Croisement de données

Bastien Job, BiGR, INSERM/IGR
Claire Toffano-Nioche, I2BC, Paris-Saclay
Matthias Zytnicki, MIAT, INRA

École de bioinformatique EBAII 2020

Contexte

Objectifs du cours

- Permettre de croiser des données génomiques de types différents
- Renforcer les notions vues précédemment
- Se familiariser avec `bedtools`
- Proposer un plan expérimental

Ce que le cours n'est pas

- Une réponse à une vraie question biologique
- Une méthode statistiquement valide

Le croisement de données

Qu'est-ce ?

- Une comparaison des positions ou intervalles génomiques:
  - un variant par rapport à des gènes d'intérêt,
  - des pics de ChIP-Seq par rapport à des gènes différentiellement exprimés, etc.

À quel moment est-ce valide ?

- Lorsque vous cherchez des co-occurrences.
- Lorsque vous donnez des distributions (de distance).

À quel moment est-ce douteux ?

- Lorsque les résultats sont présentés comme significatifs.

Problème 1

Question scientifique

> Est-ce que mes gènes différentiellement exprimés contiennent plus de promoteurs actifs qu'attendu ?

Données (humaines)

- une liste de gènes différentiellement exprimés (herpes simplex virus type 1 infected HeLa cells with knockdown of beta-2-microglobulin)
- un fichier d'annotation (GRCh38.94, de Ensembl)
- les sites de fixation de H3K4me3 (UCSC genome browser)

`/shared/projects/ebaii2020/atelier_croisement/data`

À vous

Quel est le protocole ?

Un protocole possible

1. Extraire les intervalles génomiques des gènes différentiellement exprimés
2. Comparer les intervalles génomiques des gènes avec les régions H3K4me3
3. Compter le nombre de chevauchements
4. Trouver des gènes non-différentiellement exprimés
5. Comparer ces intervalles génomiques avec les régions H3K4me3
6. Compter le nombre de chevauchements
7. Comparer les nombres de chevauchements

Données

gènes

ENSG00000004846

ENSG00000005981

ENSG00000006747

ENSG00000015568

ENSG00000047457

ENSG00000050628

ENSG00000057149

ENSG00000058085

ENSG00000071575

annotation

```
1 havana  pseudogene  11869  14409  .  +  .  ...
1 havana  lnc_RNA     11869  14409  .  +  .  ...
1 havana  exon        11869  12227  .  +  .  ...
```

sites de fixation

```
22      16192349        16192565        region_1
22      16846630        16870710        region_2
22      17067019        17067283        region_3
```

Avant toute chose...

Créez-vous un répertoire

```
cd ~

mkdir tp_croisement

cd tp_croisement
```

Emplacement des données

- Les données du TP sont sur

  `/shared/projects/ebaii2020/atelier_croisement/data`

- Nous utiliserons également les banques fournies par l'infrastructure

`/shared/bank/homo_sapiens/GRCh38/gff3/Homo_sapiens.GRCh38.94.gff3`

Étape 1

Extraire les intervalles génomiques des gènes différentiellement exprimés

Données

- Liste de gènes
- Fichier d'annotation, au format GFF3

Résultat

- Gènes différentiellement exprimés, au format GFF3

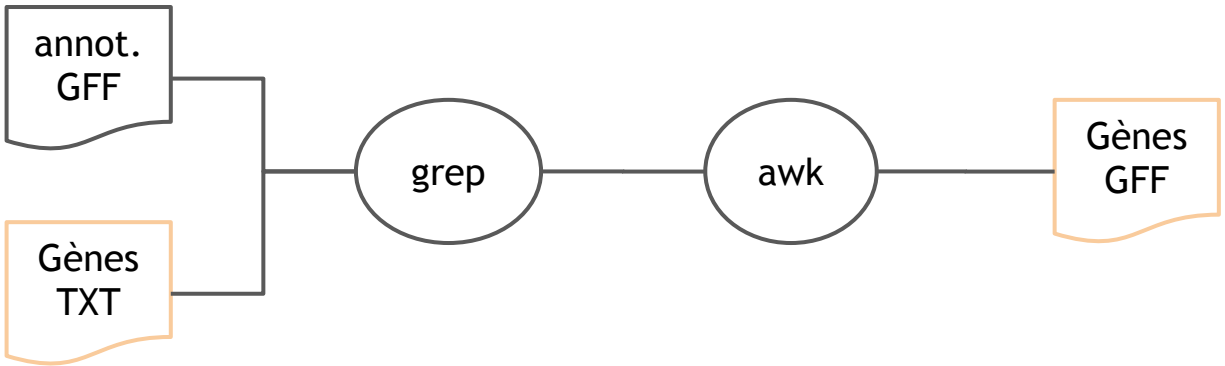
À vous

- Chercher une liste de mots dans un texte

```
grep -f liste_genes.txt annotation.gff > résultat.gff
```

- Se restreindre aux gènes

awk '($3 == "gene")' *entrée.gff* > *sortie.gff*



Étape 2

Comparer les intervalles génomiques des gènes avec les régions H3K4me3

Données

- Gènes différentiellement exprimés, au format GFF3
- Sites de fixation de H3K4me3, au format BED

Résultat

- Gènes différentiellement exprimés contenant des sites de fixation, au format GFF3

L’outil: `bedtools`

- Site web: https://bedtools.readthedocs.io/
- Format général

bedtools *operation* -a *fichier1.bed* [-b *fichier2.bed*] [*options*] -o *resultat.bed*

- Opérations les plus utilisées: `intersect` `flank` `closest`...
- Citation:

  BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features, Aaron R. Quinlan, Ira M. Hall, 2010, Bioinformatics.

- Alternatives: gtftk, S-MART, etc.

À vous

- Cherchez et chargez les `bedtools`

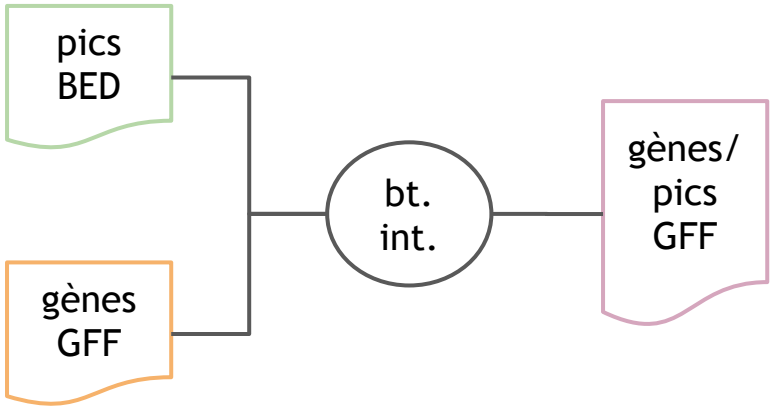
```
module avail

module load bedtools/2.29.2
```

- Voir la liste des opérations

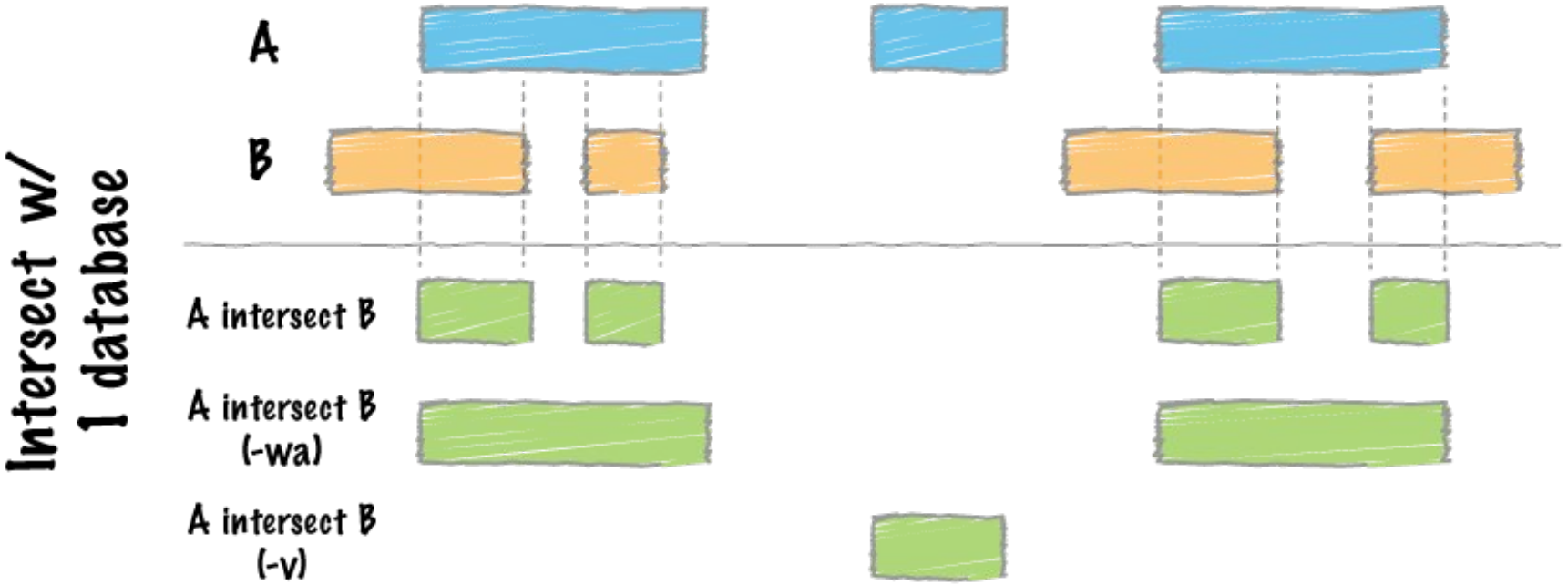
```
bedtools
```

- Voir la liste des options pour une opération

```
bedtools intersect -h
```



bedtools intersect



Étape 3

Compter le nombre de chevauchements

Données

- Gènes différentiellement exprimés contenant des sites de fixation, au format GFF3

Résultat

- Un nombre

Étape 4

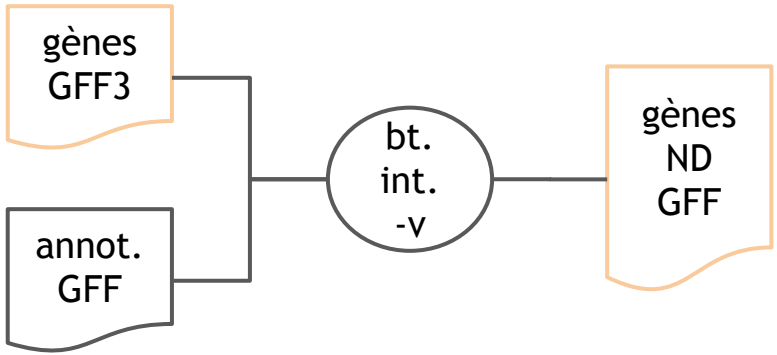
Trouver des gènes non-différentiellement exprimés

Données

- Gènes différentiellement exprimés, au format GFF3
- Fichier d'annotation, au format GFF3

Résultat

- Gènes non différentiellement exprimés, au format GFF3



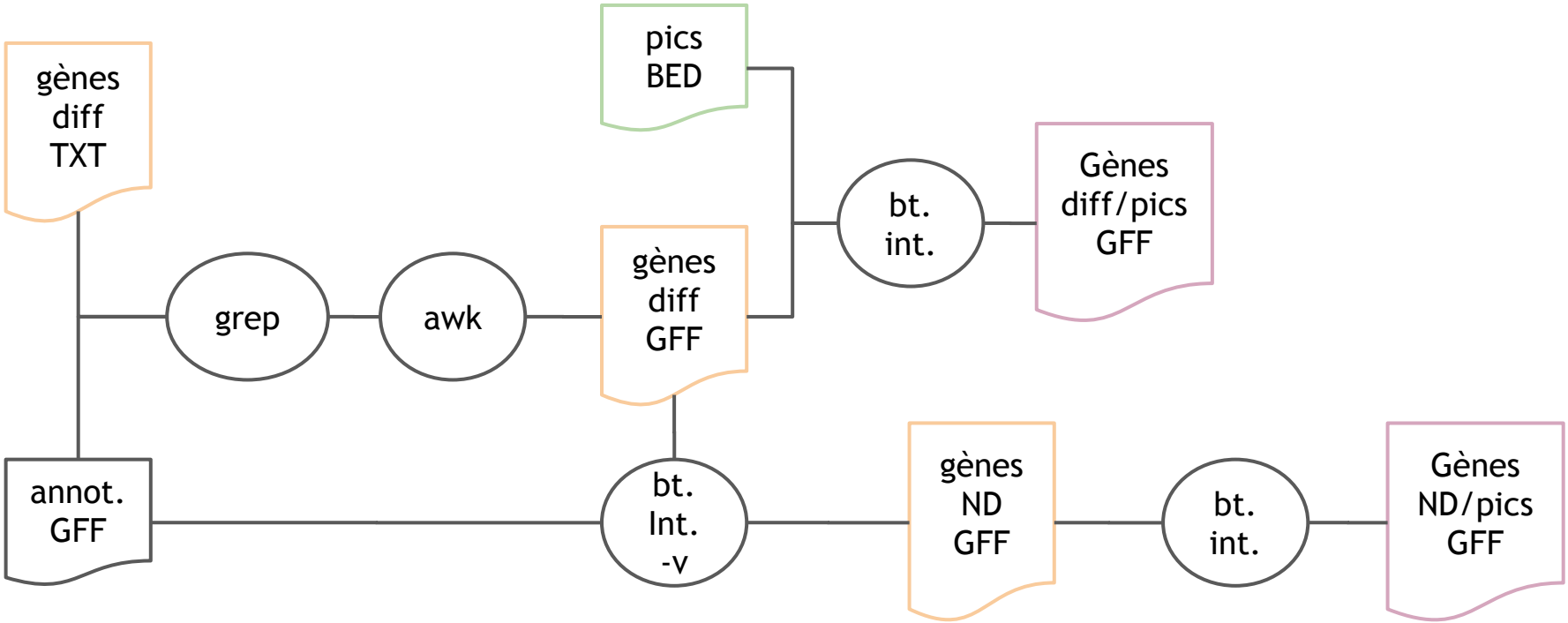
Étapes 5-7

Comparer ces intervalles génomiques avec les régions H3K4me3

Compter le nombre de chevauchements

Comparer les nombres de chevauchements

Workflow


gènes
diff
TXT
pics
BED
bt.
int.
Gènes
diff/pics
GFF
grep
awk
gènes
diff
GFF
annot.
GFF
bt.
Int.
-v
gènes
ND
GFF
bt.
int.
Gènes
ND/pics
GFF

Questions

- Le résultat était-il attendu ?
- Qu’est-ce que le *background* ?

Problème 2

Question scientifique

> Quels sont les variants qui sont dans les promoteurs de mes gènes différentiellement exprimés ?

Données

- les gènes différentiellement exprimés, en GFF
- une liste de variants, au format VCF:

`/shared/mfs/data/projects/ebaii2020/atelier_croisement/data/common_all_20180418_div.vcf`

Données

variants

```
#CHROM  POS     ID              REF     ALT     QUAL    FILTER  INFO

1       10177   rs367896724     A       AC      .       .
RS=367896724;RSPOS=10177;dbSNPBuildID=138;SSR=0;SAO=0;VP=0x05000020005170026000
200;GENEINFO=DDX11L1:100287102;WGT=1;VC=DIV;R5;ASP;VLD;G5A;G5;KGPhase3;CAF=0.574
7,0.4253;COMMON=1;TOPMED=0.76728147298674821,0.23271852701325178

1       10352   rs555500075     T       TA      .       .
RS=555500075;RSPOS=10352;dbSNPBuildID=142;SSR=0;SAO=0;VP=0x05000020005170026000
200;GENEINFO=DDX11L1:100287102;WGT=1;VC=DIV;R5;ASP;VLD;G5A;G5;KGPhase3;CAF=0.562
5,0.4375;COMMON=1;TOPMED=0.86356396534148827,0.13643603465851172

1       10616   rs376342519     CCGCCGTTGCAAAGGCGCGCCG  C       .       .
RS=376342519;RSPOS=10617;dbSNPBuildID=142;SSR=0;SAO=0;VP=0x05000020005040026000
200;GENEINFO=DDX11L1:100287102;WGT=1;VC=DIV;R5;ASP;VLD;KGPhase3;CAF=0.006989,0.9
93;COMMO
```

Un protocole possible

1. Extraire la région située à 2kb en amont des gènes
2. Trouver tous les variants chevauchant les régions trouvées précédemment

Étape 1

Extraire la région située à 2kb en amont des gènes

Nouvelle opération

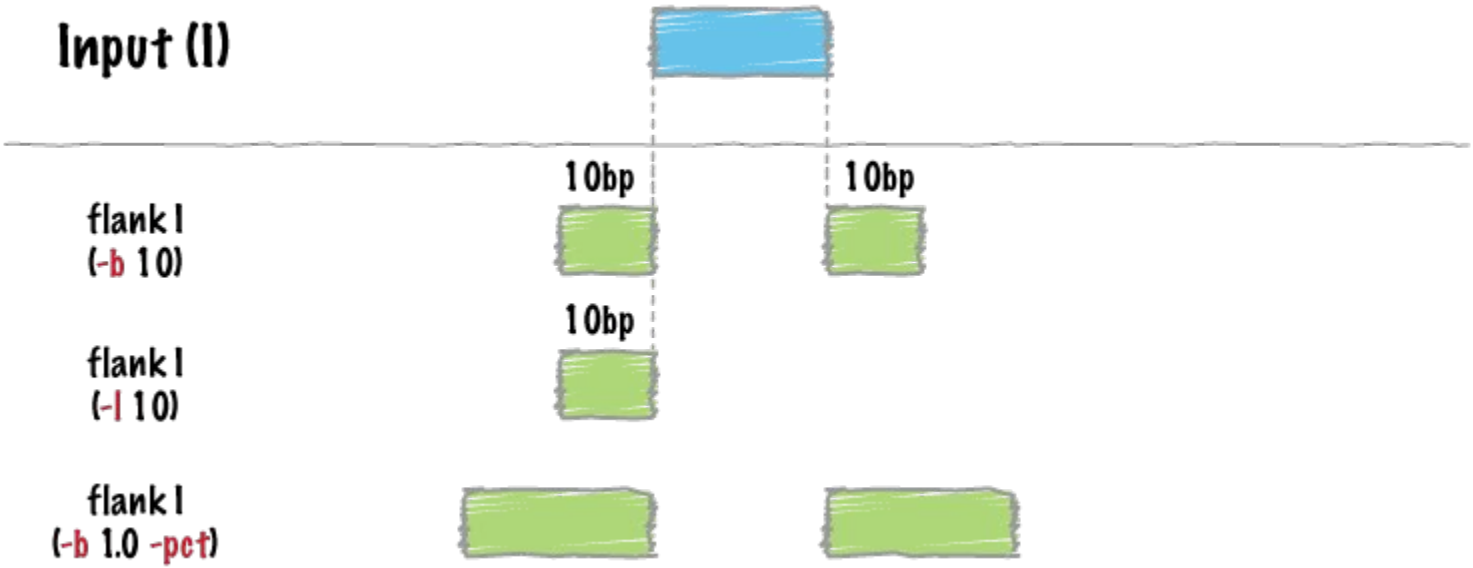
- `bedtools flank`
- il nécessite un fichier `genome`, pourquoi ?

Données:

- Taille des chromosomes:

```
/shared/mfs/data/projects/ebaii2020/atelier_croisement/data/chrs.len
```

bedtools flank



Et les options `-r`, `-s`, `-pct`...

Étape 2

Trouver tous les variants chevauchant les régions trouvées précédemment

Pas de nouveauté ici !

(ie : vous devez pouvoir trouver une solution avec les commandes déjà vues auparavant)

Question complémentaire : (pour aller plus loin)

- Combien y a-t-il de SNP ***par promoteur*** ?

Problème 3

Question scientifique

> Quels sont les gènes différentiellement exprimés les plus proches de mes pics ChIP qui contiennent une mutation ?

Données

- les gènes différentiellement exprimés
- les sites de fixation de H3K4me3
- une liste de variants, au format VCF

Un protocole possible

1. Trouver les pics qui contiennent une mutation
2. Trouver le gène le plus proche de chaque région précédemment trouvée

Étape 1

Trouver les pics qui contiennent une mutation

Rien de nouveau ici...

Étape 2

Trouver le gène le plus proche de chaque région précédemment sélectionnée

Nouvelle opération

- `bedtools closest`
- il demande que les annotations soient triées

Note

`bedtools closest` requires that all input files are presorted data by chromosome and then by start position (e.g., `sort -k1,1 -k2,2n in.bed > in.sorted.bed` for BED files).

bedtools closest

Étapes supplémentaires

- Limiter la recherche à 2kb.
- Se restreindre aux gènes dont les pics sont en amont d’un gène.
- Trouver les gènes en doublon.

Conclusion

- La majeure partie des questions que l'on se pose sur des données génomiques sont solubles avec un peu de `bash`, `awk`, et `bedtools`.
- `bedtools` propose *beaucoup* d'opérations
  - Conversions: BED / BAM / WIG / FASTA
  - Opérations binaires: `intersect`, `closest`, `coverage`, `subtract`
  - Opération unaires: `merge`, `flank`, `shift`, `shuffle`
  - Et autres…

⚠️ Un croisement, ça ne donne pas de stats pertinentes !