. Mise au point de logiciels capables de réaliser de **l'alignement multi-génomes**
3. Mise au point d'outils de **visualisation des alignements** à l'échelle des génomes
4. Définition de **jeux de données de tests et de validations** des algorithmes

Miller. 2001. *Bioinformatics*. **17**:391-397

Un changement d'échelle

Du gène/de la protéine au génome :

- **Nombreux outils existants pour aligner deux gènes ou deux protéines :**

  Alignement par programmation dynamique (*Needleman & Wunsch, 1970),* **FASTA** *(Pearson & Lipman, 1988),* **BLAST** (Altschul & al. 1990), etc…

- **Ces outils ne fonctionnent pas ou mal à l'échelle d'un génome**

  - Les temps de calcul sont prohibitifs
  - Les alignements de génomes complets nécessitent des outils dédiés qui tiennent compte de certaines spécificités : les répétitions, les grandes insertions/délétions, les réarrangements.

Les principes de base

- **Concerne des génomes “proches” (sinon approches protéiques)**

- **Changement d'échelle**
  - Techniques classiques d'alignement de protéines pas applicables
  - Utilisation des techniques issues de l'algorithmique du texte
  - Principe de l’ancrage : détection de matchs exacts ou inexacts.

- **Différents types d'outils**
  - Alignement global ou local.
  - Alignement 2 à 2 ou multiple.
  - Génomes réarrangés ou non.
  - Génome de référence ou non

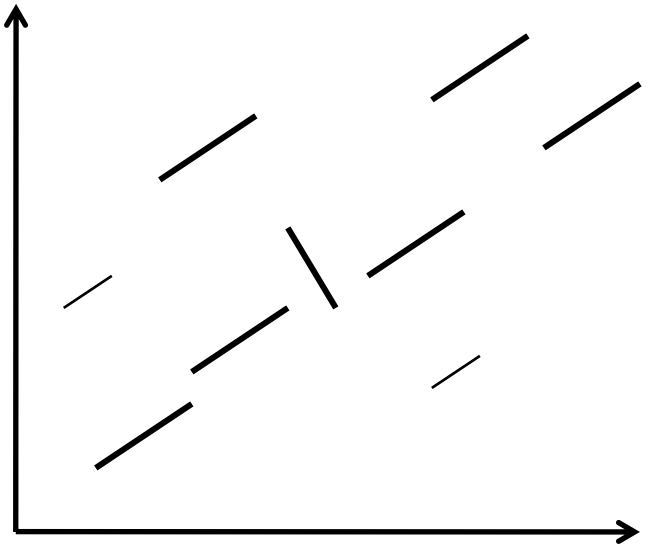
Alignement local de génomes

But : trouver les régions similaires dans deux séquences quels que soient l'ordre et la position de ces similarités

- Permet d'identifier des réarrangements locaux, des duplications
- Permet d'aligner des génomes en cours de séquençage

En général 3 étapes :

1. Détection de 'matchs' (graines)
2. "Clustering" des graines voisines
3. Extension sans et avec gap.



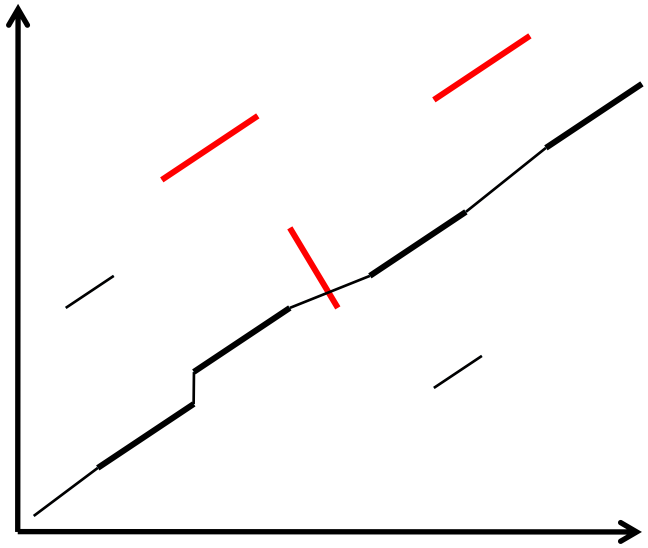
Alignement global de génomes

But : aligner au mieux les génomes sur la totalité de leur longueur

- Certains algorithmes détectent les réarrangements
- En général, pas adapté aux génomes en cours de séquençage

En général trois étapes

1. Détection de matchs
2. **Ancrage et chainage des matchs**
3. Traitement des régions entre les matchs



Outils d'alignement de deux génomes

Quelques exemple d'outils

Logiciel	Référence	Principe	URL + Distribution
Mummer 1	*Delcher et al., 1999*	**Alignement global** par recherche de MUMs (Maximal Unique Matches).	**http://www.tigr.org/software/mummer/** **Programme + serveur Web**
Blastz/ PipMaker	*Schwartz et al., 2000*	**Alignement local** par une adaptation de Gapped BLAST.	**http://bio.cse.psu.edu/pipmaker** **Seveur Web**
Avid	*Bray et al. 2003*	**Alignement global** par programmation dynamique.	**http://glass.lcs.mit.edu/** **Programme**
YASS	*Noé. et al, 2005*	**Alignement local** basé sur des graines inexactes	**http://loria.fr/projects/YASS** **Programme + serveur Web**
Mauve Contig Mover	*Rissman et al., 2009*	**Alignement global** d'un génome draft sur un génome de référence	**http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve** **Programme java**
YOC	*Uricaru et al., 2015*	Alignement global à partir du chainage d'alignements locaux YASS	**https://github.com/ruricaru/YOC** **Programme**

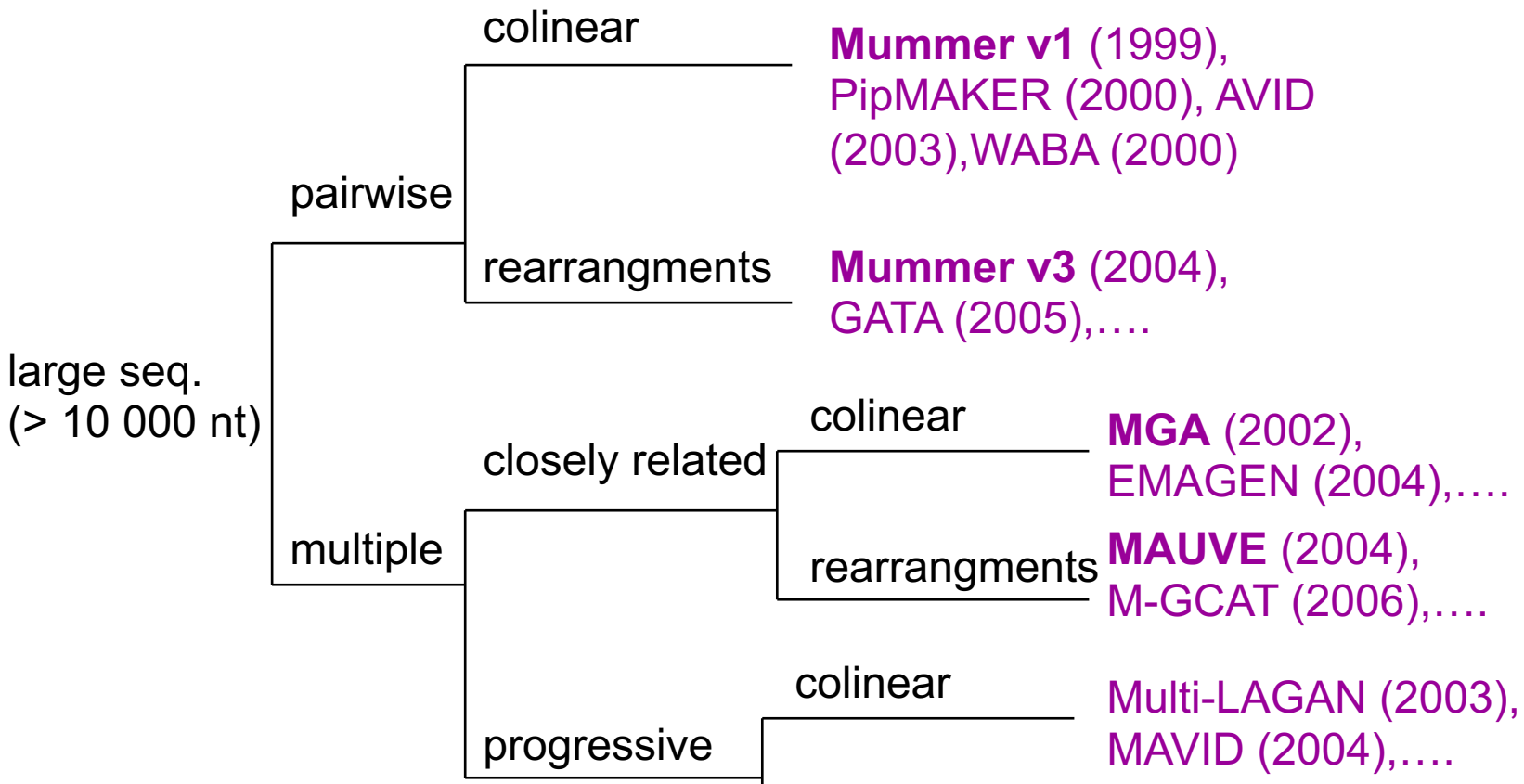
Outils d'alignement multi-génomes

Quelques exemple d'outils

Logiciel	Référence	Principe	URL + distribution
Mummer 2 et 3	*Delcher et al., 2002, Kurtz et al., 2004*	**Alignement global** par recherche de MUMs (Maximal Unique Matches)	**http://www.tigr.org/software/mummer/ Programme + serveur Web**
MGA	*Höhl et al., 2002*	**Alignement global** par recherche de MEMs (Maximal Exact Matches)	**http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/mga/ Programme**
LAGAN/multiLAGAN/ ShuffleLAGAN	*Brudno et al., 2003*	**Alignement global** par recherche récursive de matchs dégénérés	**http://lagan.stanford.edu/lagan_web/index.shtml Programme + serveur Web**
MAUVE	*Darling et al. 2004*	**Alignement global** par recherche de MUMs et LCBs	**http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve Programme java**
ProgressiveMAUVE	*Darling et al., 2010*	**Alignement global** par recherche de matchs	**http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve Programme java**
MUGSY	*Angiuoli et al., 2011*	**Alignement global** basé sur alignements locaux Mummer	**http://mugsy.sf.net Programme**
ParSNP	*Treangen et al., 2014*	**Alignement global** basé sur des multiMUMs et LCBs	**http://harvest.readthedocs.io/en/latest/content/parsnp.html Programme**

Classification des outils d'alignement de génomes*

Comment distinguer les outils ?



*d'après **Treangen *et al.* 2006.** BMC Bioinformatics.

Partie 2. les outils de calcul de distance génomique

Pourquoi évaluer la distance entre génomes ?

- « *Big data* » : nécessite tri et construction de jeux de données, surtout chez les procaryotes
- Evaluation rapide de la distance évolutive entre deux génomes (concept d'espèce chez les procaryotes)
- Choix d'une stratégie de comparaison adaptée à une échelle évolutive

Comment évaluer la distance entre génomes ?

Deux grands types d'approche

1. Les approches basées sur des alignements préalables
2. Les approches basées sur les k-mers

L'ANI : Average Nucleotide Identity

- Le pourcentage d'identité nucléotidique moyen calculé à partir des gènes communs entre 2 génomes
- Nécessite un pré-calcul d'alignements (Blast,..) entre une paire de génomes
- Est un moyen robuste de comparer les distances génétiques entre souches bactériennes

Konstantinos T. Konstantinidis, and James M. Tiedje PNAS 2005;102:7:2567-2572

L'ANI : Average Nucleotide Identity

ANI [0,1]

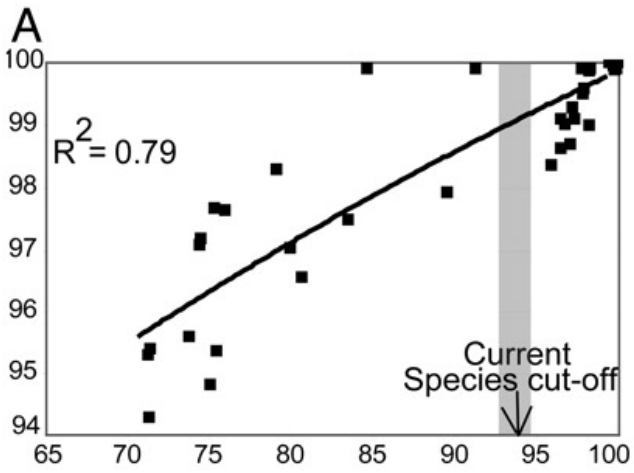
$$ANI = \frac{\sum_{aligned\_regions} ident_{percent} x\ region\_length}{Length\ of\ reference\ genome}$$

Peut se calculer à partir de **deux types de régions alignées** :

- Les **régions codantes conservées identifiés par Blast** => **ANI_b**
- Les **régions nucléiques conservées identifiées par Mummer** => **ANI_m**

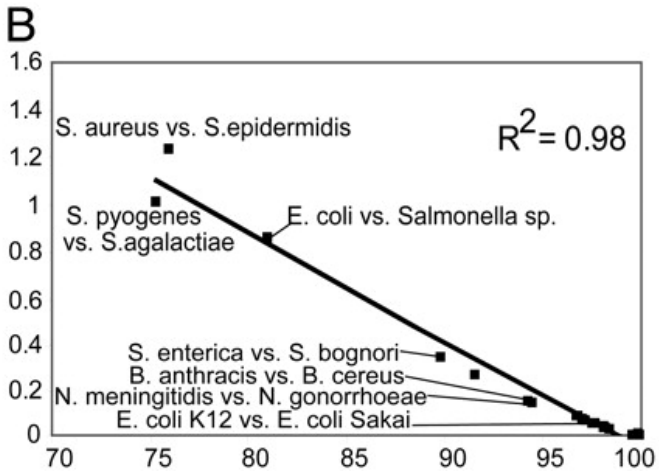
Richter & Rossello. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition . PNAS 2009

L'ANI corréle bien avec les distances évolutives



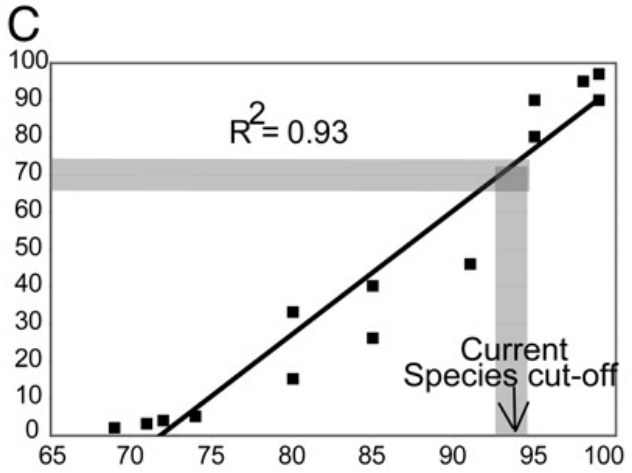
Comparaison ANI – % id ARN 16S

ANI can resolve areas where the 16S rRNA gene is inadequate, such as the species level



Comparaison ANI – Taux moyen de substitution synonymes

ANI may also be a useful descriptor of the evolutionary distance, in addition to genetic distance



Comparaison ANI – Valeurs association ADN-ADN

Strains that show >94% ANI should belong to the same species, according to the DNA–DNA reassociation standard

Konstantinos T. Konstantinidis, and James M. Tiedje
PNAS 2005;102:7:2567-2572

L'ANI en pratique

Permet d'évaluer rapidement les distances évolutives entre génomes dans un jeu de données à analyser

L'ANIm permet de s'affranchir de l'annotation des gènes

Chez les bactéries : ANI > 0.95 => même espèce

Attention à regarder deux résultats dans l'ANI

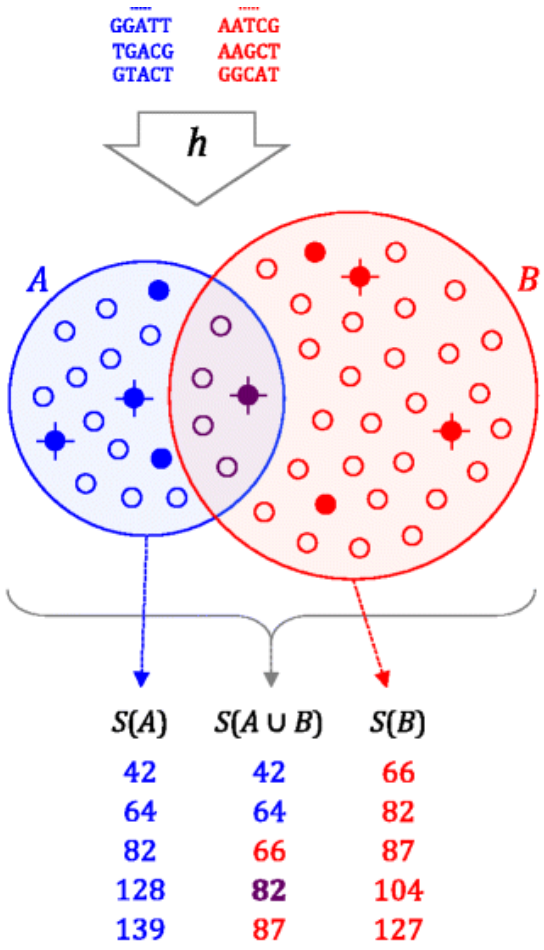
- La **couverture de l'alignement** utilisée pour le calcul de l'ANI
- La valeur de l'ANI.

Konstantinidis T. et Tiedje PNAS 2005
Richter et Rossello-Mora PNAS 2009

La distance Mash

- Une mesure de distance entre génomes

- Stratégie **sans alignement** basée sur la comparaison du **contenu en kmers** de 2 séquences

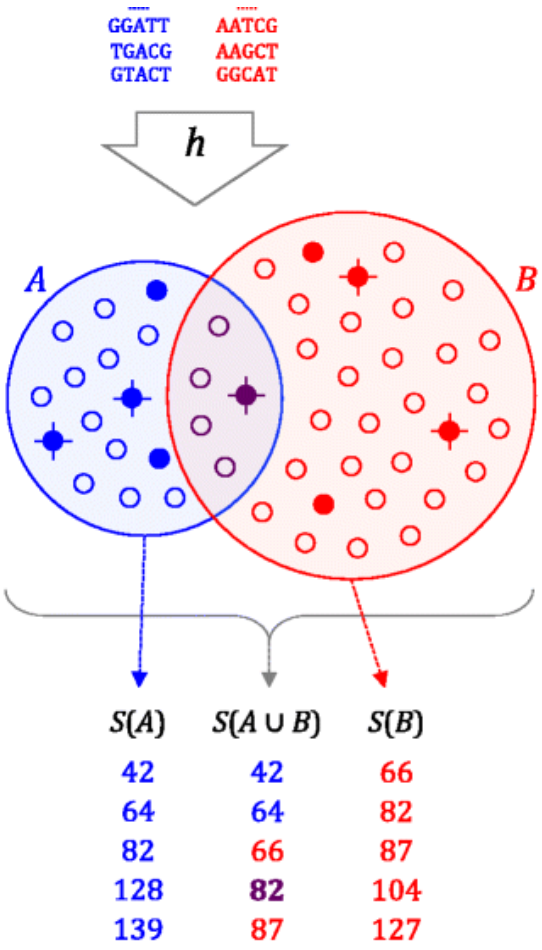


$$J(A,B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \approx \frac{|S(A \cup B) \cap S(A) \cap S(B)|}{|S(A \cup B)|}$$

Ondov et al. Genome Biology 2016
https://github.com/marbl/mash

Les 2 étapes de Mash

- Sketch : conversion d'une ou plusieurs séquences en collection de k-mers
- Dist : compare 2 sketchs et retourne
  - une **estimation de l'indice de Jaccard** (i.e. la fraction de k-mers partagés),
  - une **p-valeur :** évalue la significativité de la distance Mash
  - la **distance Mash** (taux de mutation estimé sous un modèle d'évolution simple)



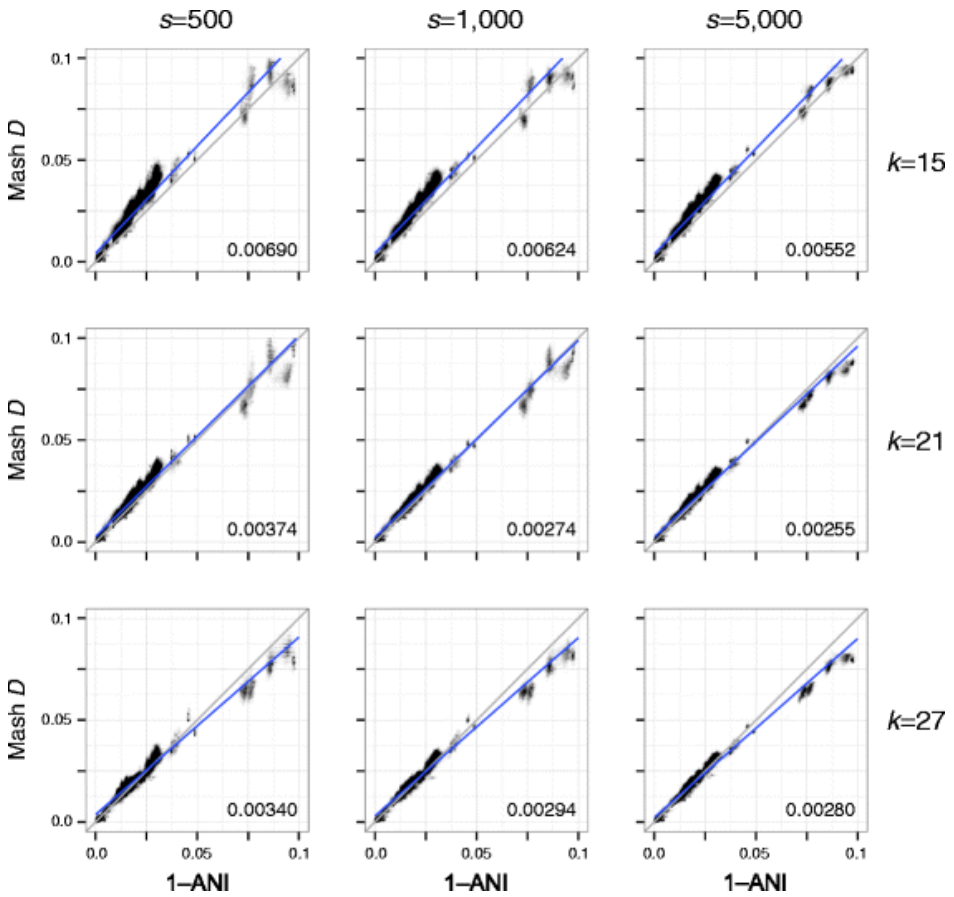
$$J(A,B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \approx \frac{|S(A \cup B) \cap S(A) \cap S(B)|}{|S(A \cup B)|}$$

Ondov et al. Genome Biology 2016

https://github.com/marbl/mash

La distance Mash

- Est bien corrélée à l'ANI
- Est très rapide à calculer (passe à l'échelle)
- Limite d'utilisation : génomes proches (l'ANI ne travaille que sur le core génome)



Relation entre ANI et distance Mash pour 3 jeux de données de génomes *d'E. coli* et 3 tailles de k

Ondov et al. Genome Biology 2016

https://github.com/marbl/mash

Mummer

- **Alignement d'un génome de référence avec n génomes proches**
- **Principe de l'ancrage** : détection de MUMs (Maximal Unique Matches) ou MEMs (Maximal Exact Matches)
- Utilisation de technique issues de **l'algorithmique du texte** (arbre des suffixes)
- **Outil modulaire & Open Source** (3 versions) avec outils de visualisation graphique

Delcher& al. 1999, 2002, Kurtz & al. 2004
http://www.tigr.org/software/mummer

Les programmes de Mummer

http://www.tigr.org/software/mummer/manual

Mummer est une suite logicielle avec différents outils de :

- **Maximal Exact Matching** :

mummer, repeat-match, exact-tandems

- **Clustering :**

gaps (sans réarrangement), mgaps (avec réarrangement)

- **Alignment generators (pairwise):**

  NUCmer (mummer+mgaps), PROmer (en protéine), run-mummer1 (sans réarrangement), run-mummer3 (avec réarrangement)

- **Utilities :**

  MapView, **mummerplot,** show-aligns, show-coords , show-tiling.

L'algorithme de Mummer1

Quatre grandes étapes :

1. **Recherche des MUMs** : Maximal Uniques Matches

2. **Tri des MUMs :** recherche du plus long ensemble de MUMs dans le même ordre sur les 2 génomes

3. **Fermeture des gaps** en effectuant une recherche locale des grandes insertions, répétitions, régions divergentes, répétitions en tandem et SNPs.

4. **Sortie de l'alignement** incluant les MUMs et les alignements des régions dans les gaps.

Delcher *et al.* 1999. NAR.

Etape 1 : la recherche des MUMs

Mummer

Un MUM (Maximal Unique Match) :

- Est présent exactement une fois sur les génomes A et B
- N'est pas inclus dans un MUM plus long

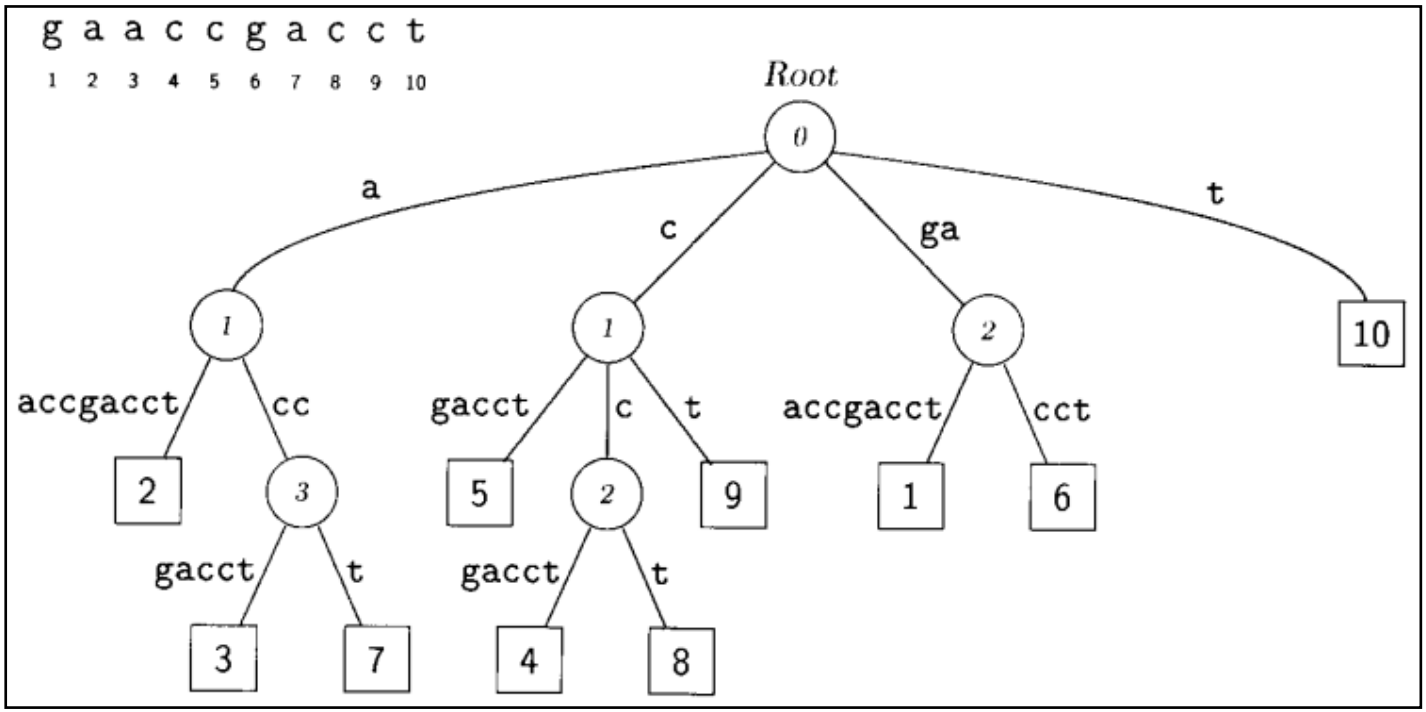
Un MUM « suffisamment long » est forcément inclus dans l'alignement global des génomes.

Figure extraite de Delcher *et al.* 1999. NAR.

L'arbre des suffixes

Mummer

Principe : les MUMs sont identifiés en construisant **un arbre des suffixes** des génomes A et B.



- **Chaque nœud interne (circulaire)** représente une séquence répétée (label=long. seq.)
- **Chaque feuille (carré)** représente un suffixe complet (label=position)

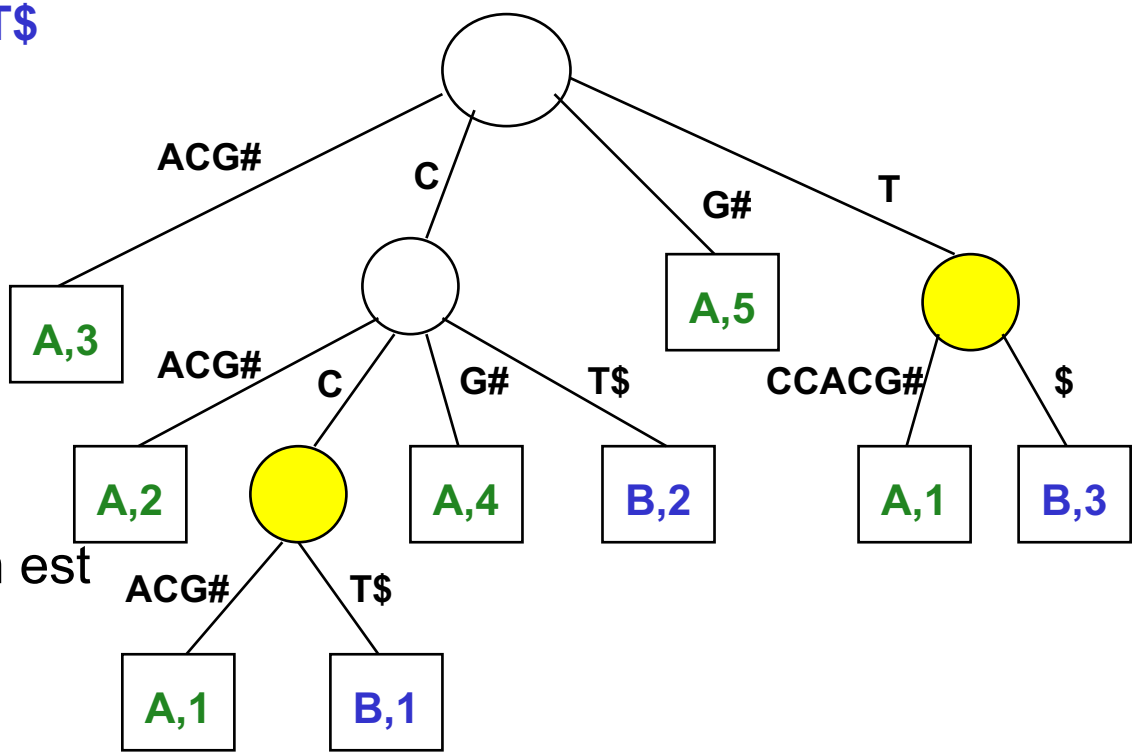
Figure extraite de Delcher *et al.* 1999. NAR.

L'arbre des suffixes et les MUMs

Mummer

Sequence A = TCCACG#

Sequence B =CCT$



- **Un Match Unique** est sur un nœud interne avec deux feuilles de chaque génome A et B

- **Un Match Unique est Maximal** (MUM)si le caractère avant le match est différent sur chaque génome.

Mummer

Des propriétés intéressantes :

- Les arbres des suffixes peuvent être construits en un temps linéaire de la longueur des génomes

- Ils permettent d'identifier des MUMs en un temps linéaire de la taille des MUMs (une lecture de l'arbre)

- Le principal paramètre à choisir est la longueur minimale des MUMs à détecter (20 à 50 pb).

Etape 2: le tri des MUMs

Mummer

- **Tri des MUMs** en fonction de leur position sur le génome A

- Recherche du plus long ensemble de MUMs ordonné sur les génomes A et B (**algorithme LIS : L**onguest **I**ncreasing **S**ubsequence, modifié pour tenir compte de la longueur des MUMs et du chevauchement).

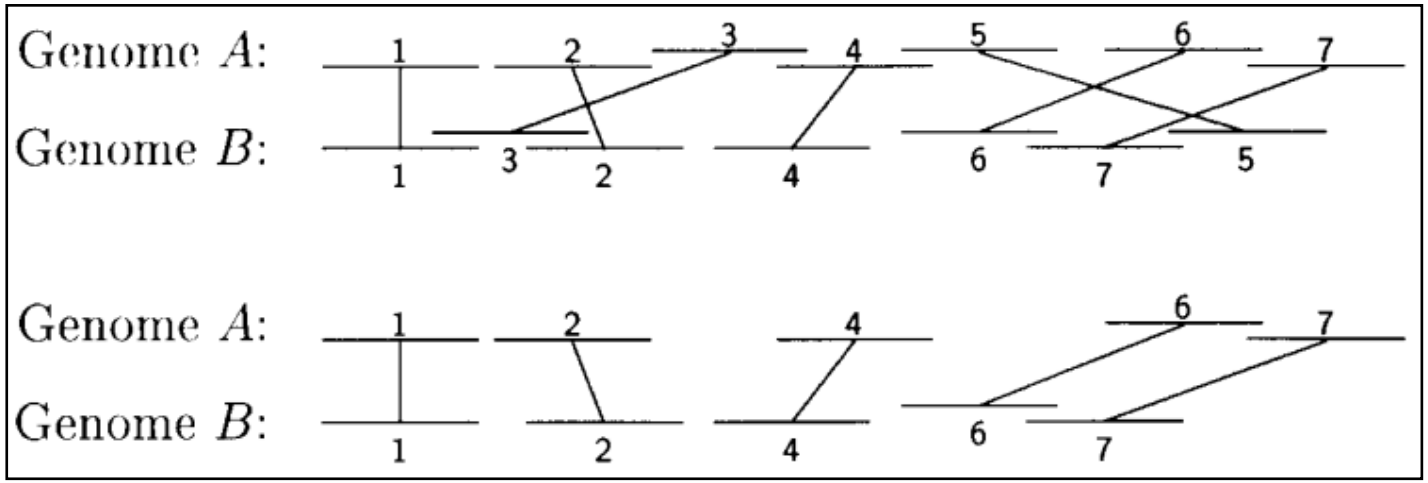


Figure extraite de Delcher *et al.* 1999. NAR.

Etape 3 : fermeture des gaps

Mummer

Les quatre types de gaps après la recherche des MUMs

1. SNP: exactly one base (indicated by ^) differs between the two sequences. It is surrounded by exact-match sequence.

```
Genome A:  cgtcatgggcgttcgtcgttg
Genome B:  cgtcatgggcattcgtcgttg
                      ^
```

2. Insertion: a sequence that occurs in one genome but not the other.

```
Genome A:  cggggtaaccgc..................cctggtcggg
Genome B:  cggggtaaccgcgttgctcggggtaaccgccctggtcggg
                     ^^^^^^^^^^^^^^^^^^
```

3. Highly polymorphic region: many mutations in a short region.

```
Genome A:  ccgcctcgcctgg.gctggcgcccgctc
Genome B:  ccgcctcgccagttgaccgcgcccgctc
                  ^ ^^ ^^^
```

4. Repeat sequence: the repeat is shown in uppercase. Note that the first copy of the repeat in Genome *B* is imperfect, containing one mismatch to the other three identical copies.

```
Genome A:  cTGGGTGGGACAACGTaaaaaaaaaTGGGTGGGACAACGTc
Genome B:  aTGGGTGGGGCgACGTgggggggggTGGGTGGGACAACGTa
           ^          ^                           ^
```

Figure extraite de Delcher *et al.* 1999. NAR.

Etape 3 : fermeture des gaps

Mummer

SNPs

- soit entre deux MUMs (simple)
- soit traités comme des répétitions

Insertions

- soit des transpositions
- soit des vraies insertions

=> elles n'apparaissent pas dans l'alignement

Régions polymorphiques

- si courtes : alignées par programmation dynamique
- si longues : recherche récursive de MUMs de taille inférieure

Répétitions

- détectées par MUMs chevauchants

=> elles n'apparaissent pas dans l'alignement (choix de l'occurrence conservée en position dans les deux génomes)

Exemple de résultat

Mummer

- ***FASTA :***

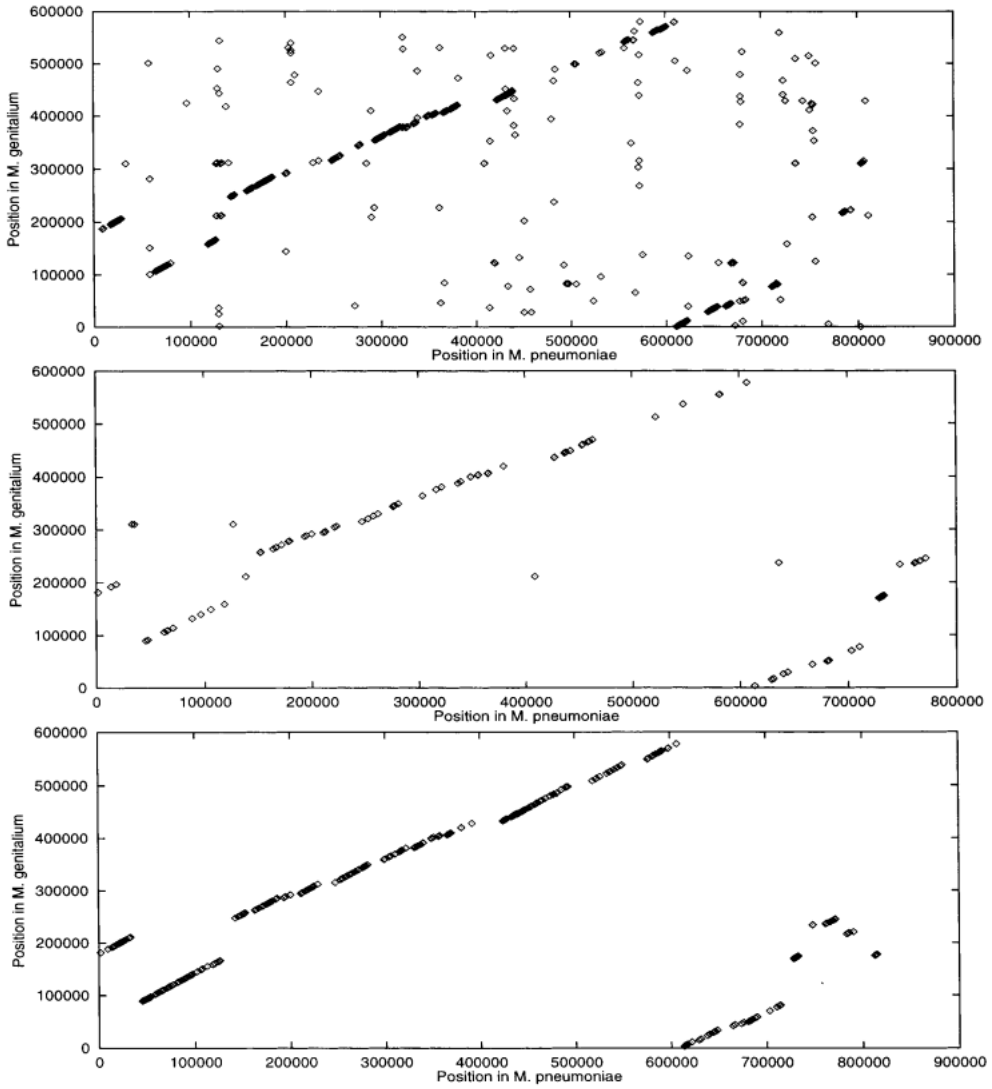
Segments 1000pb > 50 % id. sur 80 % de longueur.

- ***25-mers* uniques**

(MUMs de taille fixe)

- ***MUMs de taille min 15 pb***

alignés avec Mummer



Mycoplasma genitalium* X *Mycoplasma pneumoniae

Figure extraite de Delcher *et al.* 1999. NAR.

BlastZ

Principe

- Calcule des **alignements locaux** entre 2 génomes
- Utilisé et validé pour l'alignement des génomes homme/souris
- Variante du programme GappedBLAST (*Altschul et al., 1997*) qui comporte 3 étapes :
  - Recherche des matchs exacts (ou quasi exacts)
  - Extension des matchs sans permettre de gaps
  - Alignement final étendu par programmation dynamique avec gaps permis

Schwartz et al., 2000 & 2003

http://bio.cse.psu.edu/

Principe de l'algorithme

BlastZ

Les 5 étapes principales

1. **On élimine les séquences répétées spécifiques à chaque espèce**
2. **Pour toutes les paires de 12-mers identiques (au max à 1 transition près)**
   i. **Extension de l'alignement** dans les 2 directions sans gap jusqu'à score chute en dessous d'un seuil S (par exemple 3000).
   ii. **Si score alignement > 3000**
      - Répéter l'étape d'extensions (i) mais cette fois-ci avec gaps
      - Retenir l'alignement si score >5000
3. **Répéter l'étape 2 avec un ancrage plus sensible (par exemple 7-mers identiques) et un score plus bas pour les 2 types d'alignements (par ex 2000)**
4. **Ajustement des positions des alignements en fonction de l'étape 1**
5. **Filtrage des alignements en fonction de l'objectif**

Quelques particularités

BlastZ

- **Algorithme**
  - Il existe une option pour **détecter les régions identiques dans le même ordre et la même orientation** sur les deux génomes
  - Utilisation d'un **score d'alignement adapté aux génomes complets** (tient compte de la complexité de la séquence)
- **Performances**
  - **Masquage automatique de régions répétées** sur le premier génome
  - **Passage des 8-mer aux 19-mers** dont 12 positions sont identiques à une transition près.

BlastZ

Alignement génomes Souris/Homme

- **Une grande spécificité. Par exemple, si score seuil=3000 :**
  - 39 % génome H s'aligne avec génome S
  - 0,164 % génome H s'aligne avec génome S rev/comp

- **Validation biologique : analyse détaillée du K20 H (homologue au K2 S)**

  40,5 % du K20 de H est aligné avec K2 S dont
  - 98,5 % des CDS
  - 87,1 % des 3'UTR
  - 89,0 % des 5'UTR

Schwartz et al.,2003

MultiZ

- Généralisation de BlastZ
- L'algorithme **TBA** (pour "threaded blockset aligner") construit un alignement multiple en se basant sur des "blocs" présents dans le même ordre et la même orientation dans les séquences comparées
- Ne tient pas compte des inversions ou duplications mais peut détecter des matchs communs à un sous-ensemble de séquences.
- Permet de construire un alignement multiple global.

Blanchette et al., Gen. Res. 2004

YASS

Le principe :

- Calcule des **alignements locaux** entre 2 génomes
- **Principe** : comme tous les outils d'alignement nucléique local basé sur une **heuristique** (BLAST, FASTA, PATTERNHUNTER, BLASTZ ...), YASS procède en 2 étapes :

  1. recherche utilise des graines pour détecter des régions potentiellement similaires

  2. extension des régions contenant des graines pour générer des régions alignées avec insertions/délétions

- **Une interface Web** permet de lancer YASS et de générer différents types de sortie: fichiers textes dans différents formats, fichiers graphiques (**dotplot**)

Noé et Krucherov, 2005

http://bioinfo.lifl.fr/yass/

Quelques spécificités

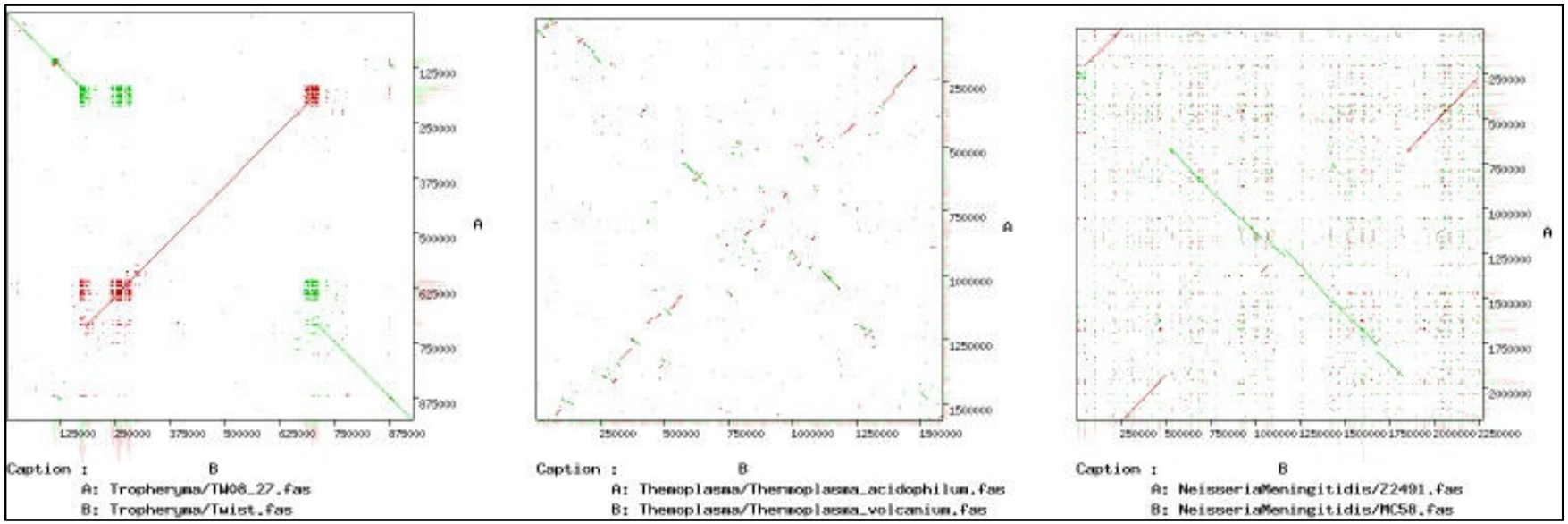
YASS

- Utilise une **famille de graines**, possiblement chevauchantes et un critère de nouveau hit assurant un bon ratio sensibilité/sélectivité.
- **Les graines espacées** utilisées tiennent compte des transitions et améliorent la sensibilité (les transitions sont des mutations purine/ purine [A<->G] or pyrimidine/pyrimidine [C<->T])
- Utilise différents **scores et une « e-value** » pour évaluer la pertinence des alignements
- Un **filtre paramétrable** existe pour les répétitions de faible complexité.
- Plusieurs **paramètres statistiques** d'alignement produits (biais de mutations des triplets, rapport transition/transversion,..)
- Étape de **post-traitement** pour grouper les alignements avec des gaps.

http://bioinfo.lifl.fr/yass/

YASS

- **En entrée :** 2 fichiers fasta ou multifasta.
- **En sortie : Fichiers textes ou dotplot / conversion au format alignement blast.**
- **Paramètres principaux :** -r (indique si séquence en réverse ou non), -d (format de sortie), -o (fichier de sortie), -S (si 1ère sequence en multifasta).



Exemples de dotplots générés avec YASS

Alignement multiple : les outils MAUVE

MAUVE 1 et 2

Principe :

- **Alignement multiple de génomes : un des premiers algorithme qui traite les réarrangements (avec ShuffleLAGAN)**
- **Principe de l'ancrage** : initialement avec des MUMs (Maximal Unique Matches) puis avec des graines inexactes
- **Identification de blocs colinéaires = LCBs (Locally Colinear Blocks)**
- **Interface graphique + ligne de commande**

Darling A. *et al*, *Genome Research* 2004
http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve

Le principe de la méthode

MAUVE 1 et 2

Quatre étapes principales

1. **Recherche des alignements locaux** (multiMUMs)

2. **Calcul d'un arbre phylogénétique** basé sur les multiMUMs

3. **Ancrage :**
   - **identification des LCBs (Locally Colinear Blocks)** en utilisant les multiMUMs présents sur tous les génomes
   - **Ancrage récursif** pour identifier les ancres supplémentaires entre les LCBs et à l'intérieur des LCBs

4. **Alignement multiple progressif (clustalw) des régions entre les ancres** en utilisant l'arbre de l'étape 2.

MAUVE 1 et 2

- **Méthode de hachage (« seed and extend algorithm»)**
  - construction d'une liste triée de k-mers pour chaque génome,
  - identification des « seed » = matchs présents dans au moins 2 génomes en 1 occurrence,
  - extension des matchs jusqu'à ce qu'un mismatch apparaisse dans un des génomes.

- **Détecte les multiMUMs de taille min. *k* :**
  - directs et réverse/complémentaires
  - communs à tous les génomes
  - communs à un sous-ensemble de génomes

- **Complexité en temps :** $O(G^2n+GnlogGn)$, G=nombre de génomes, n=longueur du plus grand génome.

2. Calcul d'un arbre phylogénétique

MAUVE 1 et 2

• **Technique du Neighbor-joining** (Saitou and Nei, 1987) appliquée aux multiMUMs communs à un sous-ensemble de génomes.

• **Distance calculée entre tous les couples de génomes G_1,G_2 :**

$$d(G_1,G_2) = 1 - \frac{\sum long(multiMUMsNonChevauchantsG_1G_2)}{LongMoyGénomeG_1G_2}$$

• **Le problème des matchs chevauchants est résolu en gardant ceux de multiplicité maximale.**

• **Résultat : arbre guide non enraciné.**

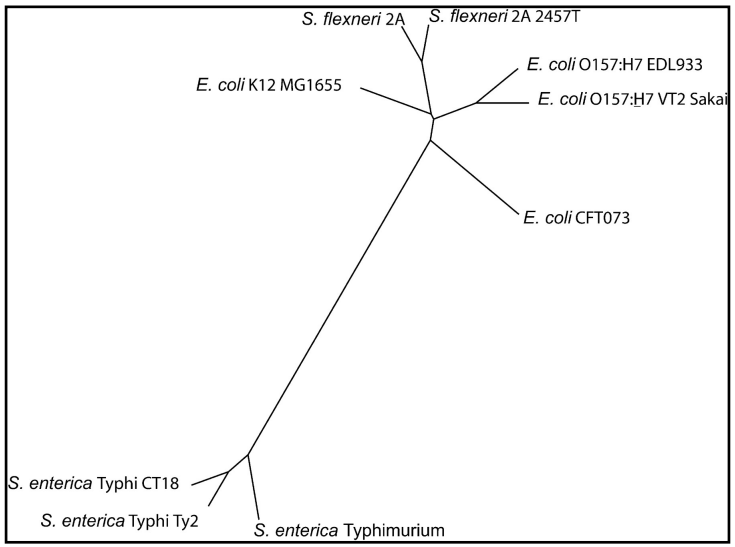


Figure extraite de Darling *et al.* 2004. Gen. Res.

3. Ancrage : identification des LCBs.

MAUVE 1 et 2

- **Recherche des LCB = Locally Colinear Block :** ensemble de multiMUMs colinéaires sur tous les génomes comparés.

- **Algorithme utilisé pour passer des multiMUMs aux LCBs (partionnement minimum) : « breakpoint elimination »**

  - **basé sur un poids affecté à chaque LCB** (somme des tailles des multiMUMs inclus dans chaque LCB)

  - **principe :** en supprimant des LCBs de faible poids, on supprime des points de rupture pour obtenir une **partition minimale**

  - **par défaut, le poids minimum d'un LCB est de 3k,** où k est la taille initiale des graines.

Les étapes en images

MAUVE 1 et 2

1. Détection des multiMUMS

2. Partitionnement en LCBs

3. Elimination des points de rupture (LCBs de faible poids)

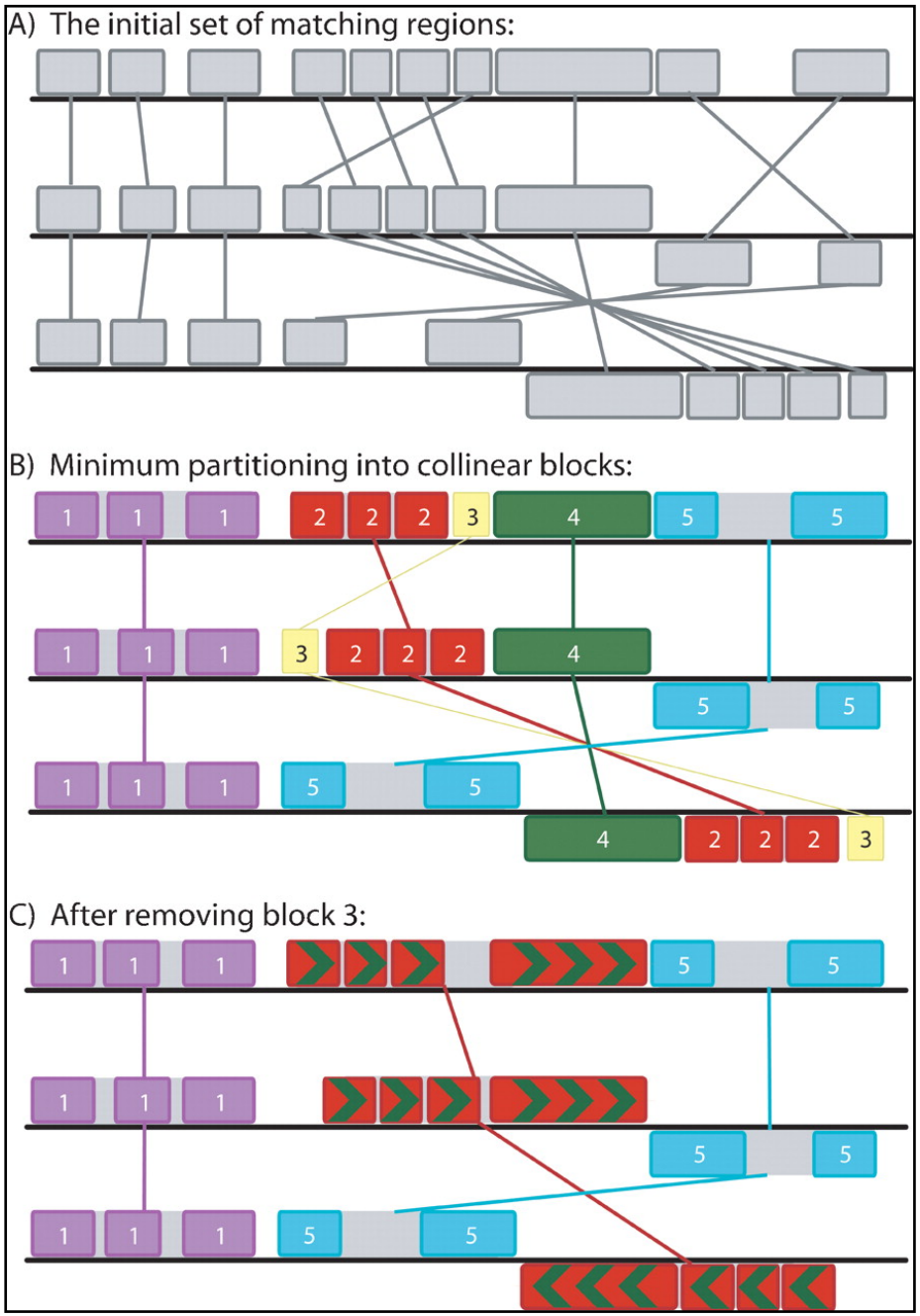


Figure extraite de Darling *et al.* 2004. Gen. Res.

MAUVE 1 et 2

- **Augmente la sensibilité** (cas des régions polymorphes, des répétitions).

- **Deux types recherches récursives traitent :**

  - **les régions entre les LCBs :** même algorithme avec une valeur de *k* plus faible et en levant le critère d'unicité sur l'ensemble du génome (unicité uniquement dans l'intervalle de recherche)

$$k = seed\_size(S) - 2 \qquad seed\_size(S) = \log_2\left(\sum_{j=1}^{G} \frac{length(S_j)}{G}\right)$$

  - **les régions entre les multiMUMs d'un LCB :** calcul du paramètre k en fonction de la longueur de la séquence S du gap à traiter, arrêt de la recherche si plus d'ancre nouvelle ou séquence restante<200pb.

$$k = seed\_size(S)$$

MAUVE 1 et 2

Algorithme : clustalw (Thompson et al., 1994)

- Programmation dynamique progressive
- Utilise l'arbre phylogénétique calculé à l'étape 1. Chaque étape aligne deux alignements ou séquences en suivant l'ordre de branchement dans l'arbre.
- Permet d'aligner les régions entre les ancres (si < 10 kb)

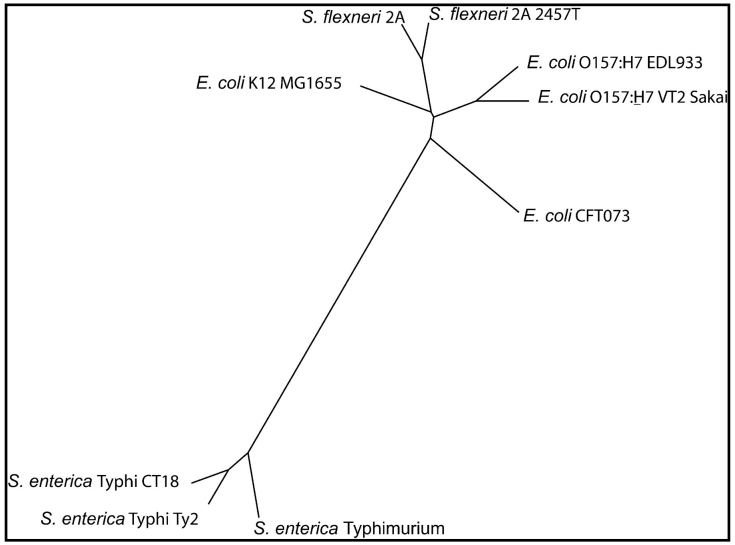


Figure extraite de Darling *et al.* 2004. Gen. Res.

Un exemple de résultat

MAUVE 1 et 2

- **9 génomes d'entérobactéries**

- **environ 3 heures de calcul (PC, 2.4 GHz, 1 Go de mémoire)**

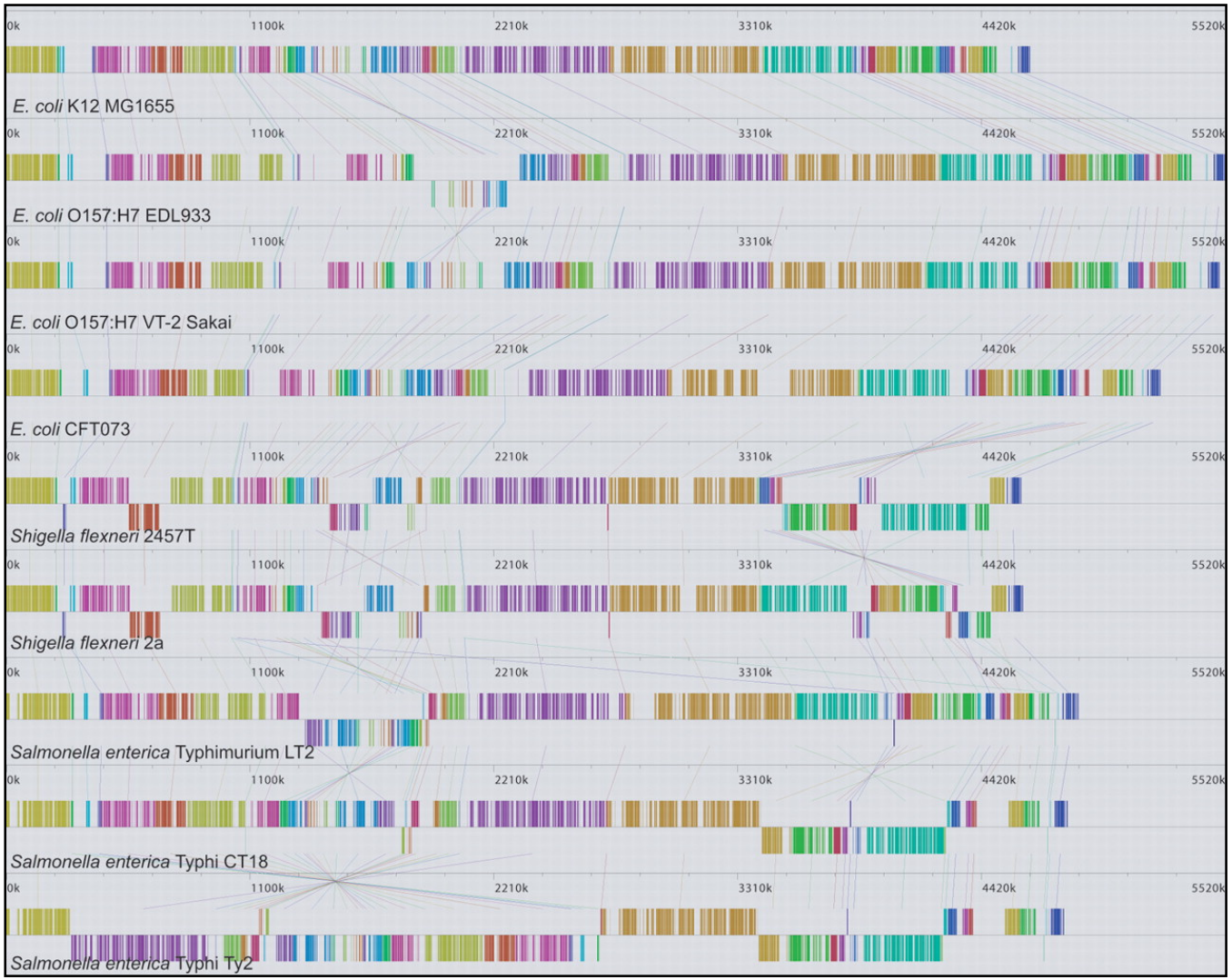


Figure extraite de Darling *et al.* 2004. Gen. Res.

Exemple de résultats

MAUVE 1 et 2

Alignement des 9 génomes d'entérobactéries :

- **45 LCBs de poids minimum 69**
- **définition d'un squelette :**
  - régions de l'alignement sans gap de plus de 50 nt sur aucun génome
  - taille = 2.86 Mb (1252 segments)
    soit 58% de couverture moyenne

Mauve : les limitations des premières versions

MAUVE 1 et 2

• **Mauve cible les comparaisons de génomes proches :** les souches d'une même espèce ou organismes très proches (comme *E. coli et Salmonella ou Y. pestis)*.

• **Le poids minimum des LCB** est un paramètre déterminant qui doit être souvent réglé manuellement pour une estimation correcte des réarrangements génomiques.

• Mauve n'est pas capable d'aligner des génomes contenant **de grandes quantités de duplications.**

• Les alignements produits par Mauve contiennent des "spurious matchs" et des alignements erronés

• Les grandes régions chromosomiques partagées uniquement par un sous-groupe d'organismes ne sont pas alignées

ProgressiveMAUVE

Le principe

- **Nouvel algorithme d'alignement permettant d'aligner les régions conservées uniquement dans un sous groupe de séquences**
- **Trois innovations principales dans l'algorithme :**

  (1) Un nouveau score d'alignement a été créé => ceci permet la détection précise des positions de réarrangements quand les génomes ont un contenu en gènes très différents
  (2) Une heuristique « glouton » permet d'optimiser l'ensemble d'ancres choisi en se basant sur le score calculé en (1)
  (3) Un modèle de Markov caché (HMM) permet d'éliminer les alignements erronés du résultat final (méthode de Treangen *et al*., 2008).

- **Méthode plus robuste pour traiter les génomes plus divergents ou ayant subi de multiples réarrangements, insertions/délétions et répétitions**

Darling A. *et al*, *PLOSone 2010*
http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve

ProgressiveMAUVE

Avantages

- Peut être appliqué à un plus grand nombre de génomes que Mauve
- Peut aligner des génomes plus divergents (en principe jusqu'à 50 % d'identité)
- En général ne nécessite pas d'ajustement de paramètres.
- Permet de générer le *pan-génome*, e.g. les régions conservées entre un sous-ensemble de génomes
- Est plus précis que l'algorithme Mauve

Limitations

- Plus lent que l'algorithme initial de Mauve
- Consomme plus de mémoire que l'algorithme initial de Mauve

Darling A. *et al*, *PLOSone 2010*
http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve

Exemple d'application 1

Reconstruction de l'histoire evolutive des réarrangements

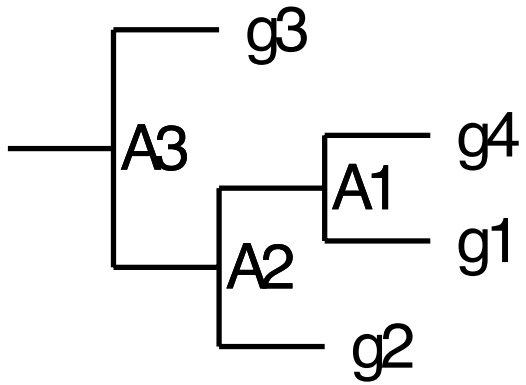
Le principe

- **Générer la matrice de l'option –permutation-matrix de Mauve** pour produire le fichier contenant l'ordre et le sens d'apparition de chaque LCB dans chaque génome alignée

- **Utiliser cette matrice pour reconstruire l'arbre phylogénétique des réarrangements, y compris pour les séquences ancestrales (nœuds internes)**

```
1   2   3   4   5   6
1   2   3  -6  -5  -4
2   3  -6  -5  -4   1
2   1   3   4   5   6
```

Exemple d'outil : MLGO (Maximum Likehood for Gene Order Analysis)
Hu. *et al*, *Bioinformatics 2014*




```
>A1
-6 -5 -4 -3 -2 -1 $
>A2
1 2 3 -6 -5 -4 $
```

Exemple d'application 2

Mauve Contig Mover (MCM) : ordonner les contigs d'un génome

Le principe

- **MCM est une adaptation de ProgressiveMauve pour les génomes drafts constitués de contigs (454, Solexa,…)**
- **Principe :** utiliser un génome de référence (organisation la plus proche possible) pour ordonner les contigs en utilisant un algorithme itératif basé sur des alignements Mauve de contigs

  (1) **Processus itératif :** les contigs sont alignés itérativement sur le génome de référence en minimisant le nombre total de blocs colinéaires (LCBs)
  (2) MCM s'arrête quand l'ordre des contigs entre 2 itérations ne varie plus.

- **Résultat : un fichier fasta des contigs réordonnés** et réorientés par rapport au génome de référence et **une liste des contigs** (i) ordonnés sur la référence et (ii) contenant des LCBs (« Conflicting Order Information » i.e. réarrangement, mauvais assemblage,…**)**

Rissman. *et al*, *Bioinformatics 2009*
http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve

Partie 4 : les formats d'alignement de génomes

- Pas de standart

- Beaucoup de formats propriétaires (mummer, mauve, mugsy gingr, …) en lien avec outils de visualisation et volumétrie

- Deux formats beaucoup utilisés : **XMFA et MAF**.

Le format XMFA

- A l'origine lié au logiciel Mauve
- Généralisation du format multi-fasta
- Format qui inclut l'alignement complet explicite des blocs colinéaires

Exemple :

```
>seq_num:start1-end1 ± comments (sequence name, etc.)
AC-TG-NAC--TG
AC-TG-NACTGTG
...

> seq_num:startN-endN ± comments (sequence name, etc.)
AC-TG-NAC--TG
AC-TG-NACTGTG
...
= comments, and optional field-value pairs, i.e. score=12345

> seq_num:start1-end1 ± comments (sequence name, etc.)
AC-TG-NAC--TG
AC-TG-NACTGTG
...
```

http://darlinglab.org/mauve/user-guide/files.html

Le format MAF

- Compatible avec plusieurs Genomes Viewers (IGV, GenomeView,…)
- Suite de blocs alignés avec lignes ‘a’ et ‘s’
- Ligne s inclut : id, start de l’alignt, taille de l’alignement sans gap, brin, taille de la séquence source et alignement

Exemple :

```
##maf version=1 scoring=tba.v8
 # tba.v8 (((human chimp) baboon) (mouse rat))
 # multiz.v7
 # maf_project.v5 _tba_right.maf3 mouse _tba_C
 # single_cov2.v4 single_cov2 /dev/stdin

 a score=23262.0
 s hg16.chr7    27578828 38 + 158545518 AAA-GGGAATGTTAACCAAATGA---ATTGTCTCTTACGGTG
 s panTro1.chr6 28741140 38 + 161576975 AAA-GGGAATGTTAACCAAATGA---ATTGTCTCTTACGGTG
 s baboon         116834 38 +   4622798 AAA-GGGAATGTTAACCAAATGA---GTTGTCTCTTATGGTG
 s mm4.chr6     53215344 38 + 151104725 -AATGGGAATGTTAAGCAAACGA---ATTGTCTCTCAGTGTG
 s rn3.chr4     81344243 40 + 187371129 -AA-GGGGATGCTAAGCCAATGAGTTGTTGTCTCTCAATGTG

 a score=5062.0
 s hg16.chr7    27699739 6 + 158545518 TAAAGA
 s panTro1.chr6 28862317 6 + 161576975 TAAAGA
 s baboon         241163 6 +   4622798 TAAAGA
 s mm4.chr6     53303881 6 + 151104725 TAAAGA
 s rn3.chr4     81444246 6 + 187371129 taagga
```

https://cgwb.nci.nih.gov/FAQ/FAQformat.html#format5

Conclusion

A retenir sur les outils d'alignement de génomes :

- Récents, manquent parfois de maturité
- Le choix des paramètres est décisif et souvent difficile en pratique
- Une solution unique en terme d'alignement est produite (alors que les heuristiques utilisées peuvent produire des solutions proches quasi équivalentes)
- Problème de choix des outils, souvent spécifiques à une problématique : identification d'exons : WABA, génomes procaryotes : Mummer, Mauve…
- Certains outils produisent des alignements locaux non pertinents et peuvent nécessiter une étape de post-traitement
- Il est difficile de comparer et d'évaluer la qualité et la pertinence biologique des alignements de génomes.

Le problème de l'évaluation

Comment évaluer un alignement de génomes ?

- **C'est un domaine de recherche actuel en bioinformatique.**

Plusieurs types d'approches :

- Simulations : données simulées à partir de régions codantes ou non ;

- Critères « biologiques »: couverture, pourcentage d'identité, expertise biologique (données validées « manuellement » croisement avec annotations, gènes orthologues, phylogénie,…) ;

- Critères « statistiques » : post-traitement des alignements via le % d'identité, ou le score (progressiveMauve), modèles statistiques (robustesse) ou probabilistes (GRAPE*).

- **Benchmarck pour les alignements de génomes, sur le modèle de l'alignathon :**

http://compbio.soe.ucsc.edu/alignathon

***Lunter et al. 2008. Uncertainty in homology inferences: assessing and improving genomic sequence alignment. Gen Research.**

Fin !

Des questions ?

Revues et benchmarks

• **Frazer KA *et al*. 2003.** Cross-Species Comparisons: A Review of Methods and Available Resources. Genome Research 13:1-12.

• **Kellis M *et al*. 2004.** Methods in comparative genomics: genome correspondence, gene identification and regulatory motif discovery. J Comput Biol. 11:319-55.

• **Couronne O *et al*. 2003.** Strategies and tools for whole-genome alignments. Genome Research. 13: 73-80.

• **Ureta-Vidal A *et al.* 2003.** Comparative genomics: genome-wide analysis in metazoan eukaryotes. Nature Reviews. 4:251-262.

• **Pollard DA *et al*. 2004.** Benchmarking tools for the alignment of functional noncoding DNA. BMC Bioinformatics. 5(1):6.

. Miller W. 2001. Comparison of genomic DNA sequences: solved and unsolved problems. Bioinformatics 17:391-397.

.Swidam & Shamir. 2009. Assessing the quality of whole genome alignments in bacteria. Adv Bioinfomatics

. Prakash & Tompa, 2007. Measuring the accuracy of genome-size multiple alignments. Genome Biology

.Chen & Tompa, 2010. Comparative assessment of methods for aligning multiple genome sequences. Nature Biotechnology

. Earl *et al.* 2015. Alignathon: a competitive assessment of whole-genome alignment methods. Genome Research.