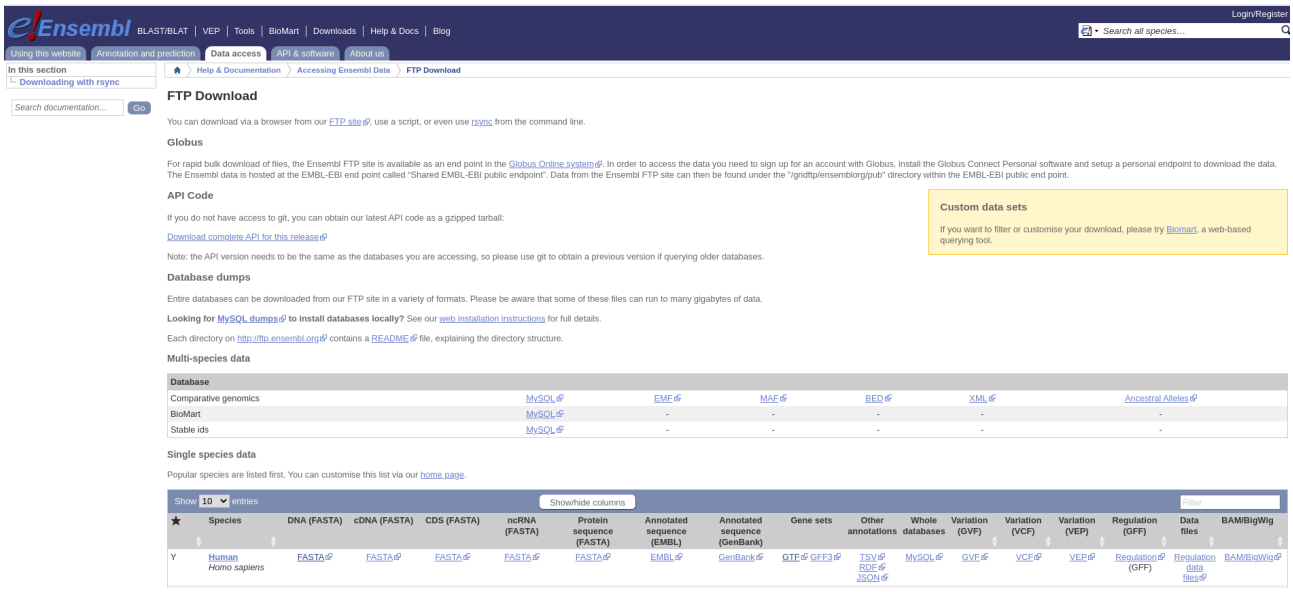
Lancement d’un pipeline Nextflow nf-core rnaseq

Contexte biologique

Références

- Génome et annotation (transcriptome GTF)
  http://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html



- Pour la formation, ce TP et les données de formation sont disponibles via un wget sur
  http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/

  Génome :

  http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/ITAG2.3_genomic_Ch6.fasta

  Transcriptome:

  http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/ITAG2.3_genomic_Ch6.gtf

Plan d'expérience : fichiers - réplicats - conditions

Descriptif des échantillons : nom du groupe, numéro du réplicat, path FASTQ R1, path FASTQ R2, foward/reverse/unstranded

Exemple:

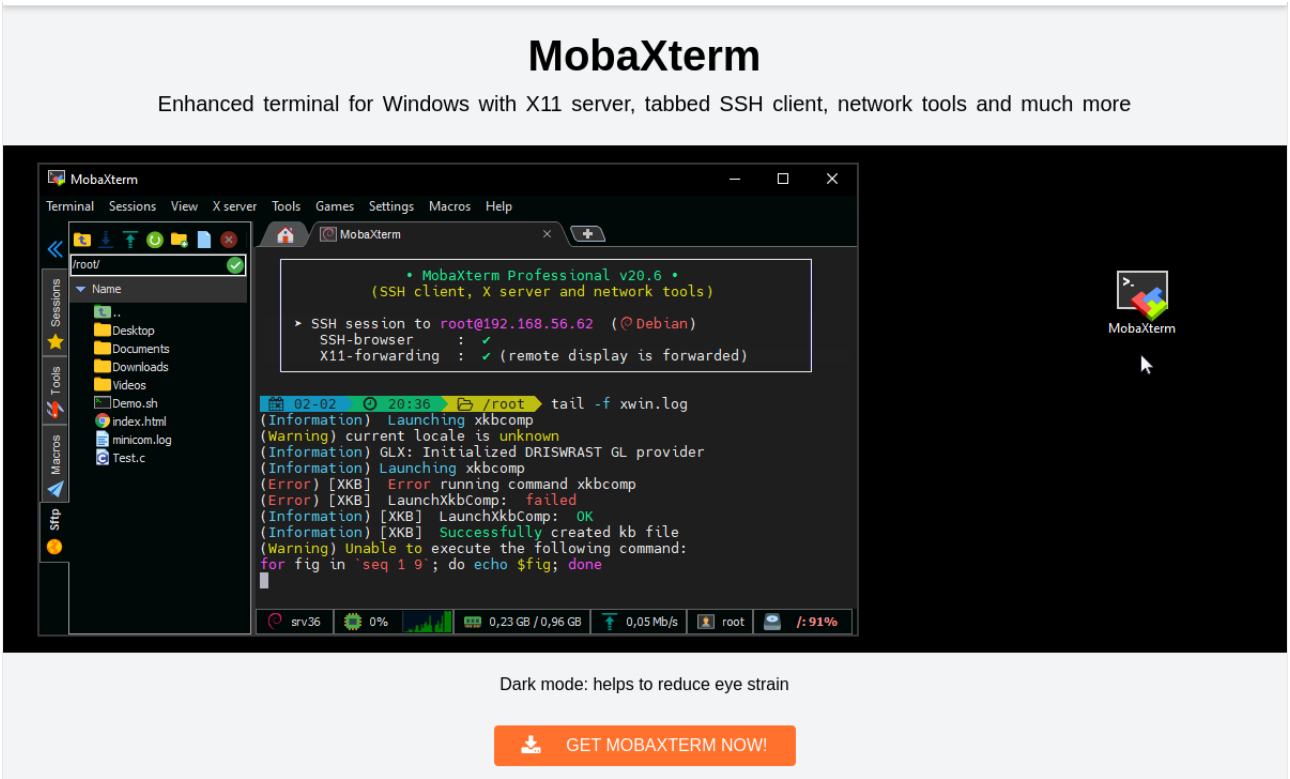
```
$ more part1_sample_sheet_V2.csv

group,replicate,fastq_1,fastq_2,strandedness,sample_code_barre,animal,tissue,sexe,maturity,TG,dg

E_L1_90_LL_F_M-,1,/path/to/FASTQ/22_R1.fastq.gz,/path/to/FASTQ/22_R2.fastq.gz,reverse,0233078348,Foetus896,endometrium,F,M-,LW,90j
```

```
E_L1_90_LM_M_M+,1,/path/to/FASTQ/23_L001_R1.fastq.gz,/path/to/FASTQ/
23_R2.fastq.gz,reverse,0233078321,Foetus964,endometrium,M,M+,LwxMS,90j
```

Traitements bioinformatiques

Préparation de l'espace de travail

1. Ouverture de votre terminal ou téléchargement de [MobaXterm](https://mobaxterm.mobatek.net/)
https://mobaxterm.mobatek.net/



2. Principales commandes Linux:

```
cd /work/aster
touch toto
rm -rf toto
ls
touch README
geany READMY &
more README
mkdir FASTQ
ls -ltrah
cd FASTQ
wget http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/test-data-galaxy/1.fastq
more 1.fastq
mv 1.fasta reference.fasta
mkdir genome
mv /work/aster/FASTQ/reference.fasta genome/.
```

3. Connection aux comptes de formation:

Les comptes suivants:
anemone arome aster bleuet camelia capucine chardon clematite cobee coquelicot cosmos

cyclamen dahlia digitale geranium gerbera glaieul hortensia iris jacinthe
ont été réservé pour la formation UPS du 10 au 17 Septembre 2021.

Exemple d'host pour MobaXterm: aster@genologin.toulouse.inra.fr

```
(base) [smaman@localhost ~]$ ssh -XY aster@genologin.toulouse.inra.fr
aster@genologin.toulouse.inra.fr's password:
Last login: Tue Jul 27 14:08:06 2021 from 147.100.120.100


aster@genologin1 ~ $
aster@genologin1 ~ $ cd /work/aster/
aster@genologin1 /work/aster $
```

4. Récupération du génome et de l'annotation:

```
cd  /path/to/NEXTFLOW/
mkdir /path/to/NEXTFLOW/genome/  ; cd /path/to/NEXTFLOW/genome/
wget
http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/ITAG2.3_genomic_Ch6.fasta


mkdir /path/to/NEXTFLOW/annotation/  ; cd /path/to/NEXTFLOW/annotation/
wget http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/ITAG2.3_genomic_Ch6.gtf
```

5. Récupération des séquences:

```
mkdir /path/to/NEXTFLOW/FASTQ/  ; cd /path/to/NEXTFLOW/FASTQ/
wget http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/MT_rep1_1_Ch6.fastq.gz
wget http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/MT_rep1_2_Ch6.fastq.gz
wget http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/WT_rep1_1_Ch6.fastq.gz
wget http://genoweb.toulouse.inra.fr/~sigenae/sarah/UPS/NEXTFLOW/WT_rep1_2_Ch6.fastq.gz
```

Votre pipeline Nextflow

Pour lancer un pipeline sur le cluster de calcul BioInfo Genotoul, nous préparons 3 fichiers:

1/ Un fichier de lancement en sbatch

2/ Un fichier de configuration qui surcharge le fichier en local.

3/ Un fichier de description des échantillons

Fichier de configuration

```
$ more sm_config.cfg
trace {
    enabled = true
    file = 'pipeline_trace.txt'
    fields = 'task_id,name,status,exit,realtime,%cpu,rss,script'
}
```

Le fait de rajouter ce module «trace» permet de récupérer les lignes de commande complètes lancées à chaque étape du pipeline. Voici un exmple:

```
$ more pipeline_trace.txt

task_id     name   status exit   realtime     %cpu   rss    script
3    RNASEQ:INPUT_CHECK:SAMPLESHEET_CHECK (part1_sample_sheet_V2.csv)  COMPLETED 0  1s
     24.4%  1 MB
5    RNASEQ:CAT_FASTQ (E_L1_110_LL_F_M+_R1) COMPLETED    0     18ms   12.3%  0
ln -s 0233078320_CCGTGAAG-ATCCACTG-AHV5H7DSXY_L001_R1.fastq.gz
E_L1_110_LL_F_M+_R1_1.merged.fastq.gz
ln -s 0233078320_CCGTGAAG-ATCCACTG-AHV5H7DSXY_L001_R2.fastq.gz
E_L1_110_LL_F_M+_R1_2.merged.fastq.gz
```

Fichier de description des échantillons tests

```
$ more inputs.csv
group,replicate,fastq_1,fastq_2,strandedness
mutant,1,/path/to/data/MT_rep1_1_Ch6.fastq.gz,path/to/data/
MT_rep1_2_Ch6.fastq.gz,unstranded
wild,1,/path/to/data/WT_rep1_1_Ch6.fastq.gz,path/to/data/
WT_rep1_2_Ch6.fastq.gz,unstranded
```

Fichier de lancement du pipeline

```
aster@genologin1 /work/aster $ more run_pipeline.sh
#!/bin/bash
#SBATCH -J nfcorernaseq
#SBATCH -p unlimitq
#SBATCH --mem=6G

module purge
module load bioinfo/nfcore-Nextflow-v20.11.0-edge/

input=/path/to/inputs.csv
gtf=/path/to//annotation/GCF_013265735.2_USDA_OmykA_1.1_genomic.gff
fasta=/pathe/to/genome/GCF_013265735.2_USDA_OmykA_1.1_genomic.fna
config=/path/to/sm_config.cfg

nextflow run nf-core/rnaseq -profile genotoul -r 3.0 \
--input $input \
--fasta $fasta --gtf $gtf \
--save_trimmed \
--aligner star_rsem --save_align_intermeds \
-c $config
```

Lancement du pipeline

```
aster@genologin1 /work/aster $ sbatch run_pipeline.sh
Submitted batch job 27335211
aster@genologin1 /work/aster $ ls
annotation  FASTQ  genome  inputs.csv  inputs_test.csv  README  run_pipeline.sh
sm_config.cfg
```

Pour suivre l'état du job :

```
$ seff 27600449

Job ID: 27600449
Cluster: genobull
User/Group: galaxy-prod/wbioinfo
State: RUNNING
Nodes: 2
Cores per node: 3
CPU Utilized: 00:00:00
CPU Efficiency: 0.00% of 5-02:28:36 core-walltime
Job Wall-clock time: 20:24:46
Memory Utilized: 0.00 MB (estimated maximum)
Memory Efficiency: 0.00% of 205.08 GB (34.18 GB/core)
WARNING: Efficiency statistics may be misleading for RUNNING jobs.
```

Pour vérifier s'il y a une erreur dans le log sbatch:

```
grep --color -i "error" slu*
```

Analyse des résultats

```
$ ls results/
fastqc/  genome/  multiqc/  pipeline_info/  star_rsem/  trimgalore/
```

En détails:

```
results/fastqc:
1_R1_fastqc.html
1_R1_fastqc.zip

results/genome:
rsem/  ref.fa.fai  ref.fa  annotation_genes.gtf

results/multiqc:
```

```
star_rsem/

results/pipeline_info:
execution_report.html  execution_timeline.html  pipeline_report.html
pipeline_report.txt  samplesheet.valid.csv  software_versions.csv

results/star_rsem:
bigwig/
deseq2_qc/
dupradar/
featurecounts/
picard_metrics/
preseq/
qualimap/
rseqc/
samtools_stats/
stringtie/
rsem.merged.gene_counts.tsv        rsem.merged.gene_tpm.tsv
rsem.merged.transcript_counts.tsv  rsem.merged.transcript_tpm.tsv

results/trimgalore:
...._trimming_report.txt
```

Analyse de multiQC report

results/multiqc/star_rsem/multiqc_report.html