GenoToul Bioinfo

Introduction à l'analyse méta-omics

Claire Hoede

https://web-genobioinfo.toulouse.inrae.fr/~formation/M2_bioinfo/2023/

- Présentation de la PF Bioinfo
- Tour de table

Genotoul Bioinfo

1. Introduction

2. Applications

3. Analyses méta-omiques

3.1. La méta-génétique

3.2. La méta-génomique

4. Analyses exploratoires

5. Impact carbone du calcul

1. Introduction

Quelques définitions

Metagénomique :

1. Introduction

Quelques définitions

Metagénomique : utilisation des techniques de génomique modernes pour l'étude des communautés microbiennes directement dans leur environnement naturel contournant le besoin d'isolation et de culture des espèces individuelles. (Chen & Pachter, 2005)

1. Introduction

Quelques définitions

Metagénomique : utilisation des techniques de génomique moderne pour à l'étude des communautés microbiennes directement dans leur environnement naturel contournant le besoin d'isolation et de culture des espèces individuelles. (Chen & Pachter, 2005)

Micro-organismes :

1. Introduction

Quelques définitions

Metagénomique : utilisation des techniques de génomique modernes pour l'étude des communautés microbiennes directement dans leur environnement naturel contournant le besoin d'isolation et de culture des espèces individuelles. (Chen & Pachter, 2005)

Micro-organismes : ensemble des organismes microscopiques (bactéries, archées, virus, champignons et algues microscopiques).
Ils jouent un rôle vital dans le fonctionnement général de la biosphère en participant par exemple au cycle du carbone ou de l'azote.
Ils synthétisent l'oxygène de notre atmosphere, préservent les animaux (dont nous) de très nombreuses maladies …
Leur diversité spécifique et fonctionnelle, les mécanismes régissant leur dispersion ainsi que leur histoire évolutive demeurent encore mal connus.

1. Introduction

Quelques définitions

Le microbiote :

1. Introduction

Quelques définitions

Le microbiote : ensemble des micro-organismes vivants au sein d'un environnement spécifique (incluant les non-cultivables)

Microbiome :

1. Introduction

Quelques définitions

Le microbiote : ensemble des micro-organismes vivants au sein d'un environnement spécifique (incluant les non-cultivables)

Microbiome : ensemble du microbiote et de l'environnement dans lequel ils évoluent et intéragissent. Par exemple le microbiome intestinal.

1. Introduction

Pourquoi les espèces non cultivables ?

Une faible proportion de micro-organismes sont cultivables.

Mis à part quand ils induisent une pathologie, les micro-organismes peuvent être difficilement détectables.

La plupart des micro-organismes ne sont pas pathogènes (même ceux qui sont associés à l'homme).

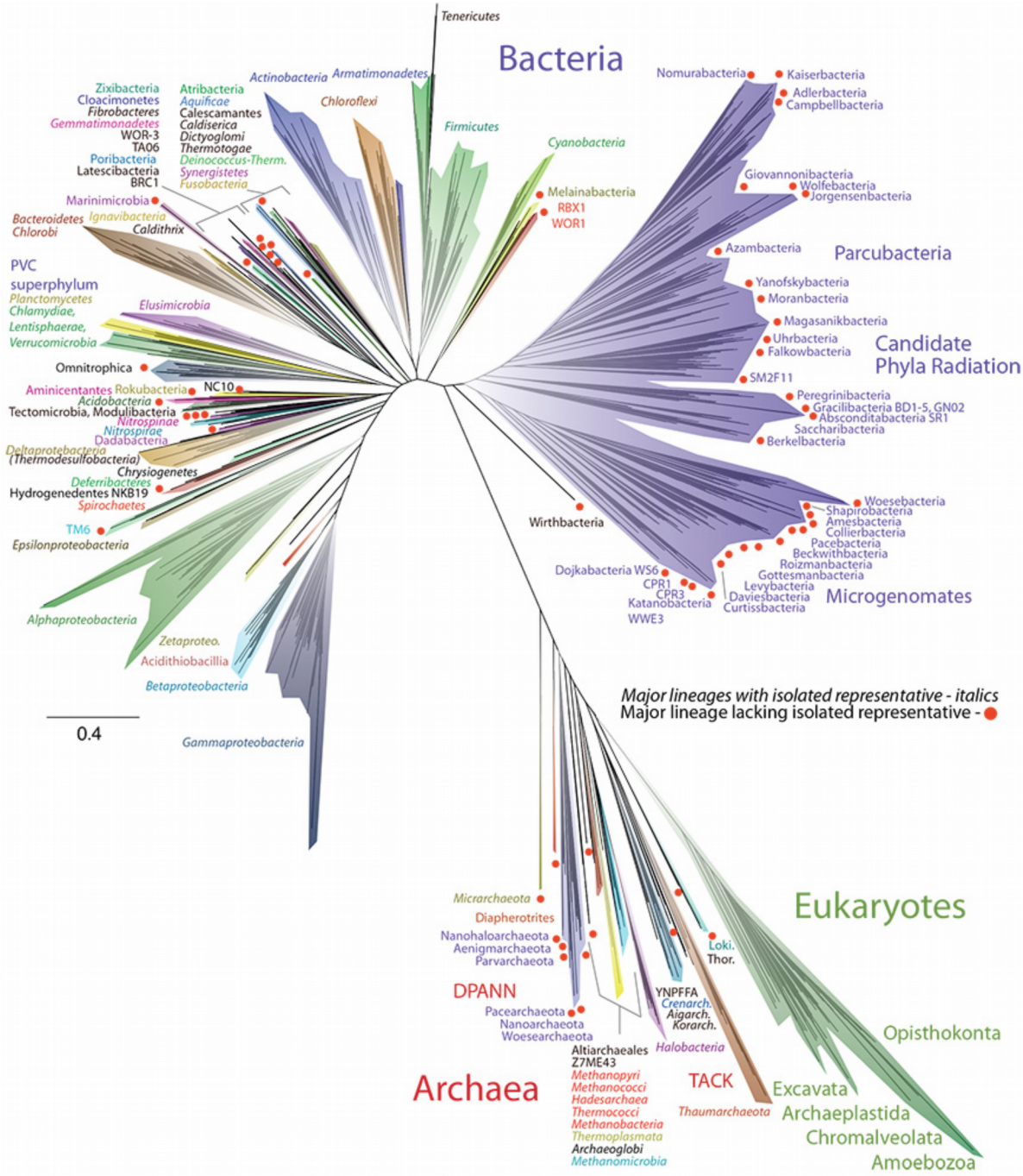
Pour toutes ces raisons les techniques d'études ne nécessitant pas une culture cellulaires ont été développées ces dernières années (typiquement l'analyse de sequence marqueur tels que l'ARNr 16S, 18S, ITS et la metagenomique)

1. Introduction

Espèces non cultivables ?

A new view of the Tree of Life
(Hug et al. 2016)
Une étude de l'université de Berkeley montre que lorsqu'on inclut les données génomiques de 1000 organismes bactériens non cultivés issus d'échantillons métagénomiques, on a une vision complétement différente de l'arbre de la vie et de la diversité des 3 grands domaines du vivant.

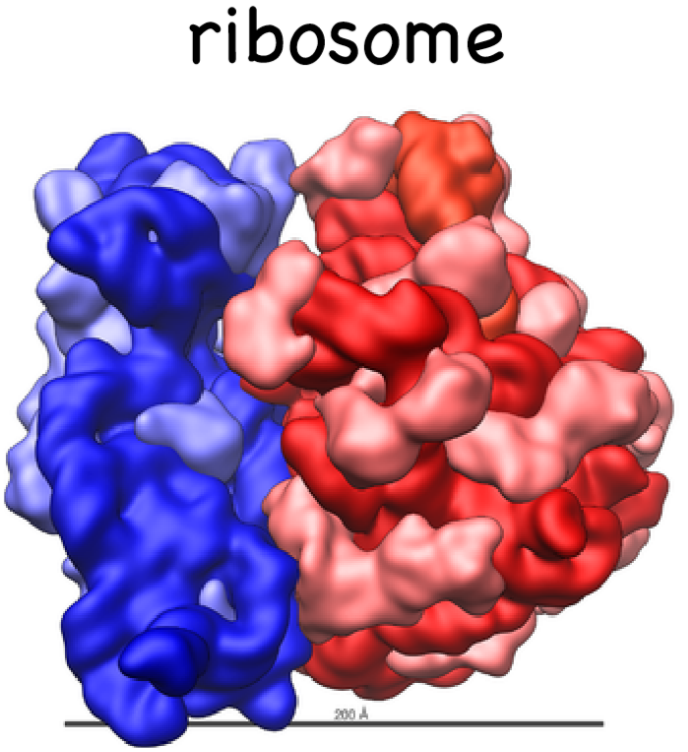
Arbre construit à partir de 16 protéines ribosomales.

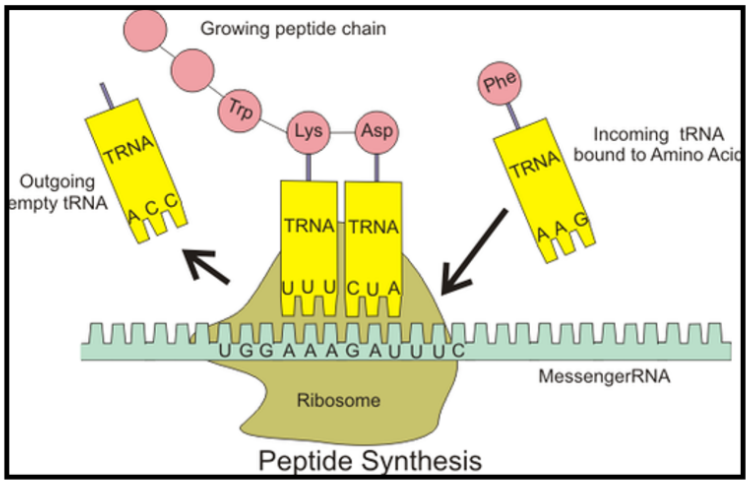


1. Introduction

Ribosomes

- Sont composés de protéines et d'ARNr.
- Extrêmement conservés au cours de l'évolution.
- Présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes.
- Synthétisent les protéines en décodant l'information contenue dans l'ARN messager.
- L'ARN ribosomique portent l'activité catalytique, les protéines stabilisent la structure.
- Les ribosomes sont constitués de deux sous-unités, la petite « lit » l'ARN messager et la grosse se charge de la polymérisation des acides aminés pour former la protéine correspondante.



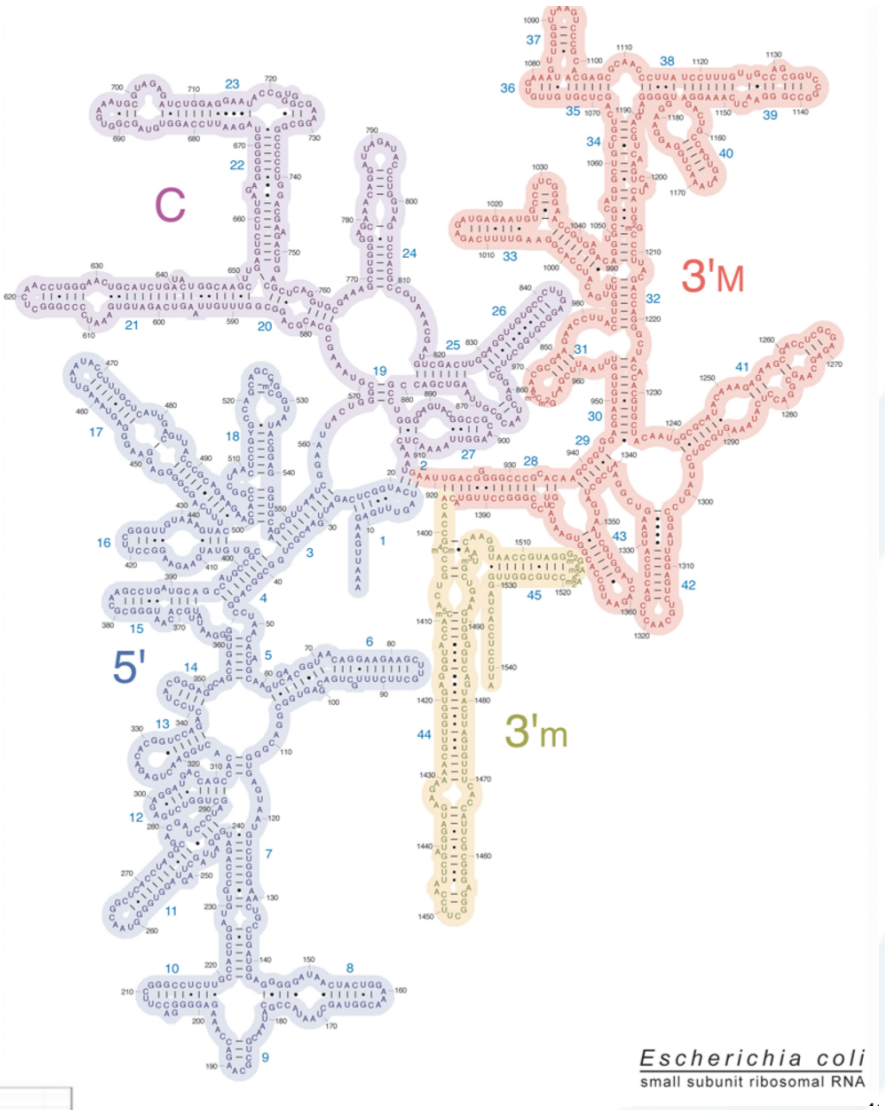


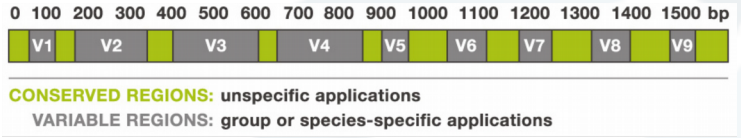
Genotoul Bioinfo

1. Introduction

petite sous unité ribosomale

- Ubiquitaire (16S pour les bactéries, 18S pour les eucaryotes)
- non soumis au transfert horizontaux
- fonction constante (traduction)
- base de données disponibles (SILVA)





Genotoul Bioinfo

1. Introduction

Les questions

Qui est là ?

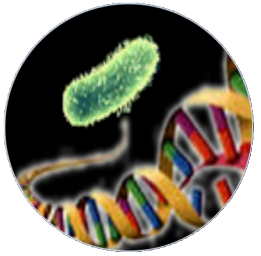
Que peuvent-ils faire ?

(Que font-ils ? ==> metatranscriptomique...)

Qu’est-ce que cela signifie ?

1. Introduction

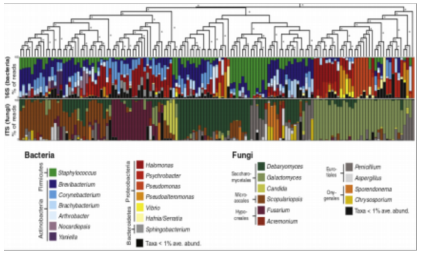
Les questions



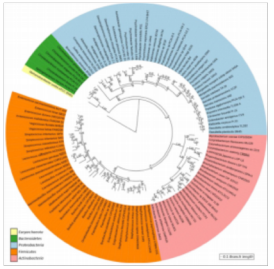
DNA → Metagenomics

RNA → Metatranscriptomics

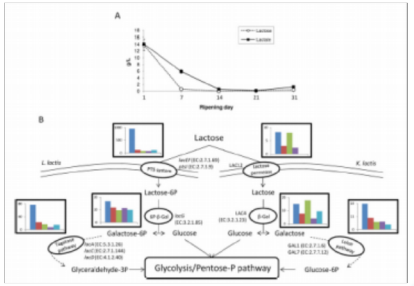
- Amplicon sequencing
- Shotgun sequencing
- RNA sequencing

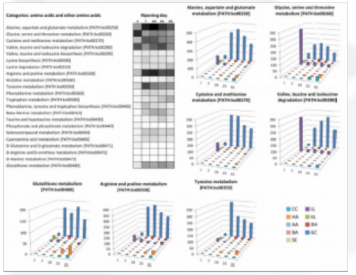


Wolfe *et al.*, 2014



Almeida *et al.*, 2014





Dugat-Bony *et al.*, 2015

Who is here? — What can they do? — What are they doing?

Méta-génétique — **Méta-génomique**

1. Introduction

Méta-génétique (la partie biologique)

Extraction de l'ADN

Amplification de la région ciblée (PCR)

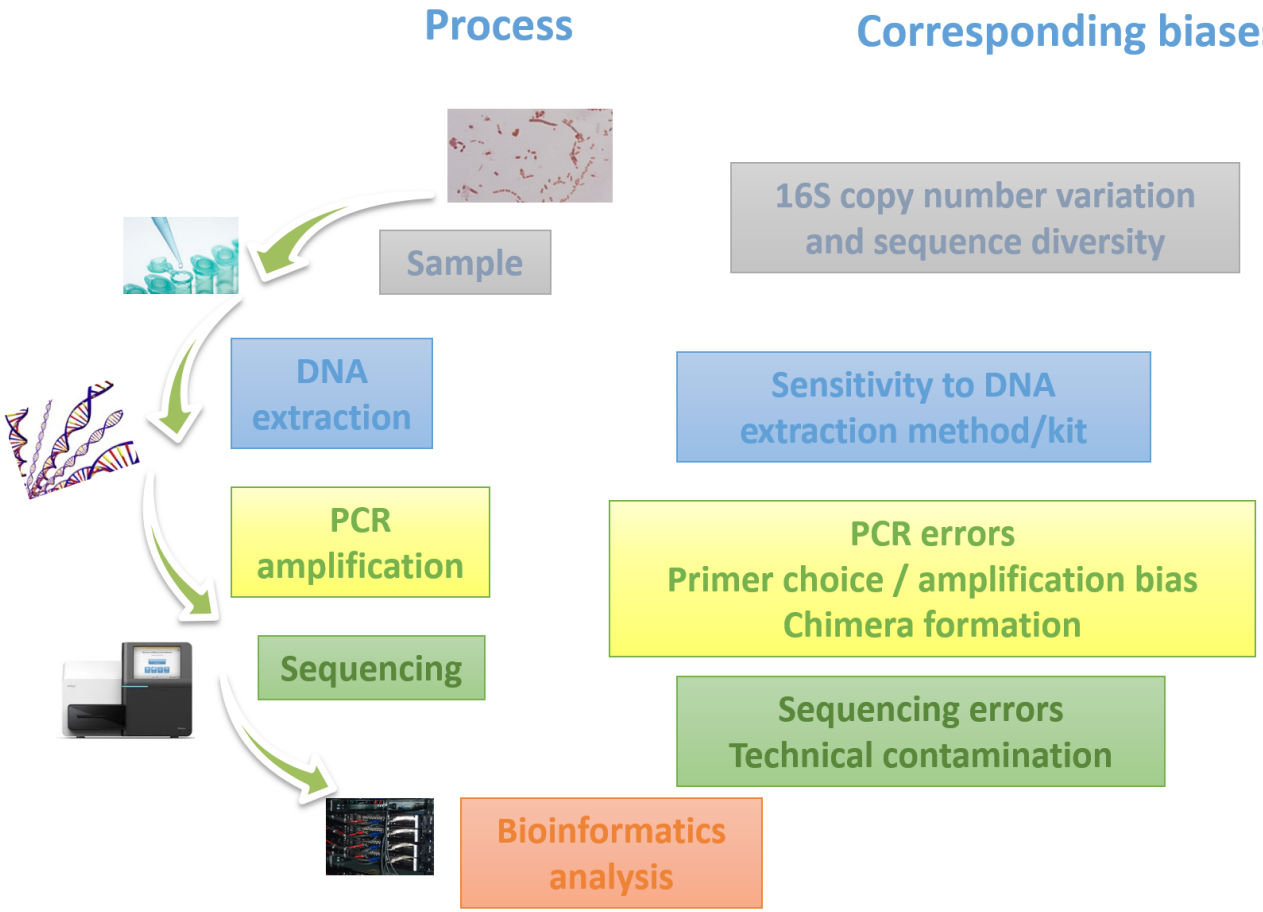
- amorce de PCR (primer) correspondant à l'extrémité de la région conservée autour de la région variable d'interêt
- adaptateur pour le séquençage
- barcodes (petites séquences pour distinguer les échantillons multiplexés)

Séquençage généralement en MiSeq (2x250 pb, ~15 M paires de reads / run)
On commence à voir des études qui séquencent le 16S complet ou le 16S-23S en longues lectures HiFi Pacbio.

Genotoul Bioinfo

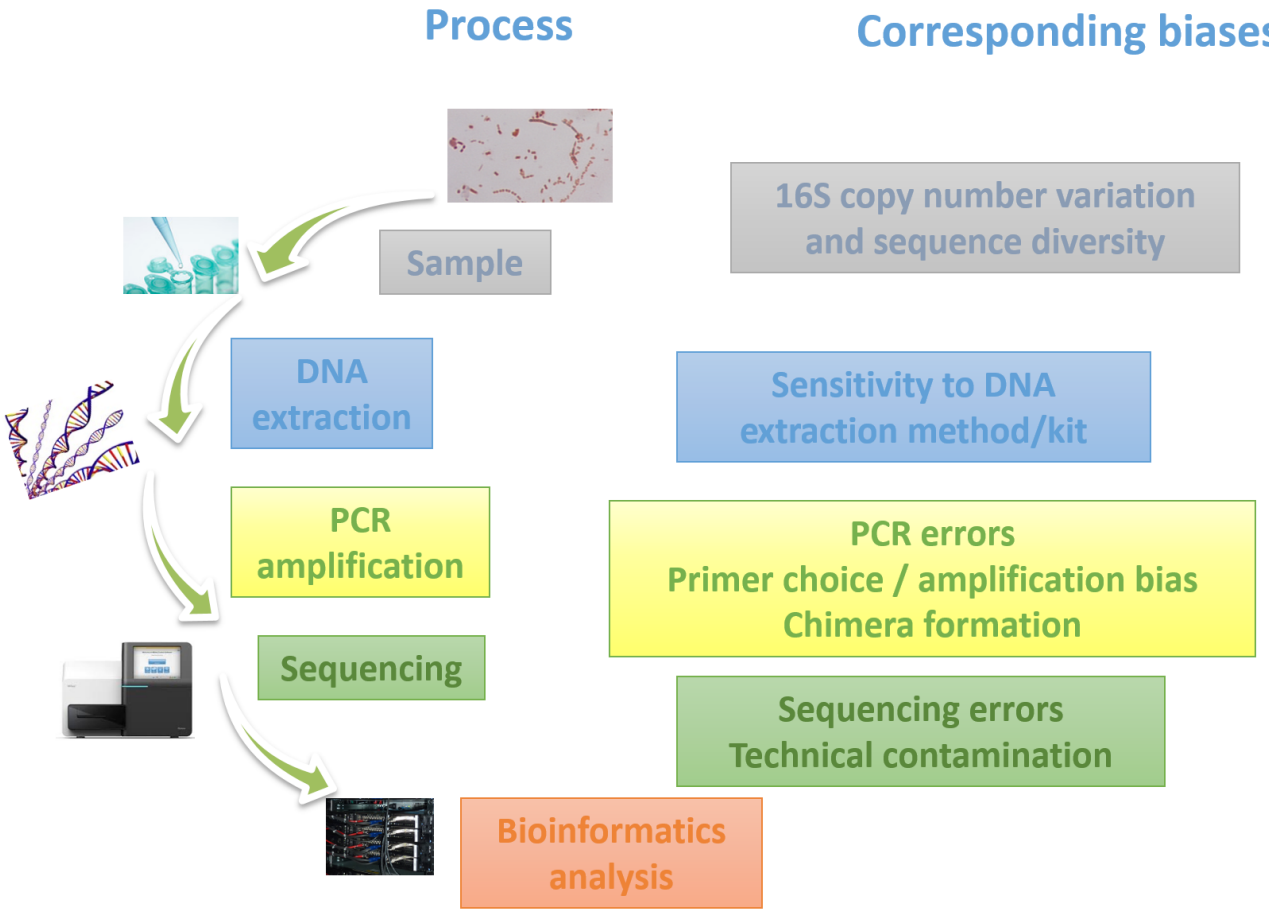
1. Introduction

Méta-génétique (la partie biologique)



1. Introduction

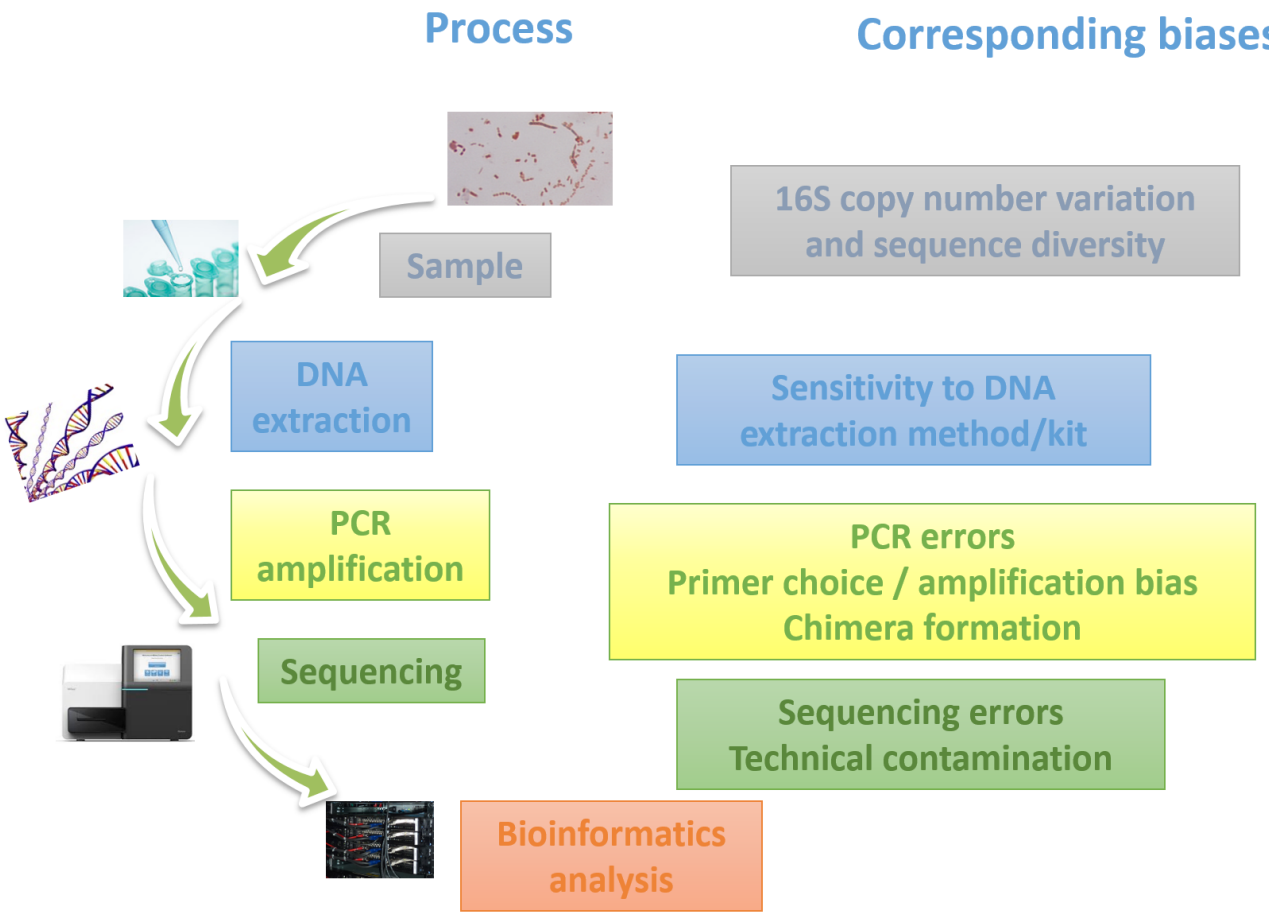
Méta-génétique (la partie biologique)



Jusqu'à 15 copies de 16S par génomes
Et plusieurs 16S identiques entre espèces et parfois pas identiques en intra-génome

1. Introduction

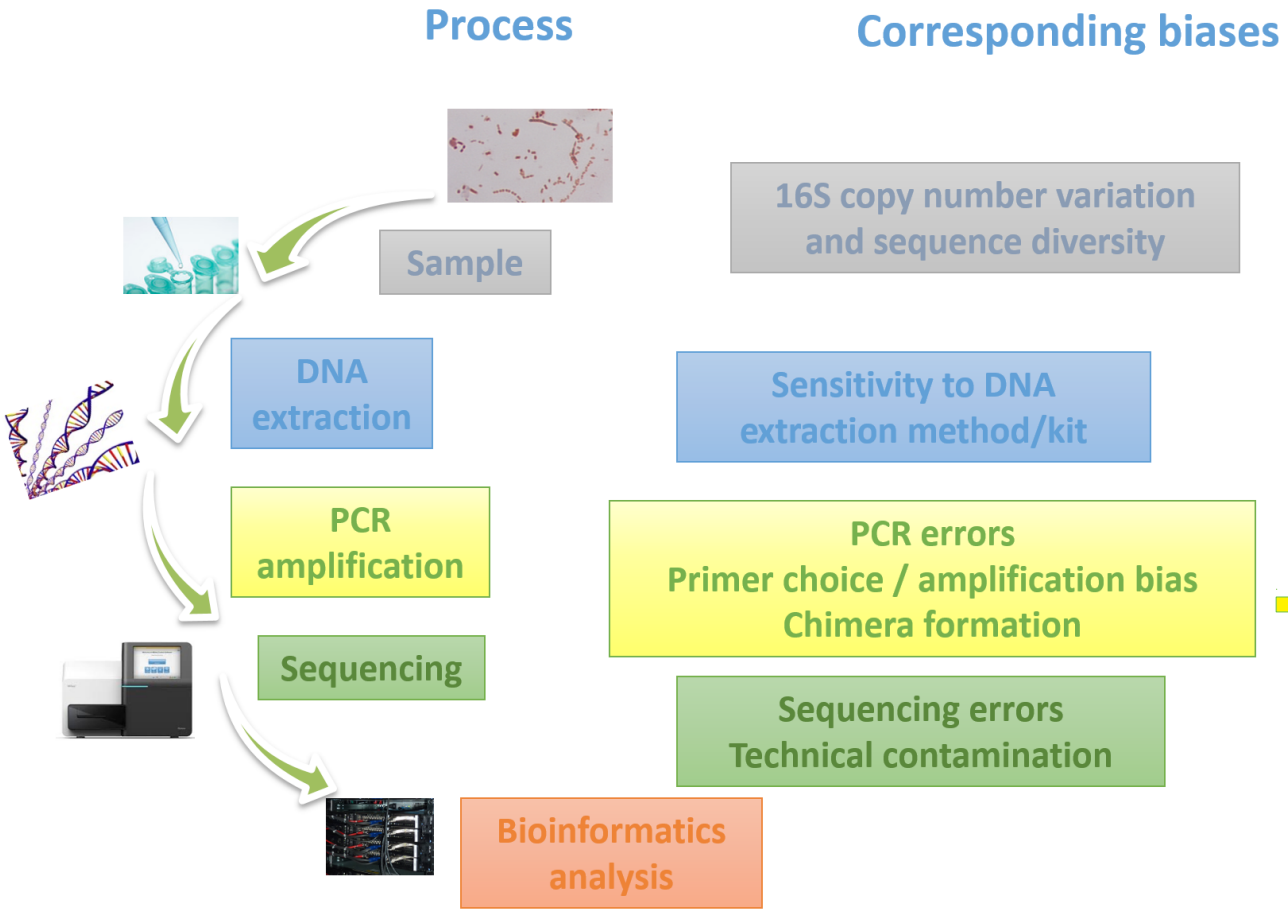
Méta-génétique (la partie biologique)



On peut extraire de l'ADN du kit d'extraction quand faibles quantités d'ADN ("kitome")
Faire un blanc rien qu'avec le kit d'extraction

1. Introduction

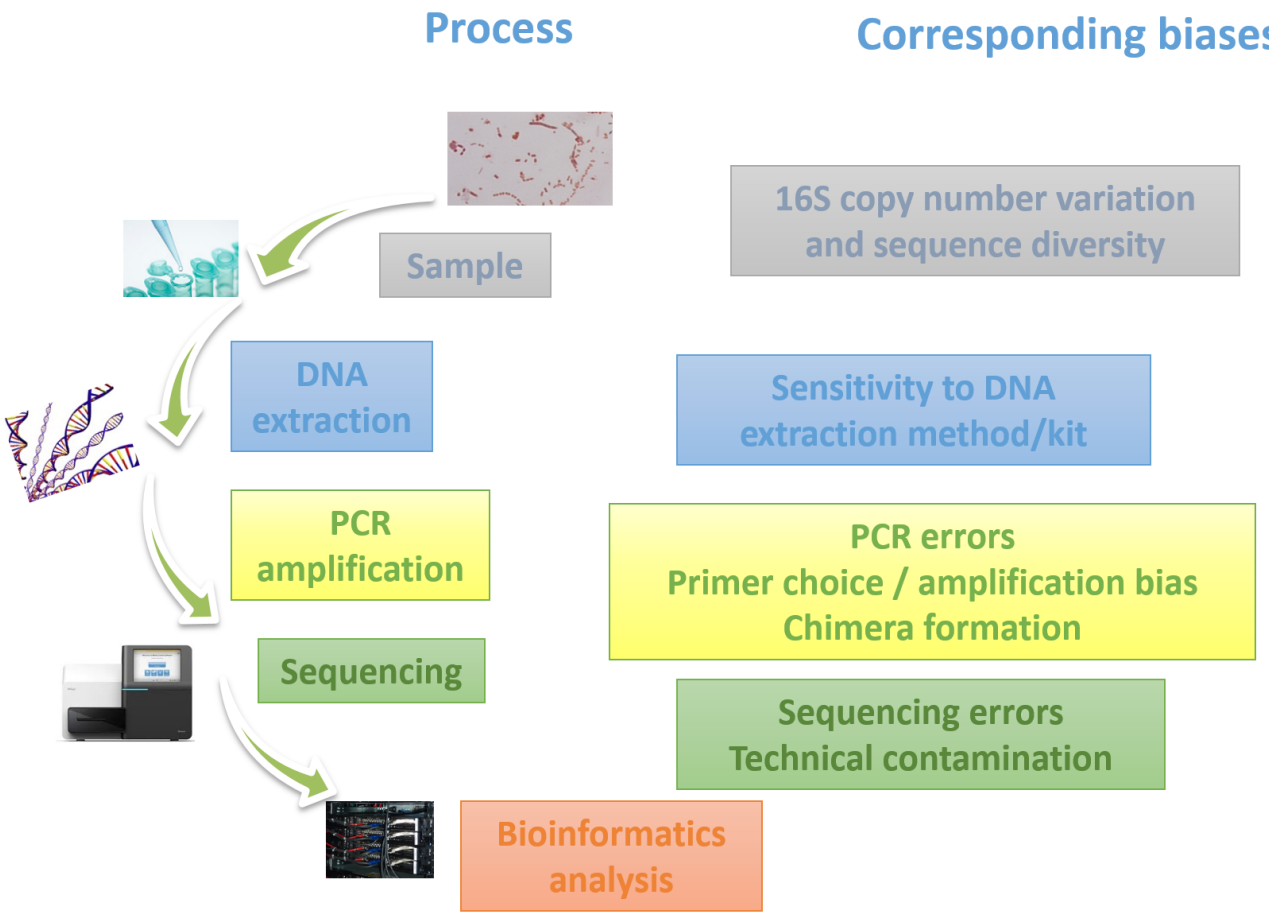
Méta-génétique (la partie biologique)



Les espèces les + abondantes sont les plus amplifiées.
Erreur possible de la PCR.
Chimères : mélange de plusieurs 16S d'origine différentes (5 à 45% des reads).

1. Introduction

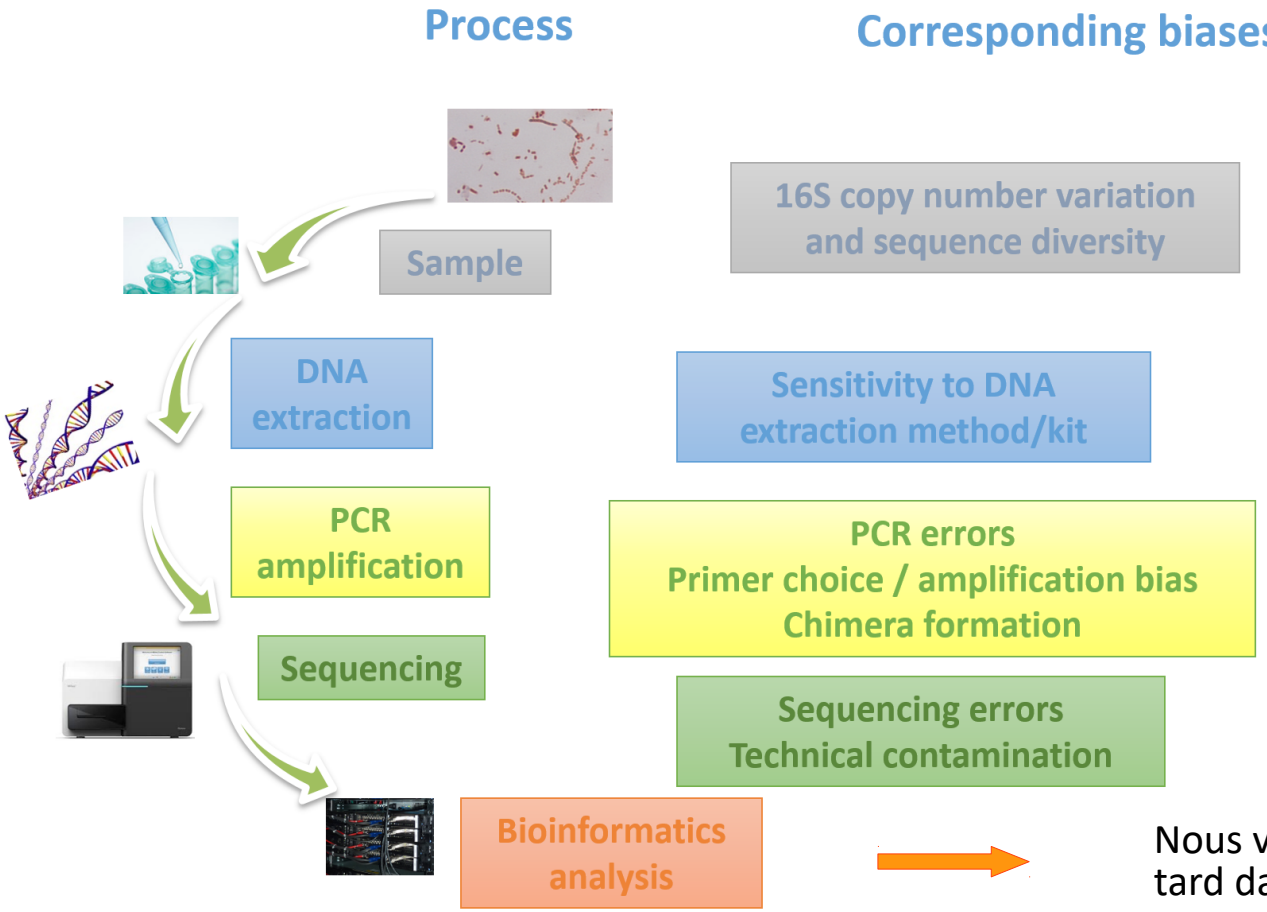
Méta-génétique (la partie biologique)



Erreur de séquençage (0,3% pour le MiSeq).
Contamination technique (entre runs, dans un même run)

1. Introduction

Méta-génétique (la partie biologique)



Nous verrons les biais plus tard dans la présentation

1. Introduction

Méta-génétique (partie biologique) : résumé des biais

Biais biologiques :

- nombre variable de copies de l'ARN 16S
- diversité intra-organisme
- la diversité des séquences diffère selon les clades. Certaines séquences ne varient pas.

1. Introduction

Méta-génétique (partie biologique) : résumé des biais

Biais biologiques :

- nombre variable de copies de l'ARN 16S
- diversité intra-organisme
- la diversité des séquences diffère selon les clades. Certaines séquences ne varient pas.

Biais techniques :

- erreurs de PCR
- erreurs de séquençage
- biais d'amplification par PCR
- chimères
- méthodes d'extraction de l'ADN / kit
- contamination technique
- faible quantité d'ADN
- choix du séquenceur

1. Introduction

Méta-génétique (partie biologique) : résumé des biais

Biais biologiques :

- nombre variable de copies de l'ARN 16S
- diversité intra-organisme
- la diversité des séquences diffère selon les clades. Certaines séquences ne varient pas.

Biais techniques :

- erreurs de PCR
- erreurs de séquençage
- biais d'amplification par PCR
- chimères
- méthodes d'extraction de l'ADN / kit
- contamination technique
- faible quantité d'ADN
- choix du séquenceur

Biais humains :

- contamination des échantillons
- choix de la région variable à amplifier
- choix des primers

1. Introduction

Méta-génétique (partie biologique) : résumé des biais

Biais biologiques :

- nombre variable de copies de l'ARN 16S
- diversité intra-organisme
- la diversité des séquences diffère selon les clades. Certaines séquences ne varient pas.

Biais techniques :

- erreurs de PCR
- erreurs de séquençage
- biais d'amplification par PCR
- chimères
- méthodes d'extraction de l'ADN / kit
- contamination technique
- faible quantité d'ADN
- choix du séquenceur

Biais humains :

- contamination des échantillons
- choix de la région variable à amplifier
- choix des primers

Biais sur la région variable choisie : donne pas les mêmes résultats surtout en terme d'abondance relative
On ne peut pas comparer les analyses faites sur des Vi différents
Si on veut comparer deux analyses il faut choisir les mêmes primers et les mêmes régions variables.
De plus la région choisie influence le nombre de chimères

1. Introduction

Méta-génomique (la partie biologique)

Échantillonnage et extraction de l'ADN :

- Il dépend du milieu analysé (eau, sol, excréments...)
- Un filtre sur la taille est souvent fait pour discriminer les virus, les bactéries et les eucaryotes unicellulaires.
- Le stockage, l'exposition à l'oxygène entraînent des biais ==> il est donc indispensable que les échantillons à comparer aient tous subis le même protocole d'extraction.

1. Introduction

Méta-génomique (la partie biologique)

Échantillonnage et extraction de l'ADN :

- Il dépend du milieu analysé (eau, sol, excréments...)
- Un filtre sur la taille est souvent fait pour discriminer les virus, les bactéries et les eucaryotes unicellulaires.
- Le stockage, l'exposition à l'oxygène entraînent des biais ==> il est donc indispensable que les échantillons à comparer aient tous subis le même protocole d'extraction.

Préparation des librairies :

- Selon la quantité d'ADN extraite, il est possible qu'une PCR soit nécessaire
- L'amplification est à éviter à cause des biais importants qu'elle engendre

1. Introduction

Méta-génomique (la partie biologique)

Échantillonnage et extraction de l'ADN :

- Il dépend du milieu analysé (eau, sol, excréments...)
- Un filtre sur la taille est souvent fait pour discriminer les virus, les bactéries et les eucaryotes unicellulaires.
- Le stockage, l'exposition à l'oxygène entraînent des biais ==> il est donc indispensable que les échantillons à comparer aient tous subis le même protocole d'extraction.

Préparation des librairies :

- Selon la quantité d'ADN extraite, il est possible qu'une PCR soit nécessaire
- L'amplification est à éviter à cause des biais importants qu'elle engendre

Séquençage :

- L'assemblage étant une étape complexe, des reads longs (ONT : Oxford Nanopore Technology – encore trop d'erreurs - , PACBIO HiFi ou 10X chromium – linked reads -) sont à considérer
- Mais le coût est très important et les outils en cours de développement. Actuellement un séquençage Illumina NovaSeq est le plus souvent pratiqué.
- Ce qui permet une grande profondeur de séquençage mais les reads sont courtes (2x150 pb, quelques milliards de paires de reads par flowcell, jusqu'à 10 pour le NovaSeq)
- Intéressant lorsqu'on veut avoir accès aux espèces rares dans le milieu étudié.

1. Introduction

Les principales technologies de séquençage

- **Illumina :** NovaSeq
  https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq/specifications.html

- **Pacbio** HiFi vs CLS
  https://www.pacb.com/technology/hifi-sequencing/
  https://www.pacb.com/technology/hifi-sequencing/sequel-system/
  https://www.pacb.com/revio/

- **ONT** (Oxford nanopore technologie)
  https://nanoporetech.com/how-it-works/basecalling
  https://nanoporetech.com/q20plus-chemistry

Genotoul Bioinfo

1. Introduction
2. Applications
3. Analyses méta-omiques
   3.1. La méta-génétique
   3.2. La méta-génomique
4. Analyses exploratoires
5. Impact carbone du calcul

2. Applications

Science environnementale :

- Cycles des éléments fondamentaux (carbone, azote…)
- Contrôle de la pollution voir dépollution
- Ecologie / évolution

2. Applications

Science environnementale :

- Cycles des éléments fondamentaux (carbone, azote…)
- Contrôle de la pollution voir dépollution
- Ecologie / évolution

Applications industrielles :

- épuration des eaux usées
- prospection biologique (pour trouver de nouvelles molécules, enzymes, antibiotiques etc..)
- nouvelles biosynthèses
- fermentations (yaourts…)

2. Applications

Science environnementale :

- Cycles des éléments fondamentaux (carbone, azote…)
- Contrôle de la pollution voir dépollution
- Ecologie / évolution

Applications industrielles :

- épuration des eaux usées
- prospection biologique (pour trouver de nouvelles molécules, enzymes, antibiotiques etc..)
- nouvelles biosynthèses
- fermentations (yaourts…)

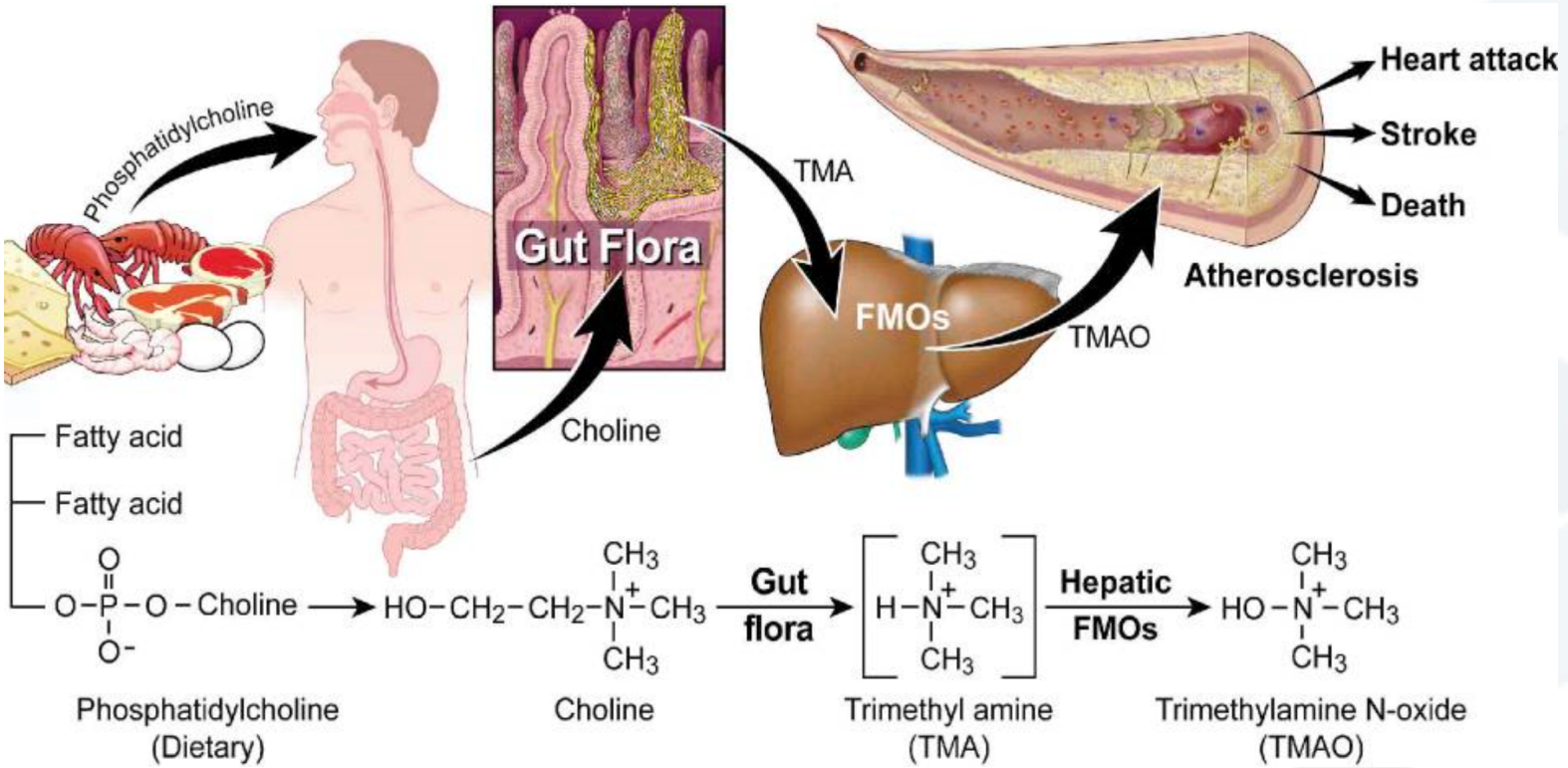
Santé humaine et animale :

- protection contre les pathogènes
- cancer
- absorption des nutriments
- certaines maladies chroniques (parodontite, maladie intestinale inflammatoire, par ex. La maladie de Crohn)

2. Applications

Quelques exemples

Impact sur les maladies cardiovasculaires
(Wang et al., 2011)



Genotoul Bioinfo

2. Applications

Quelques exemples

Influence sur le cancer colorectal (Sears, C. L., & Garrett, W. S., 2014).

Table 1. Criteria for Disease Causation: Human Colorectal Cancer and Putative Bacterial Protagonists

Criteria[a]	*S. gallolyticus*	ETBF	*E. faecalis*	*E. coli*	*F. nucleatum*
Epidemiology[b]	+	+	–	+	+
Measurable immunological responses[c]	+	–	–	–	–
Experimental disease reproduction[d]	–	+	+	+[e]	+
Biological plausability[f]	±	+	±	+	+
Elimination or modification of agent prevents disease[g]	–	–	–	–	–

Presence or absence of data is noted by + (present) or – (absent); ± denotes overall data are variable.

[a]Adapted from Evans (1976) and Fredericks and Relman (1996).

[b]Epidemiology encompasses several types of evidence, including prevalence, exposure, or incidence of disease significantly higher in those exposed to the putative cause than controls; data comparing cases and controls should show consistency and strength of association; a range of controls should be evaluated to assess specificity of the epidemiologic association; temporality (exposure antedates disease development).

[c]Only data assessing human immunologic responses are considered.

[d]Experimental disease induction refers to animal models demonstrating increased colon carcinogenesis by the listed bacterium.

[e]Experimental model data are only available for *E. coli* possessing the pks island.

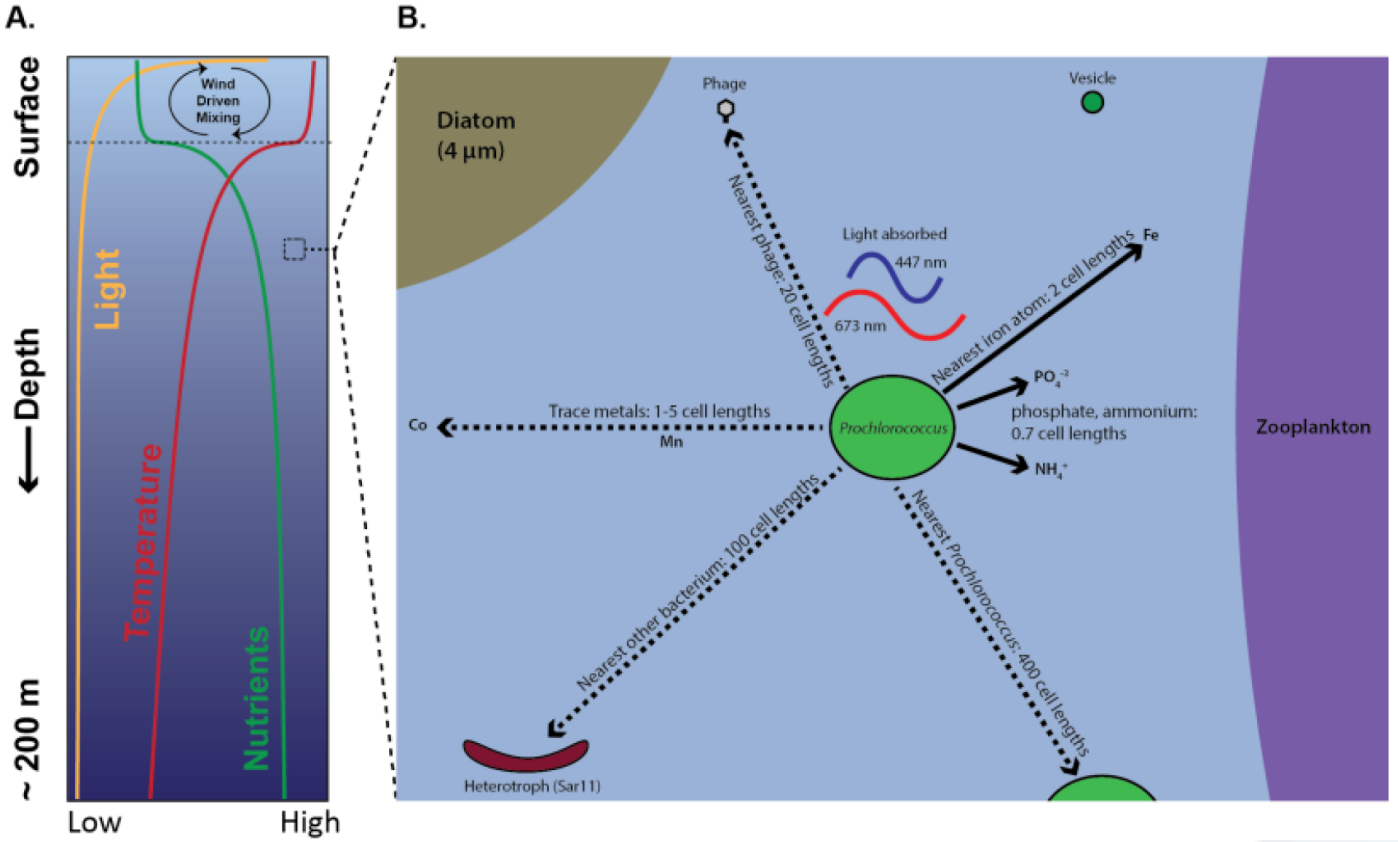
[f]Biologic plausibility reflects the authors' judgment of the strength of the data available at present regarding the potential role of the bacterial protagonist in human CRCs.

[g]Elimination or modification of agent prevents disease refers to human studies such as use of antibiotics, probiotics, or vaccines to prevent disease. As yet, no such studies are reported for these bacteria and CRC.

2. Applications

Quelques exemples

Environnement : *Prochlorococcus*
(Biller et al, 2014).
L'organisme photosynthétique le plus abondant et le plus petit sur terre.



2. Applications

Quelques exemples

Environnement : *Prochlorococcus* (Biller et al, 2014).
ITS : Internal transcribed spacer

	clade II/III[37]		
LLIV	eMIT9313[29], High-B/A *Prochlorococcus* clade IV[37]	MIT9303, MIT9313, MIT0701	Typically most abundant near the base of the euphotic zone; highly susceptible to light shock[35,37].
LLV		None	Found maximally abundant in the lower euphotic zone of oxygen minimum zones when oxygen depleted layers extend into the upper water column[56].
LLVI		None	Found maximally abundant in the lower euphotic zone of oxygen minimum zones when oxygen depleted layers extend into the upper water column[56].
LLVII	NC1[36]	None	Sequences were identified in the lower euphotic zone of subtropical waters; little is known about this clade[36].

[a] Originally defined as separate clades[37], the LLII and LLIII clades are now grouped because their separation is not well resolved phylogenetically.
[b] Two publications[49,50] assigned the names HNLC1 and HNLC2 to different clades; moving forward, we suggest the use of the HLIII and HLIV nomenclature to refer to these clades[47,48].
[c] For more information on these and other strains, see[10,44,60] and references therein.

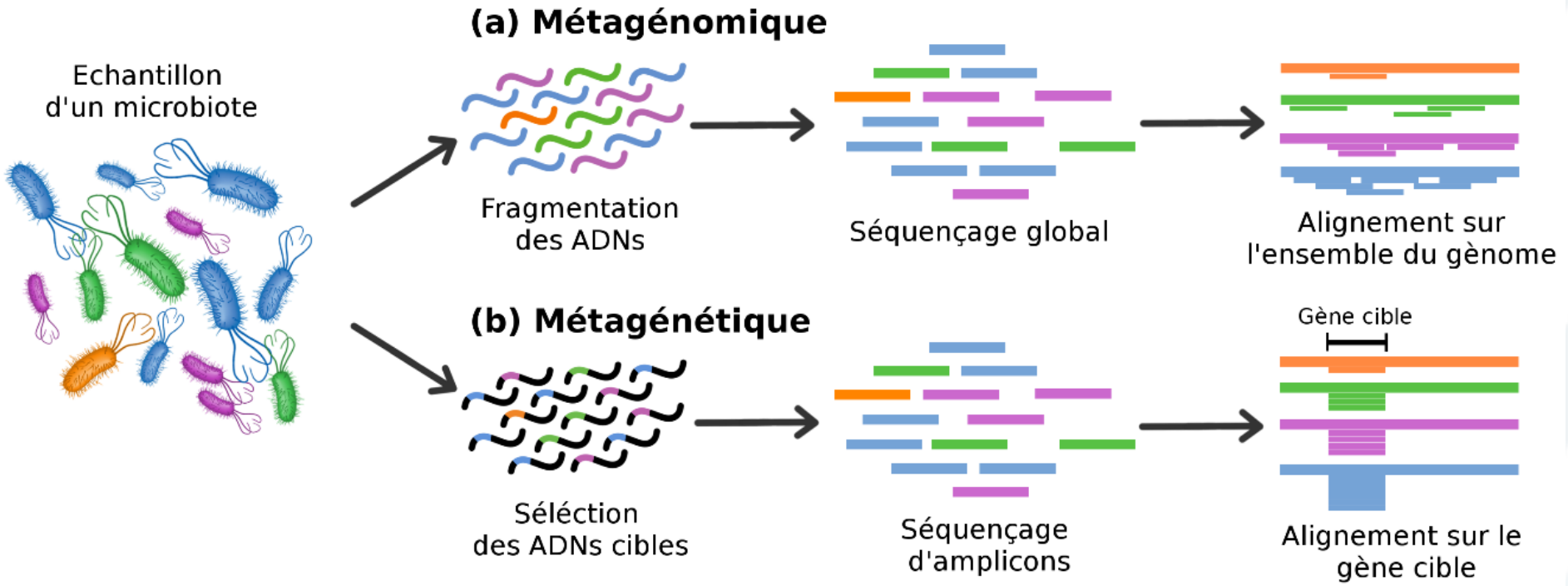
Table 1. The major clades of *Prochlorococcus* as defined by rRNA ITS sequences.

Clade Name	Alternate names in the literature for the same ribotype	Representative cultured strains[c]	Habitat where relatively more abundant, and/or where isolated
HLI	eMED4[29], Low-B/A *Prochlorococcus* clade I[37]	MED4, MIT9515	Isolated from the upper/mid euphotic zone, typically from the subtropical ocean. Their distribution is shifted to higher latitudes, due to a relatively low temperature growth optimum[31,33-35].
HLII	eMIT9312[29], Low-B/A *Prochlorococcus* clade II[37]	AS9601, MIT9215, MIT9312, SB	Often found throughout the euphotic zone; typically among the most abundant *Prochlorococcus* group in the water column. Especially abundant at lower latitudes, due to a relatively high temperature growth optimum[31,33-35].
HLIII	HNLC1[47,50]; HNLC2[49,b]	None	Sequences from high nutrient, but low chlorophyll containing equatorial waters, typically between 10 °N – 10 °S in the Pacific and Indian oceans. These regions are typically limited by iron availability, and sequence data suggests that these cells have adaptations for reducing cellular iron requirements[47-50].
HLIV	HNLC1[49]; HNLC2[47,50,b]	None	Sequences from high nutrient, but low chlorophyll containing equatorial waters, typically between 10 °N – 10 °S in the Pacific and Indian oceans. These regions are typically limited by iron availability, and sequence data suggests that these cells have adaptations for reducing cellular iron requirements[47-50].
HLV		None	HLV sequences have been found in surface equatorial waters typically limited by iron availability. Physiological distinctions between the HLIII, HLIV and HLV clades are not known[47].
HLVI		None	Sequences were identified in the mid/lower euphotic zone (75-150m) of the South China Sea. This group has been postulated to have an intermediate light optimum[47].
LLI	eNATL2A[29], High-B/A *Prochlorococcus* clade I[37]	NATL1A, NATL2A, PAC1	Typically most abundant in the middle euphotic zone of stratified waters. Unlike other LL clades, they often remain abundant in mixed waters throughout the water column due to their ability to tolerate light shock[35,37].
LLII/III[a]	eSS120/eMIT9211[29], High-B/A *Prochlorococcus*	MIT9211, SS120	Typically found in the middle/lower euphotic zone[35,37,44].

Genotoul Bioinfo

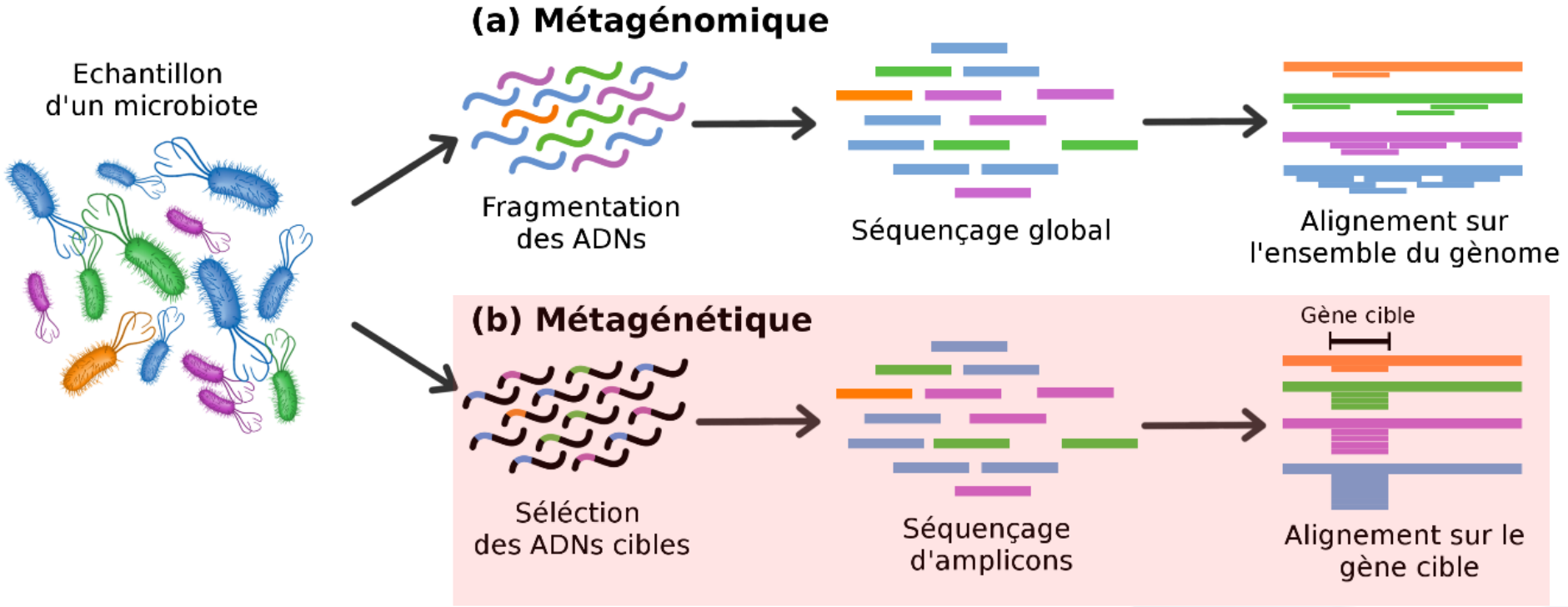
3. Analyses méta-omiques

Méta-génétique & méta-génomique



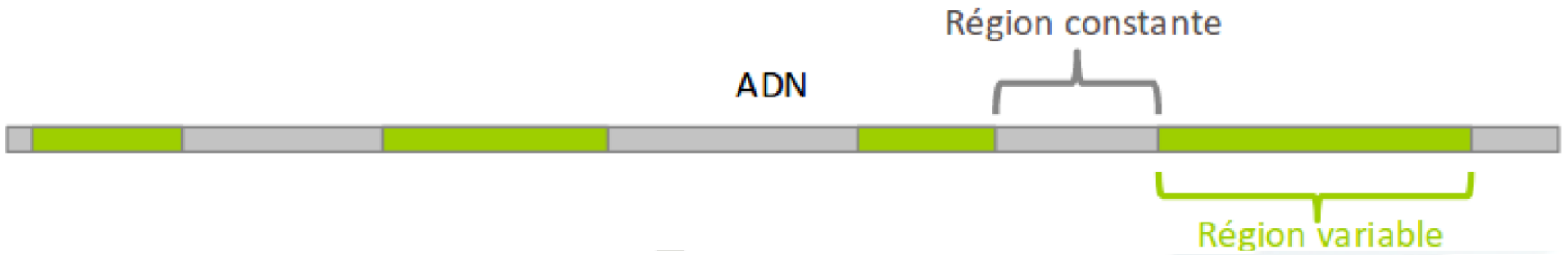
3. Analyses méta-omiques

Méta-génétique & méta-génomique



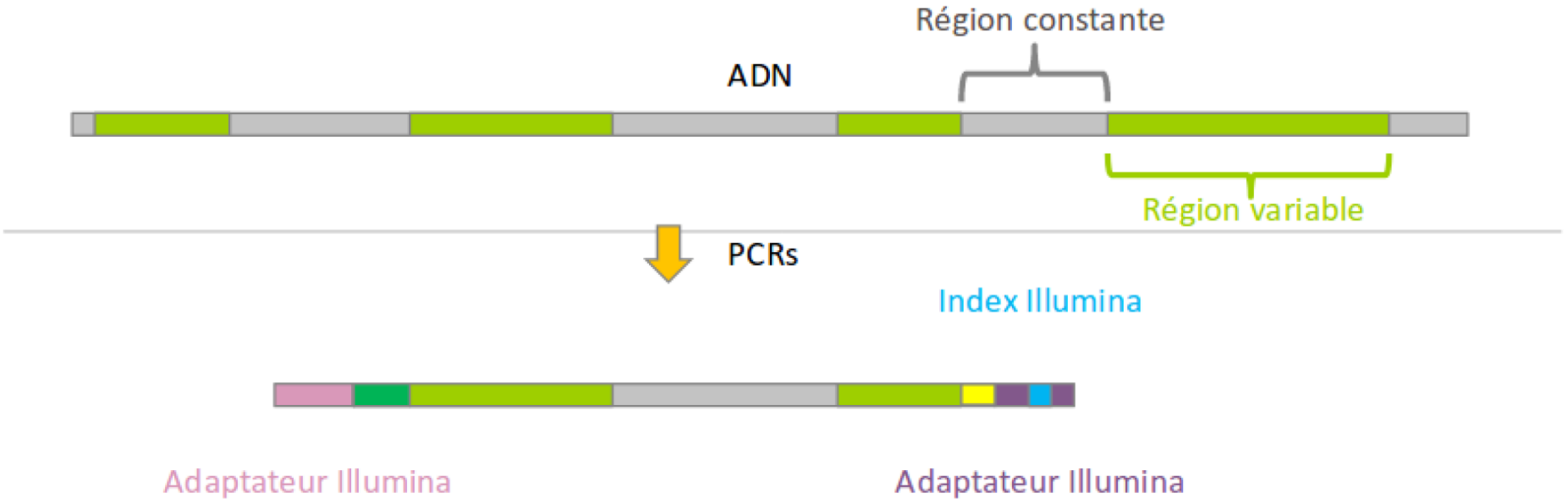
3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – les données



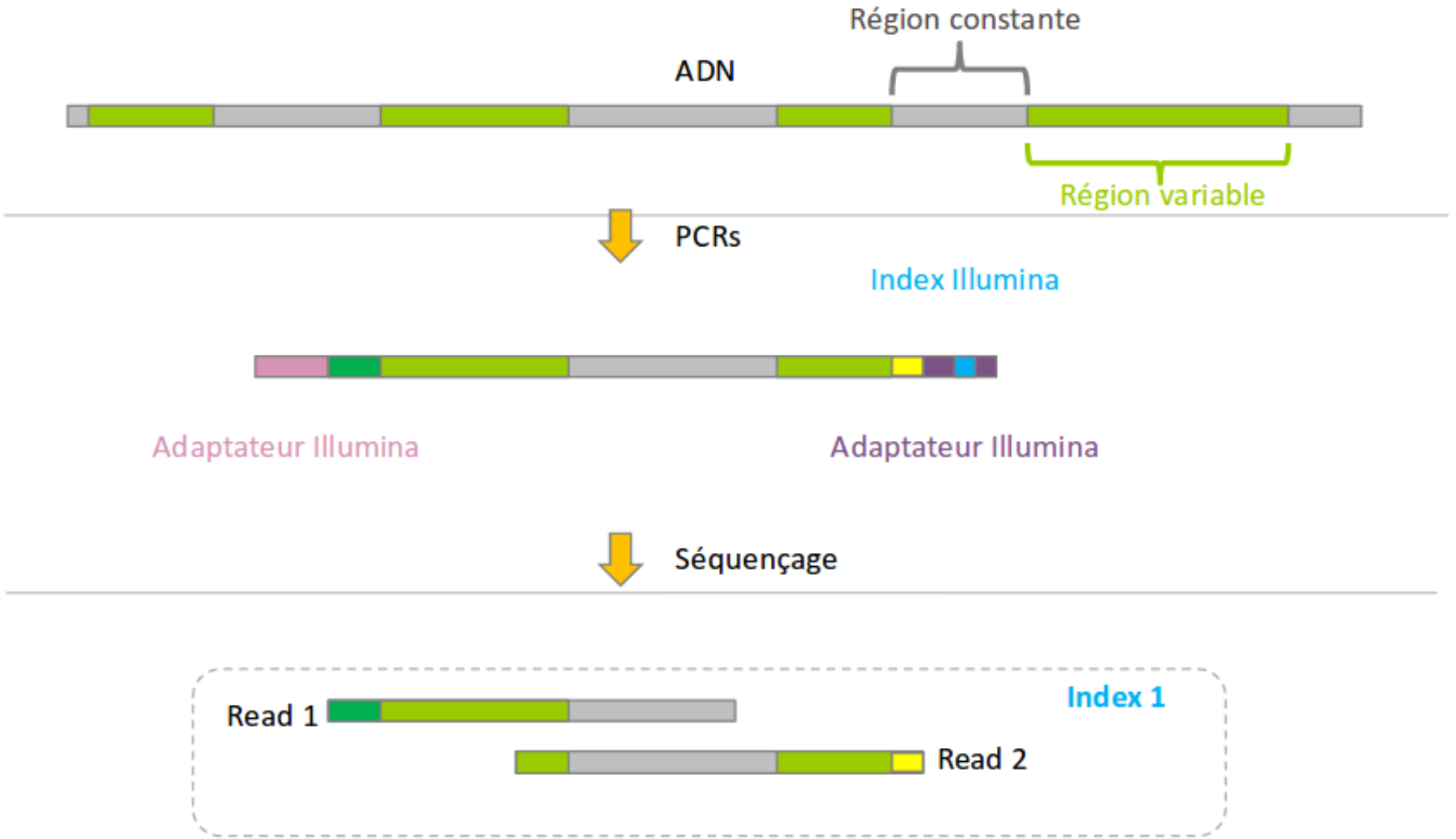
3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – les données



3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – les données



3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

Chimère 2

Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

- Supprimer les séquences dont la taille ne corresponde pas à la taille attendue,
- Supprimer les séquences avec trop de bases ambiguës (N),
- Supprimer les séquences avec trop de mismatchs avec les primers,
- Dé-réplication des séquences.

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

Chimère 2

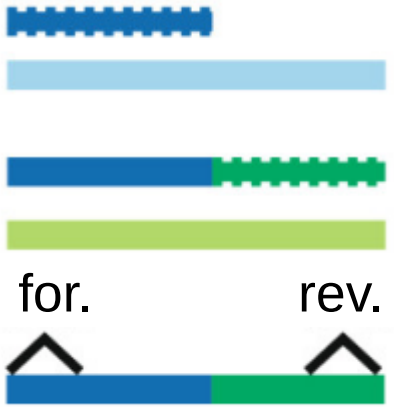
Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

Définition : principalement produits lors de la phase de PCR lorsqu'un amplicon avorté joue le rôle de primeur pour un template hétérologue.
La séquence a une taille similaire et contient le primer forward et reverse.

Schloss, 2011 : 5 à 45 % de lectures



amplification ayant avortée

« primer » du cycle suivant

séquence chimérique

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Détection :

- recherche des séquences parentes
- validation croisée entre échantillon

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

Chimère 2

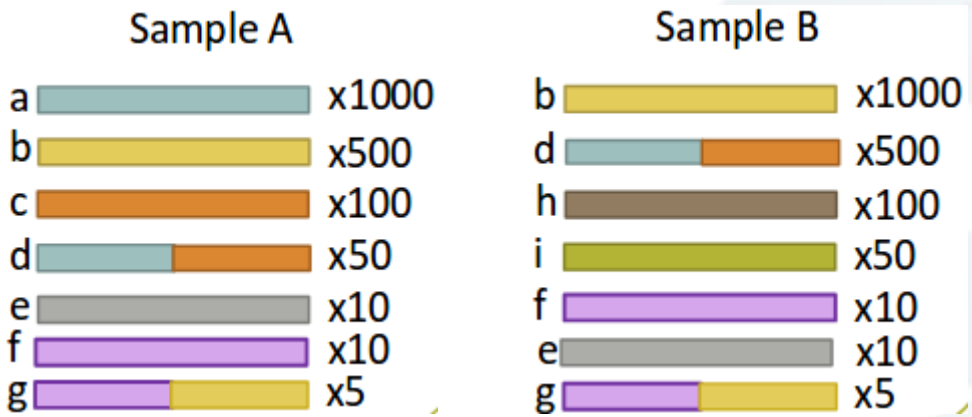
Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

Détection :

- recherche des séquences parentes
- validation croisée entre échantillon



Genotoul Bioinfo

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

Chimère 2

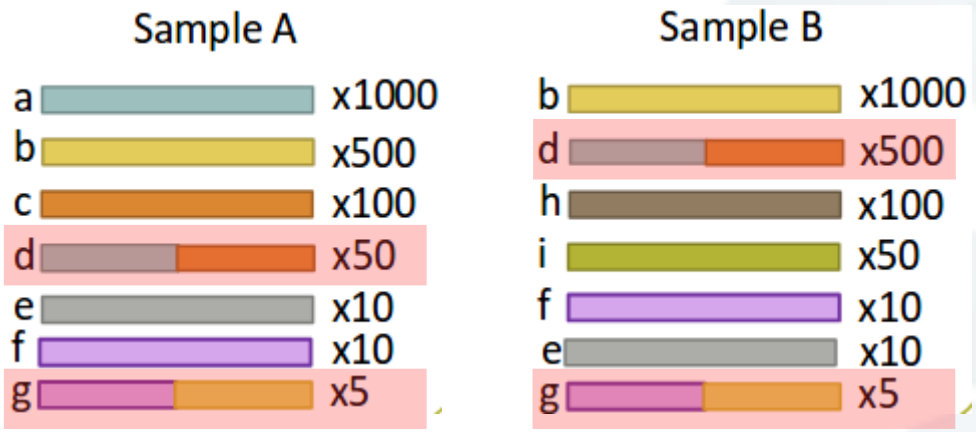
Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

Détection :

- recherche des séquences parentes
- validation croisée entre échantillon



3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

Chimère 2

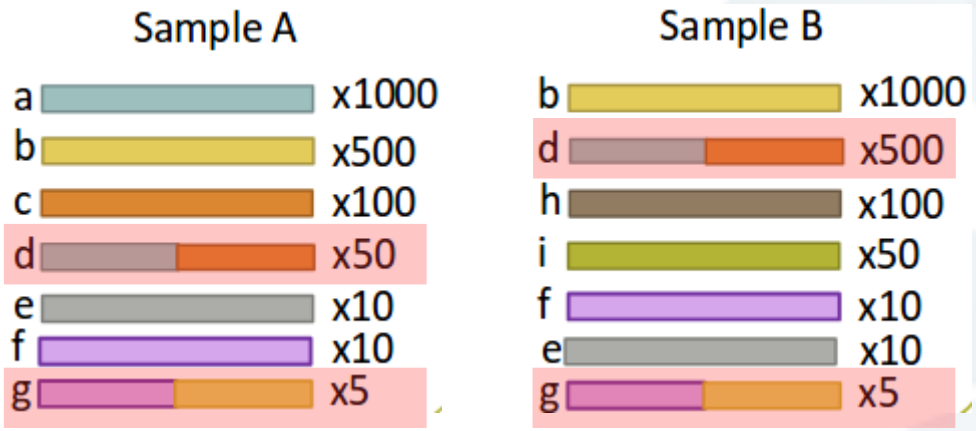
Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

Détection :

- recherche des séquences parentes
- validation croisée entre échantillon



d n'est pas une chimère
g est une chimère

Outils : Uchime, ChimeraSlayer, Uparse, CATCh

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

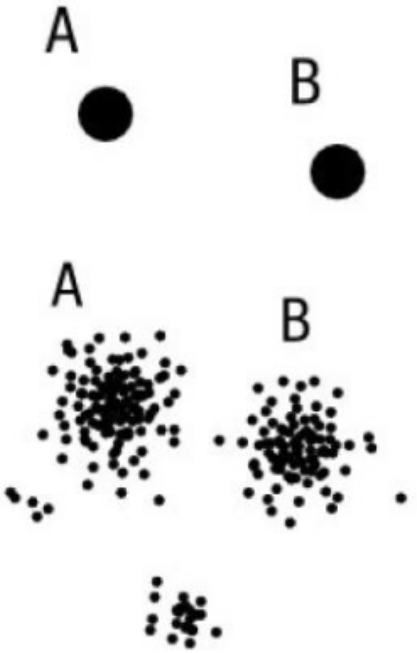
Chimère 2

Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

Objectif : regrouper les séquences appartenant à la même Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) ~ espèce.



Ce qui est attendu

La réalité

Causes : Variabilité naturelle, erreurs techniques, contaminations, chimères, ...

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

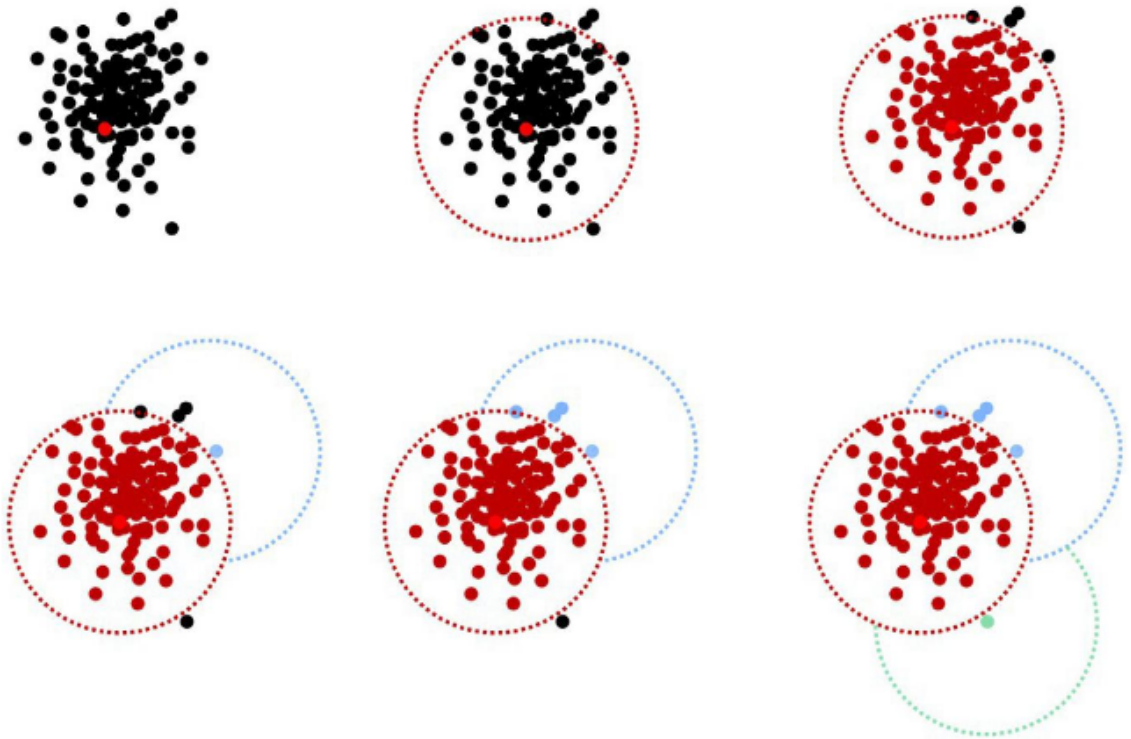
Chimère 2

Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

Algorithmes gloutons



3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

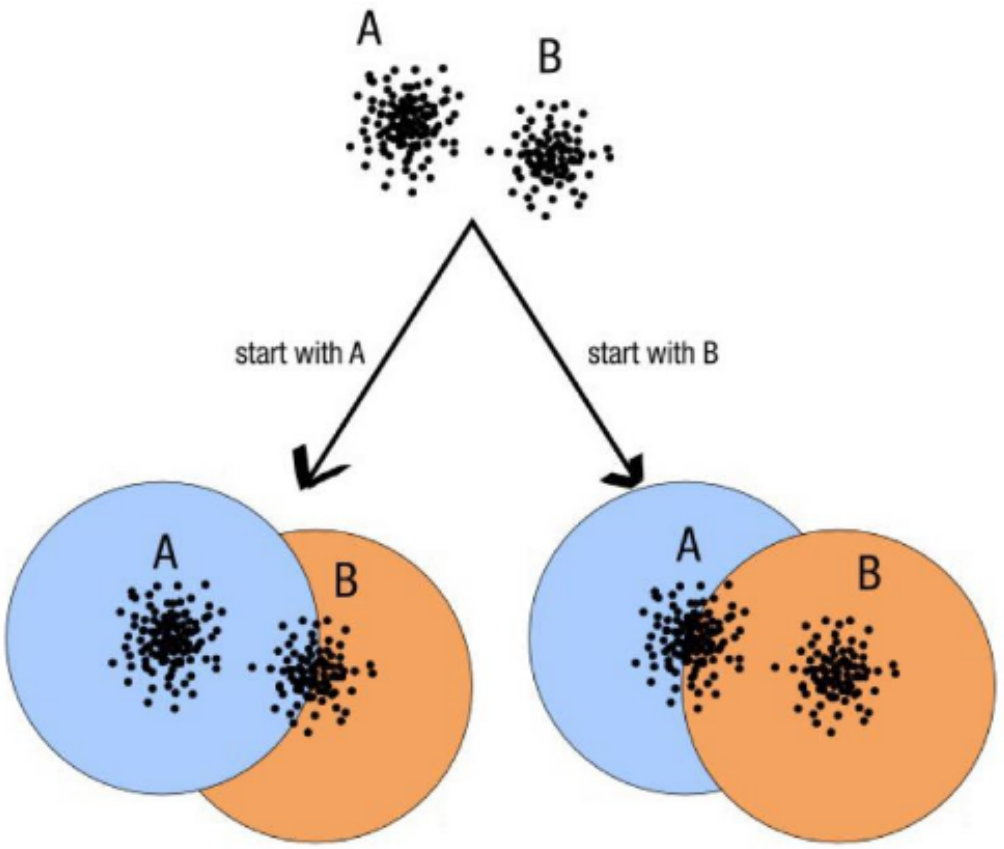
Chimère 2

Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

Algorithmes gloutons : dépendant de l'initialisation



3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Pre-process 1

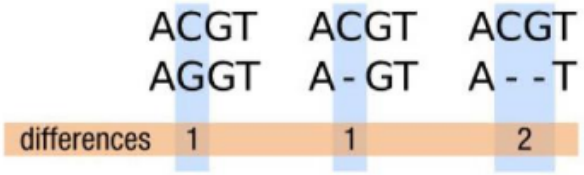
Chimère 2

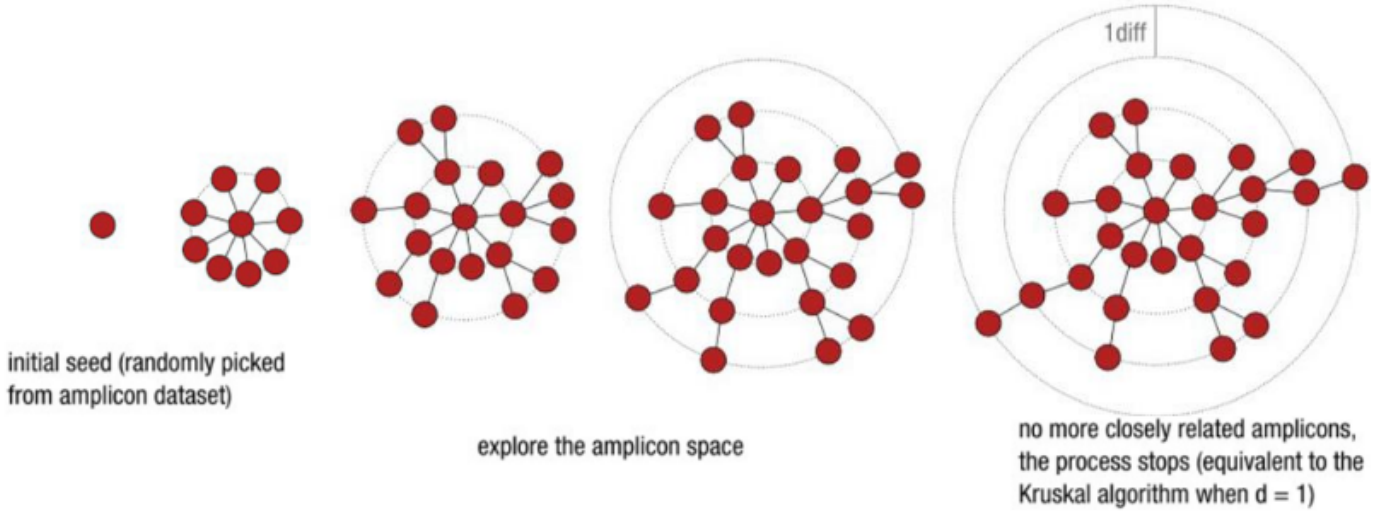
Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5

SWARM (Mahé, 2014) : clustering robuste et rapide adapté à de grand jeu de données.





3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

Outils : RDPclassifier, Megablast, Blast, Rtax.

Base de données : Silva, Greengenes, LTP, bases de données dédiées.

Genotoul Bioinfo

3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – le workflow

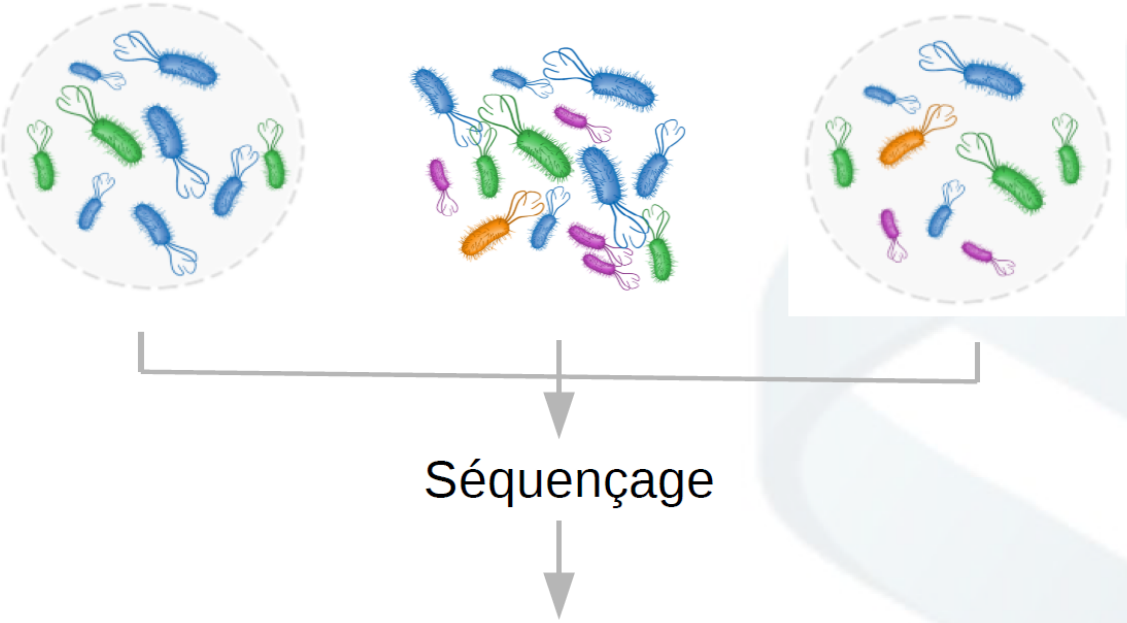
Pre-process 1

Chimère 2

Clustering 3

Assignation taxonomique 4

Table d'abondances 5



échantillon 1	6	3	0	0
échantillon 2	6	3	4	1
échantillon 3	3	3	2	1

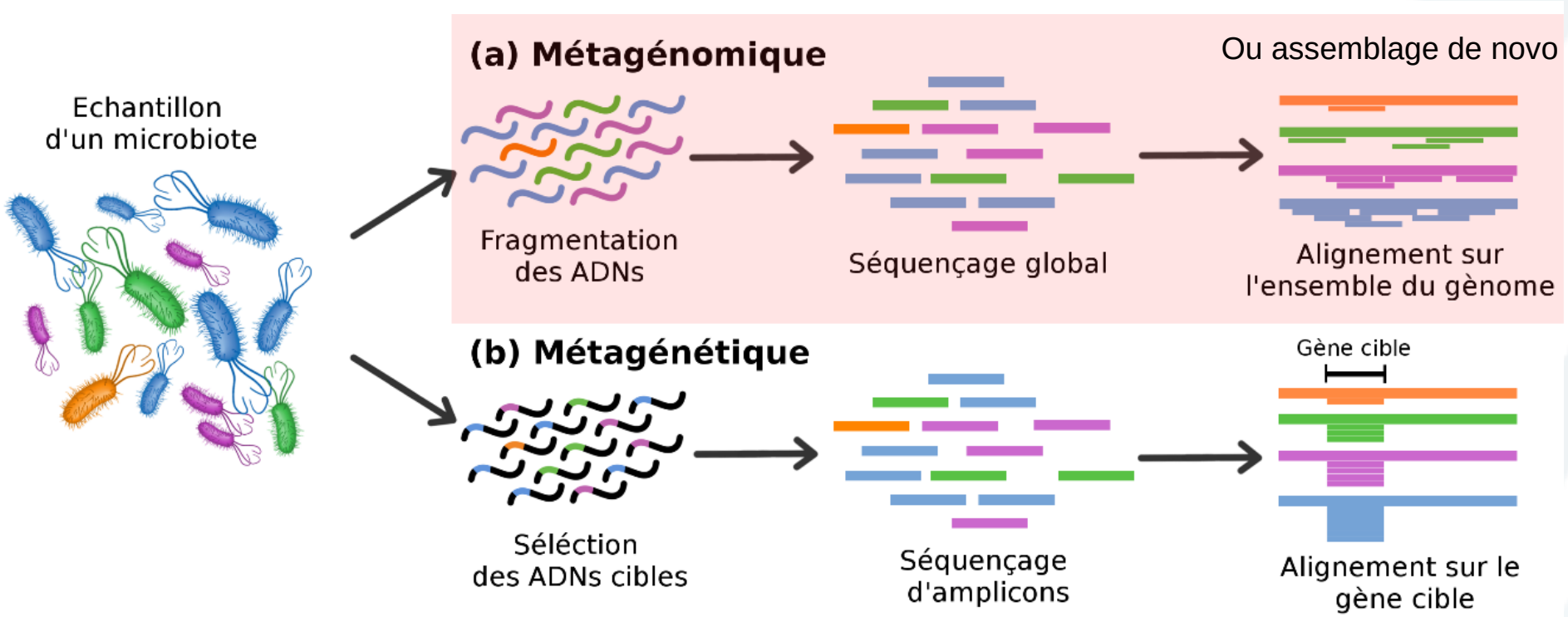
3. Analyses méta-omiques

La méta-génétique – les outils

QIIME	
UPARSE	https://www.drive5.com/uparse/
MOTHUR	https://www.mothur.org
MG-RAST	http://metagenomics.anl.gov
FROGS	http://frogs.toulouse.inra.fr

3. Analyses méta-omiques

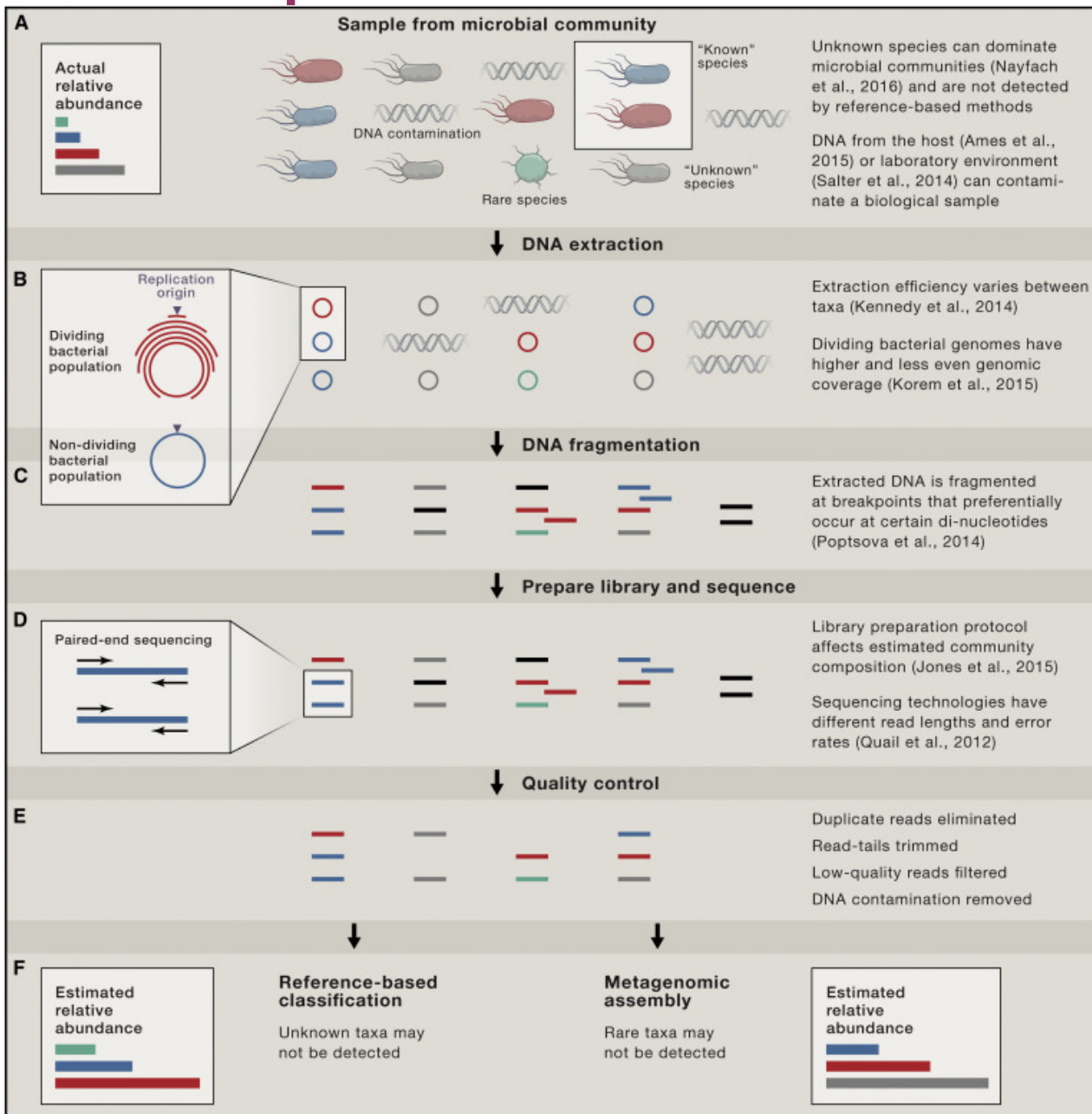
Méta-génétique & méta-génomique



https://www.youtube.com/watch?v=DlQTXdb2rhg&list=PLOPiWVjg6aTzsA53N19YqJQeZpSCH9QPc&index=23
Dan Knights Videos

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – les données



Nayfach, S., & Pollard, K. S. (2016).

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – le(s) workflow(s)

Le workflow d'analyse est beaucoup moins bien établi qu'en métagénétique, bien qu'il y en ait un florilège depuis quelques temps.
Il dépend de la question posée, de la quantité de données…

Les données brutes issues des analyses de métagénomiques sont complexes et bruitées.
Imaginez de l'ordre de ~1000 puzzles de millions de pièces avec des erreurs à reconstruire. De plus pour la plupart on ne connaît pas le modèle !
Extraire de l'information biologique de jeux de données de cette taille est un challenge et nécessite de grosses ressources de calcul.

Genotoul Bioinfo

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – quelques étapes svt rencontrées

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – quelques étapes svt rencontrées

Pre-process 1

Assemblage Alignements 2

Annotation des contigs Comptages 3

Création du catalogue de gènes 4

Binning des contigs 5

Tables d'abondance taxonomiques et fonctionnelles 6

Short / long (HiFi) si outil spécifique
Vérification de la qualité :
- fastQC

Enlever les adaptateurs :
- cutadapt (SR)

Trimmer les bases sur leur qualité de séquençage :
- sickle / Smrtlink (Pacbio, lors du séquençage)

Vérifier rapidement la composition taxonomique à partir des reads :
- kraken2, metaPhlan3, Kaiju… / Megan-LR (Huson et al. 2018), Pb-metagenomics-tools

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – quelques étapes svt rencontrées

Assemblage :

- Approches basées sur les graphes de De Bruijn
  ==> chimères fréquentes
  - MetaVelvet, IDBA-UD, MetaSPAdes, Megahit…
  - MetaFlye, Hifiasm-meta, HiCanu ...

Alignement :

- bwa mem ou bowtie2 contre génomes ou catalogues de gènes de références / minimap2

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – quelques étapes svt rencontrées

Annotation structurale :
- Prokka (Prodigual), FragGeneScan...

Comptage :
- featureCount, HtSeqCount...

Annotation fonctionnelle :
- diamond (homology)
- Interproscan, EggNOG (HMM protein domains and families),

⇒ eggNogMapper (Cantalapiedra *et al.*, 2021)
- KEGG, metaCyc (metabolic pathways...)
- COG (cluster of orthologs genes)

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – quelques étapes svt rencontrées

Pre-process 1

Assemblage Alignements 2

Annotation des contigs Comptages 3

Création du catalogue de gènes 4

Binning des contigs 5

Tables d'abondance taxonomiques et fonctionnelles 6

Clustering des protéines :

- CD-Hit

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – quelques étapes svt rencontrées

Binning :

- clusteriser les contigs : obtenir des génomes drafts
- myCC, CONCOCT, MetaBat2, MaxBin2, solidBin

etc utilisent la composition en kmer, la profondeur de la couverture en read des contigs et les gènes marqueurs pour corriger les clusters (Lin et al, 2016 ; Alneberg et al, 2014, Wu et al, 2015, Kang et al., 2019, Wang et al. 2019)

- lancer plusieurs binners puis les combiner avec DASTool ou binning_refiner (Song et al, 2017 ; Sieber et al, 2018 ; bin_refinment de metawrap Uritsky et al. 2018) etc
- Evaluer la qualité des bins (CheckM2, Chklovski *et al.*, 2022 BioRxiv*)*
- dRep pour choisir le meilleur bin entre tous les bins de tous les échantillons (Olm *et al.*, 2017) ⇒ avoir un set de bins communs pour tous les échantillons ⇒ MAG (Metagenome Assembled Genome à l'espèce)

3. Analyses méta-omiques

La méta-génomique – quelques étapes svt rencontrées

Pre-process 1

Assemblage Alignements 2

Annotation des contigs Comptages 3

Création du catalogue de gènes 4

Binning des contigs 5

Tables d'abondance taxonomiques et fonctionnelles 6

Affiliation taxonomique (gènes puis contigs) :
- diamond : homology suivi d'un script algo LCA (lowest common ancester) ex CAT et BAT (Bastiaan von Meijenfeldt *et al.* 2019)

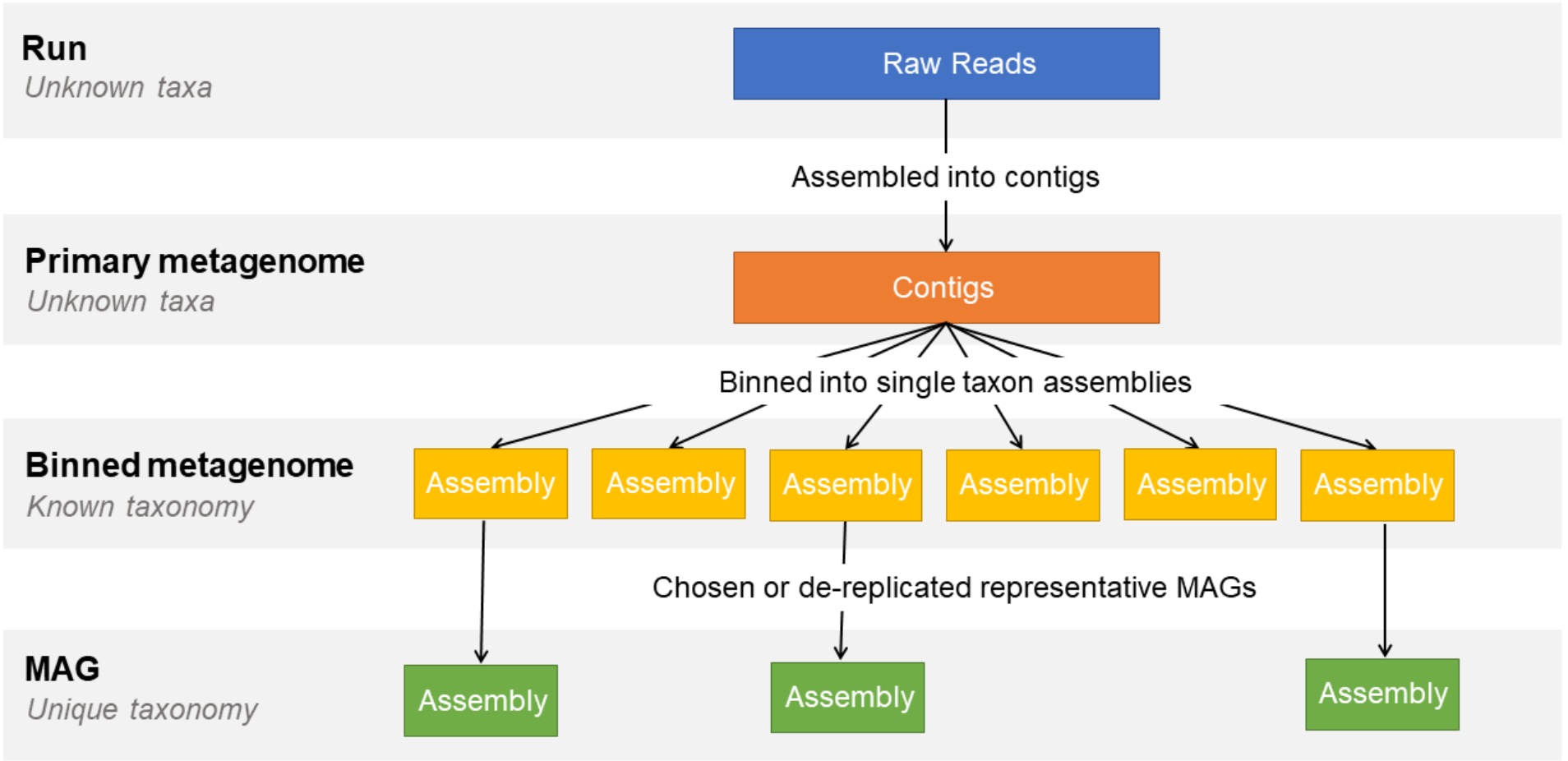
Affiliation taxonomique (bins) :
- Gtdb-tk (Chaumeil *et al.*, 2022)

Abondance fonctionnelle :
A partir de la matrice des comptages des gènes :
- profils d'abondance des orthologues (Kegg orthologie, COG, NOG)
- profils d'abondance des pathways (Kegg or MetaCyc pathways or GO terms)

Il s'agit en général d'abondance relative dans chaque échantillon

3. Analyses méta-omiques

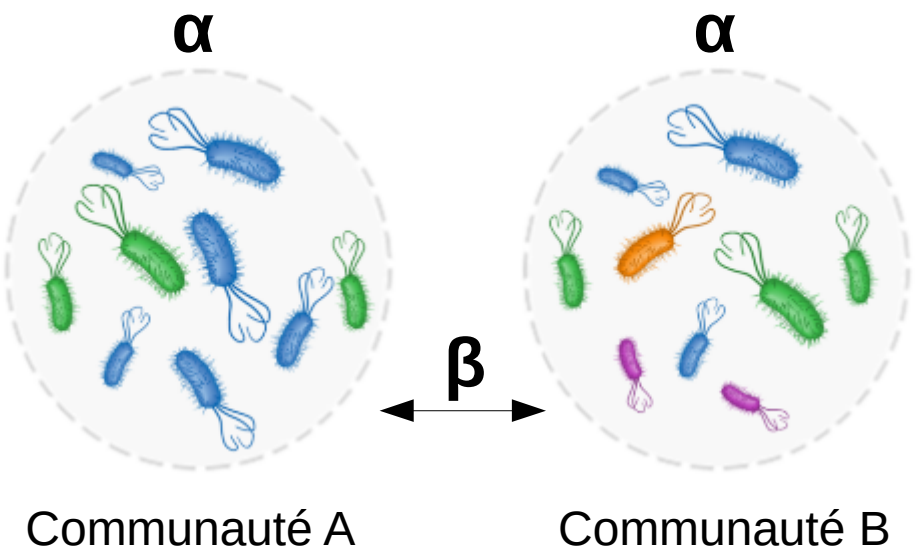
quelques rappels de vocabulaire



Genotoul Bioinfo

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité

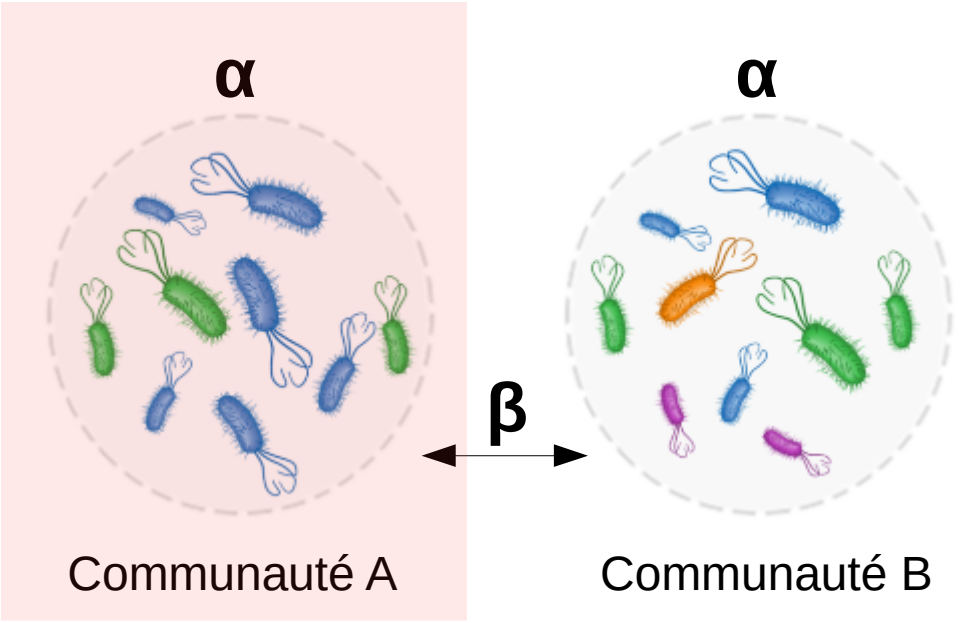


Diversité **α** = diversité au sein d'une communauté.

Diversité **β** = diversité entre communautés.

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité



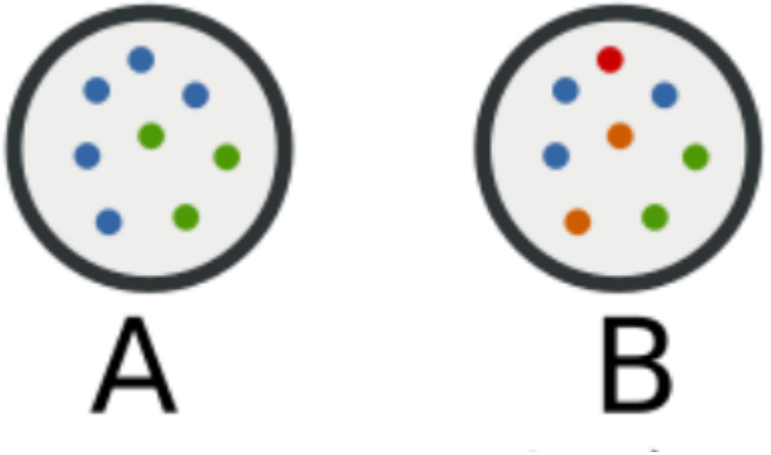
Diversité **α** = diversité au sein d'une communauté.

Diversité **β** = diversité entre communautés.

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **α**

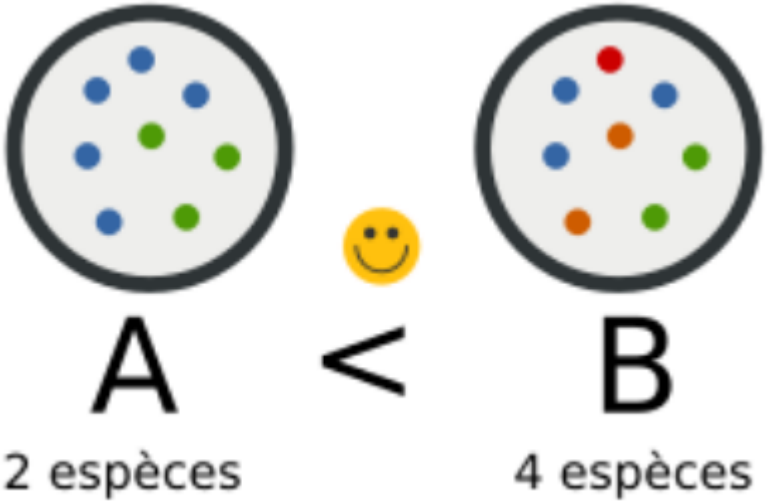
Richesse : nombre d'OTUs ou groupe fonctionnel au sein d'une communauté. Caractérise la composition.



4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **α**

Richesse : nombre d'OTUs ou groupe fonctionnel au sein d'une communauté. Caractérise la composition.



B est plus diversifié que A car il contient deux fois plus d'espèces.

4. Analyses exploratoires

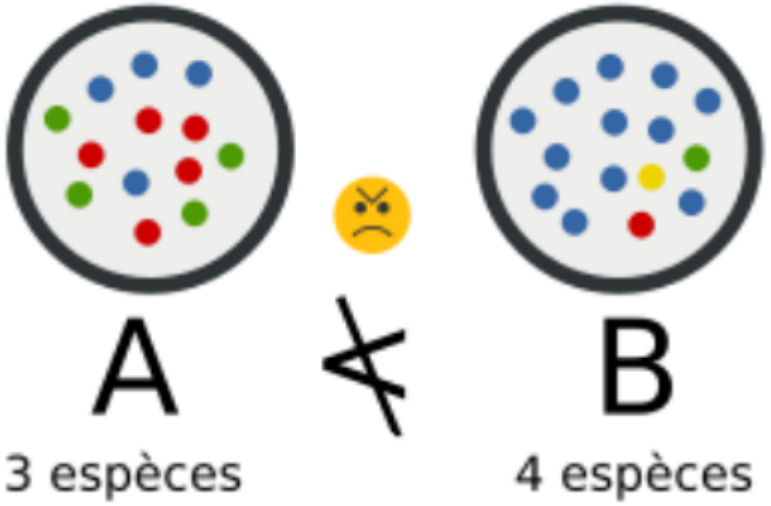
Analyse de la biodiversité – diversité **α**

Richesse : nombre d'OTUs ou groupe fonctionnel au sein d'une communauté. Caractérise la composition.

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **α**

Richesse : nombre d'OTUs ou groupe fonctionnel au sein d'une communauté. Caractérise la composition.



B contient plus d'espèce mais **semble moins diversifié** !

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **α**

Indice de Shannon : indice reflète aussi bien le nombre d'espèces que leurs abondances.

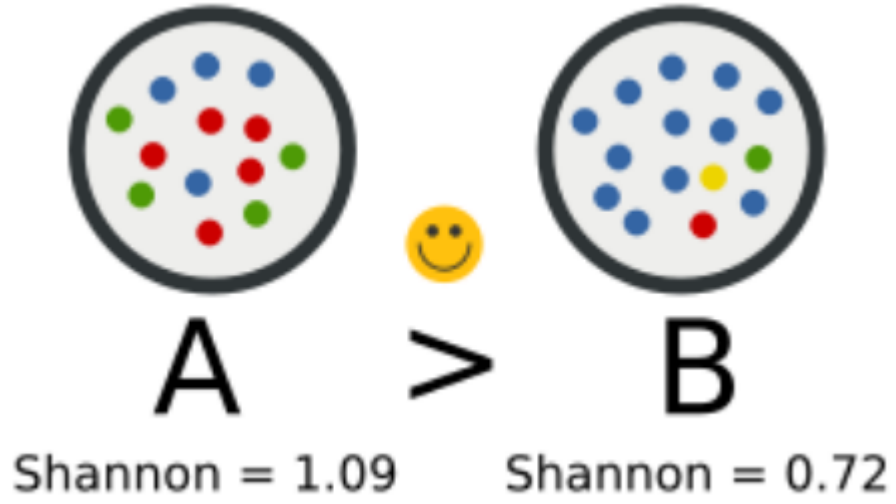
$$H(X) = H_2(X) = -\sum_{i=1}^{n} P_i \log_2 P_i .$$

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **α**

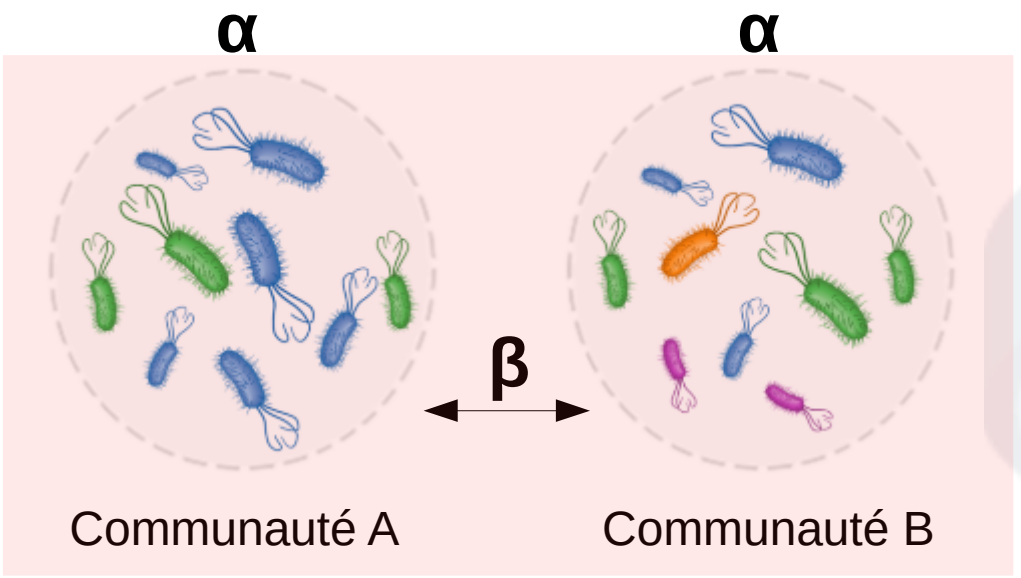
Indice de Shannon : indice reflète aussi bien le nombre d'espèce que leurs abondances.

$$H(X) = H_2(X) = -\sum_{i=1}^{n} P_i \log_2 P_i.$$



4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité



Diversité **α** = diversité au sein d'une communauté.

Diversité **β** = diversité entre communautés.

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **β**

Propriétés :

- échelonnées entre 0 et 1,
- 2 échantillons identiques : Dist(A,A) = 0
- Si aucun OTUs partagé entre 2 échantillon : Dist(A,B) = 1

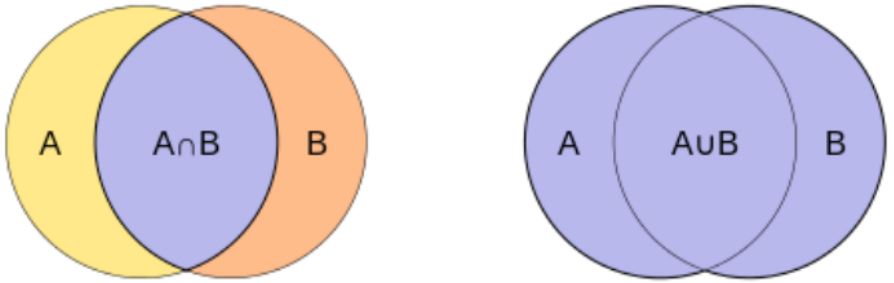
	Categorical	Phylogenetic
Presence/ Absence	Jaccard	Unifrac
Quantitative Abundance	Bray-Curtis	Weighted Unifrac

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **β**

Jaccard : Fraction d'espèce spécifique à la communauté A ou B.

$$Dist(A, B) = 1 - (A \cap B)/(A \cup B)$$
$$= ((\mathbf{x_A}>0) \,\&\, (\mathbf{x_B}>0))/((\mathbf{x_A}>0) \mid (\mathbf{x_B}>0))$$

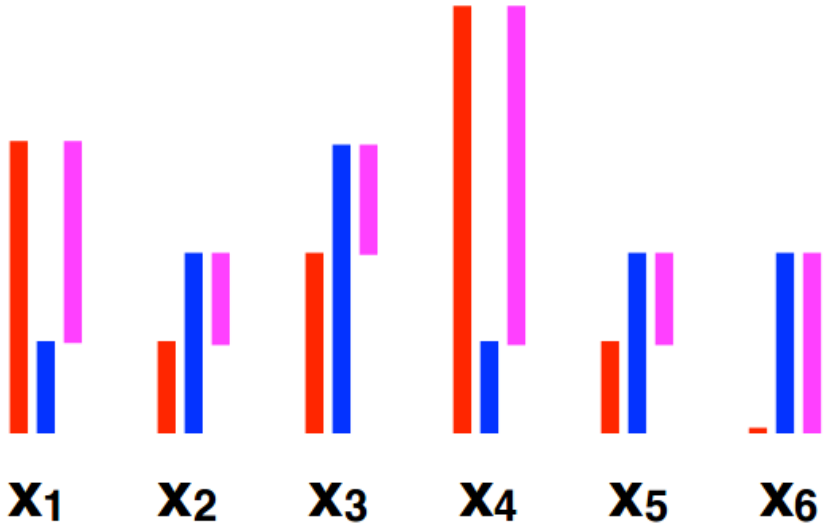


4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **β**

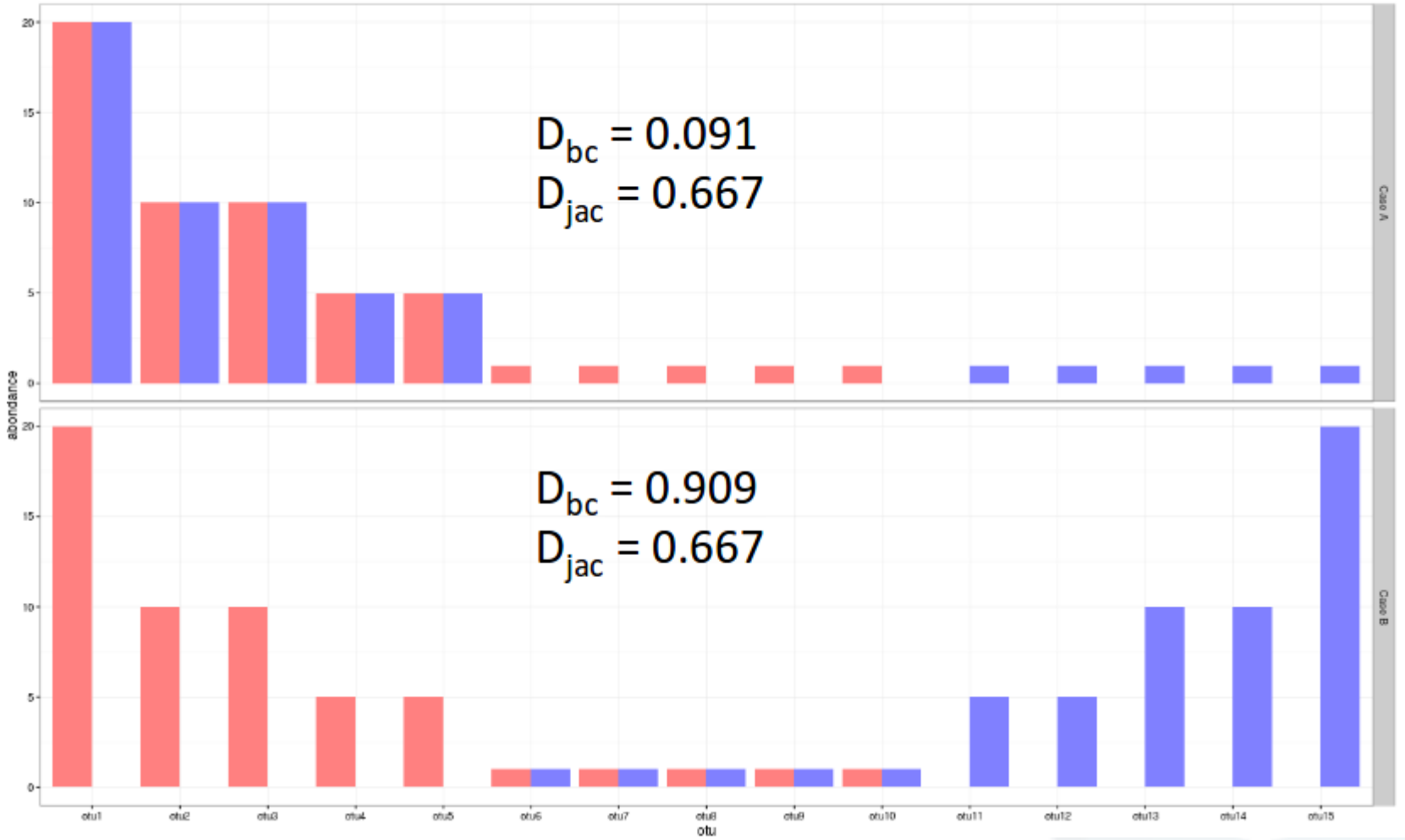
Bray-Curtis : Fraction de la communauté spécifique à la communauté A ou B.

$$Dist(x, y) = \frac{\sum |x_i - y_i|}{\sum x_i + \sum y_i} = \frac{\text{—}}{\text{—} + \text{—}}$$



4. Analyses exploratoires

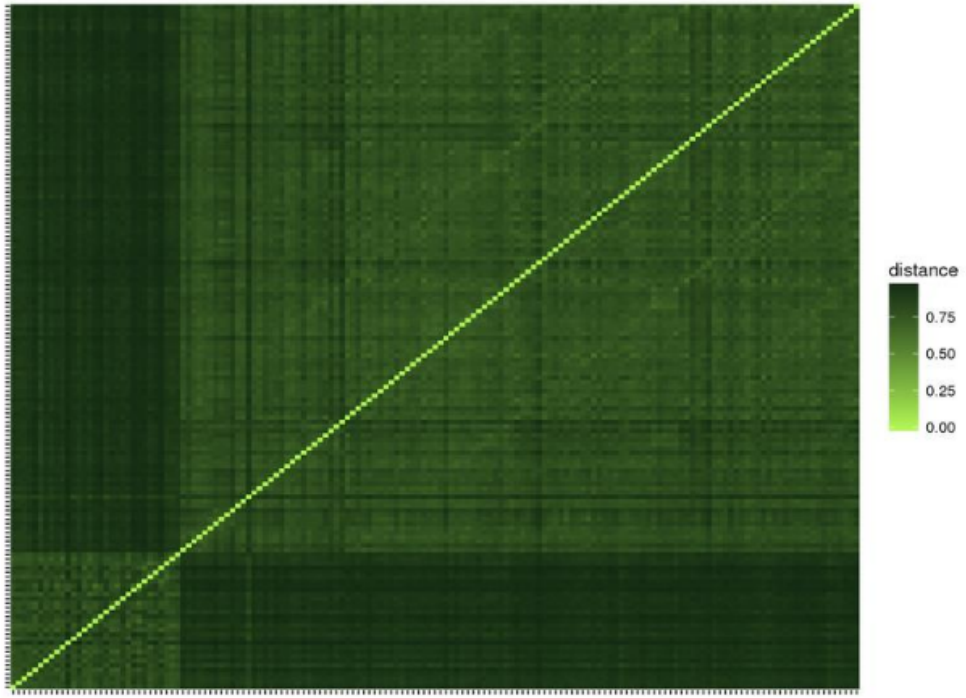
Analyse de la biodiversité – diversité **β**



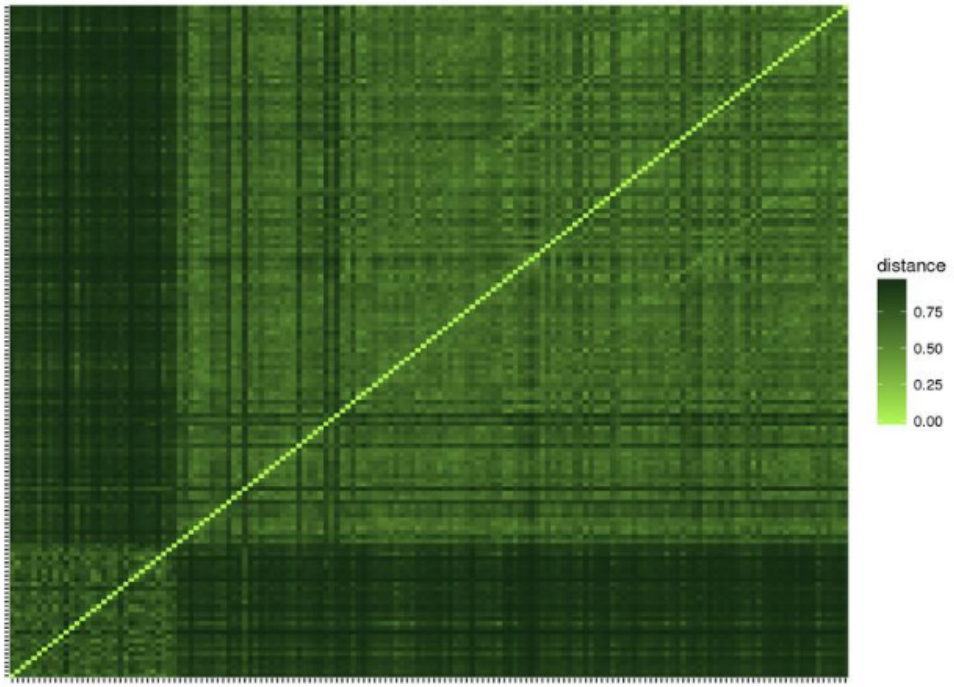
4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité β

Jaccard



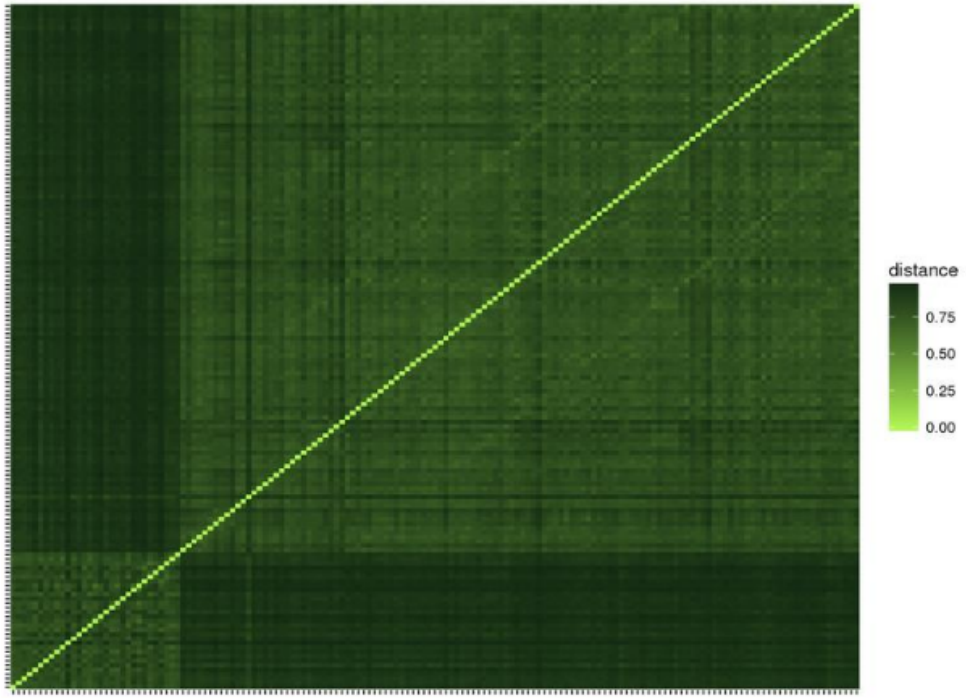
Bray-Curtis



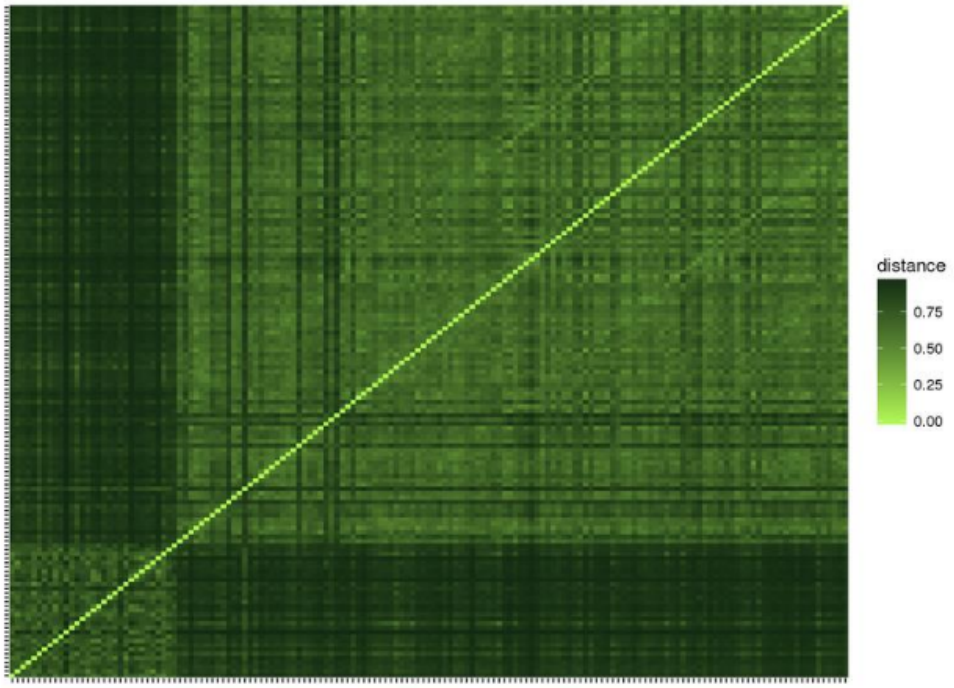
4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité β

Jaccard



Bray-Curtis



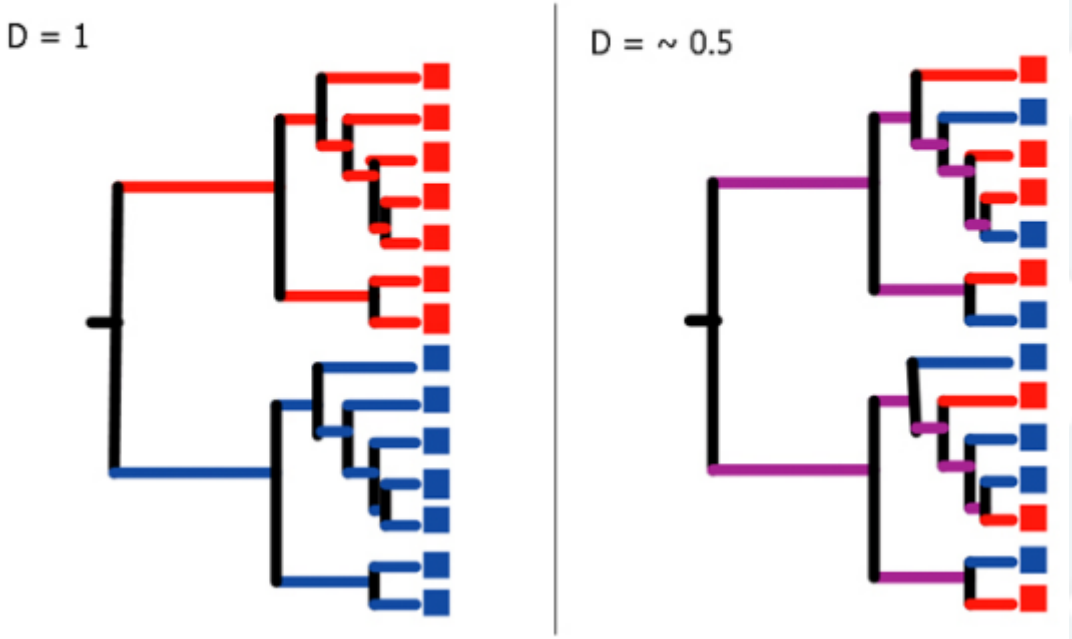
Jaccard > Bray-Curtis : les OTUs abondants sont partagés

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **β**

Unifrac : Fraction de l'arbre spécifique à la communauté A ou B.

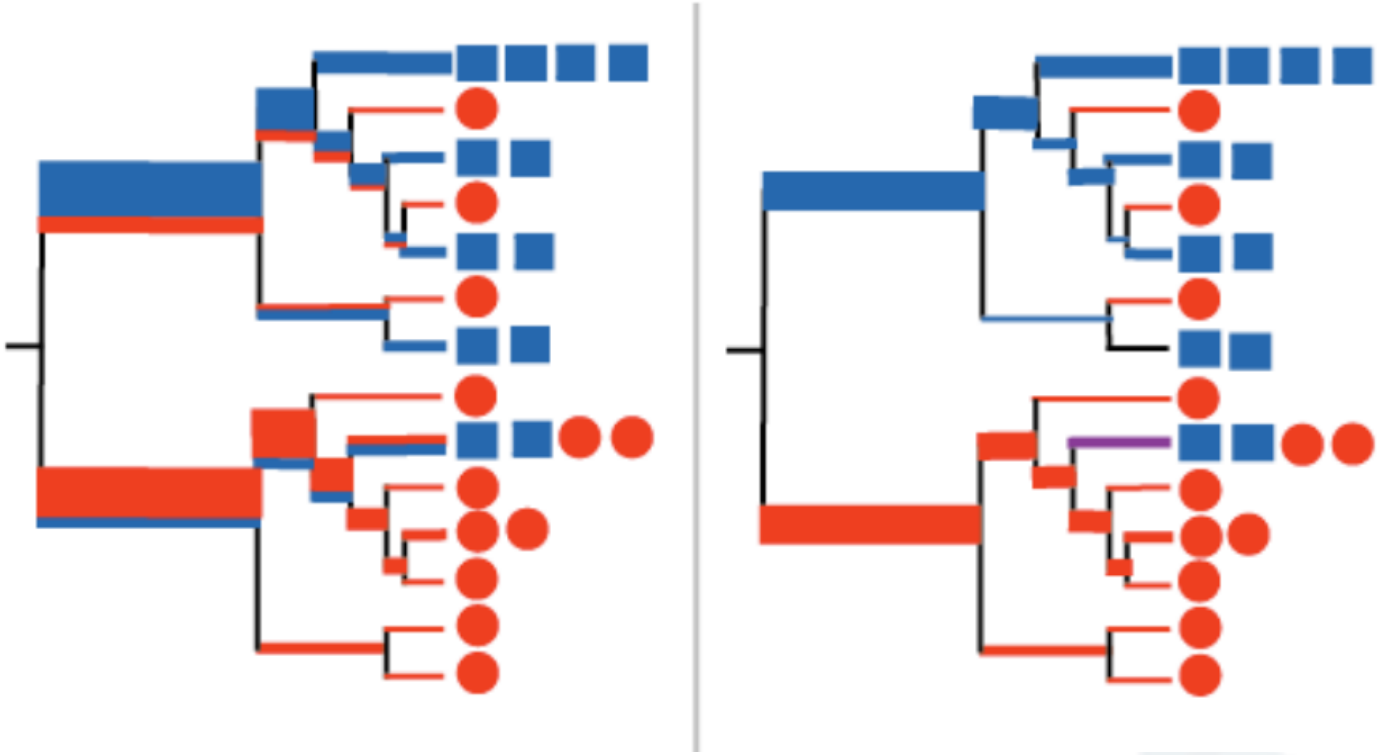
$$Dist(x, y) = \frac{\text{— + —}}{\text{— + — + —}}$$



4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **β**

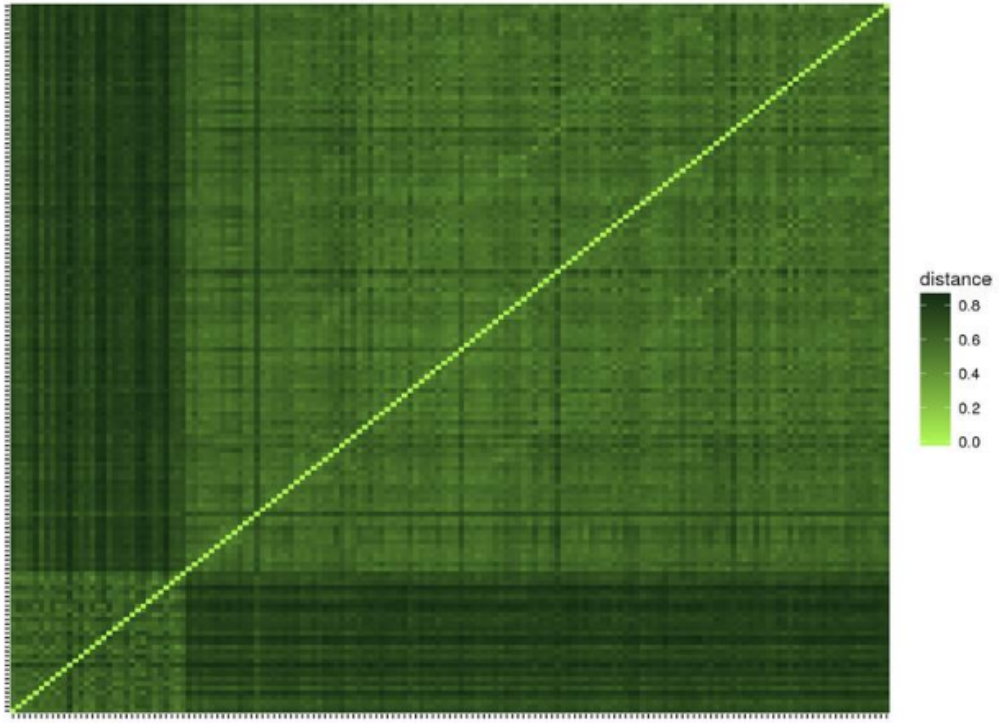
Weighted Unifrac : Fraction de la diversité spécifique à la communauté A ou B.



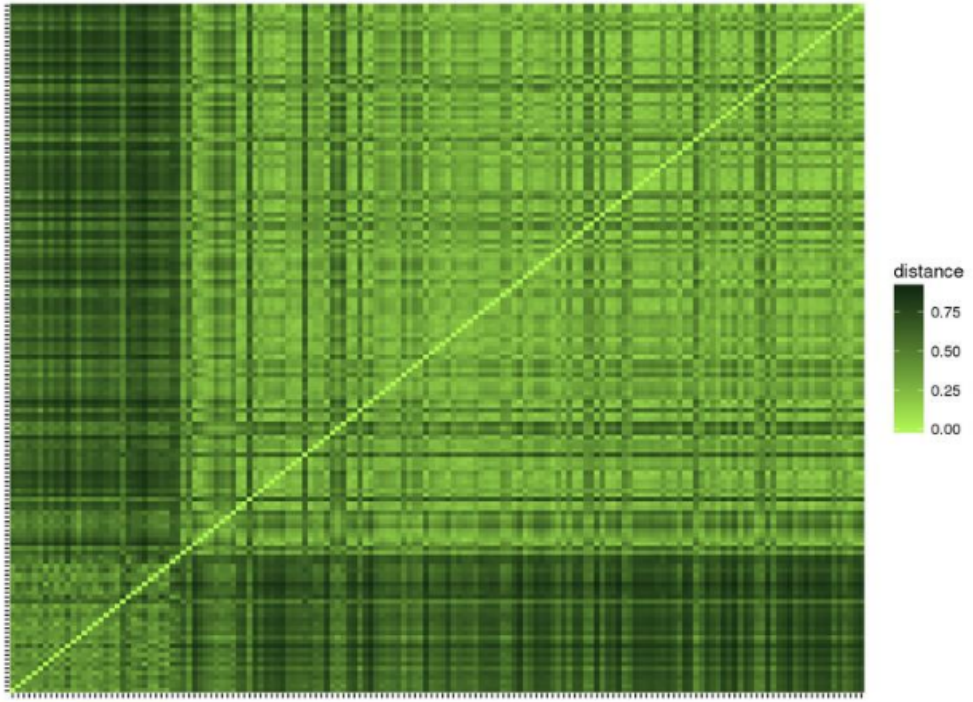
4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **β**

UniFrac



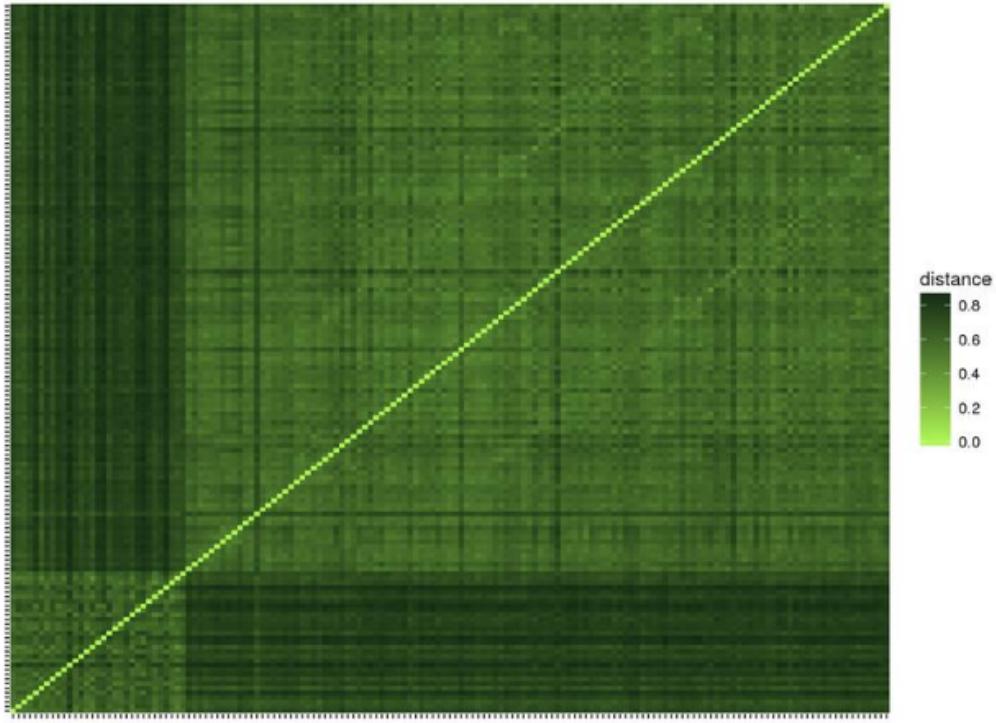
wUniFrac



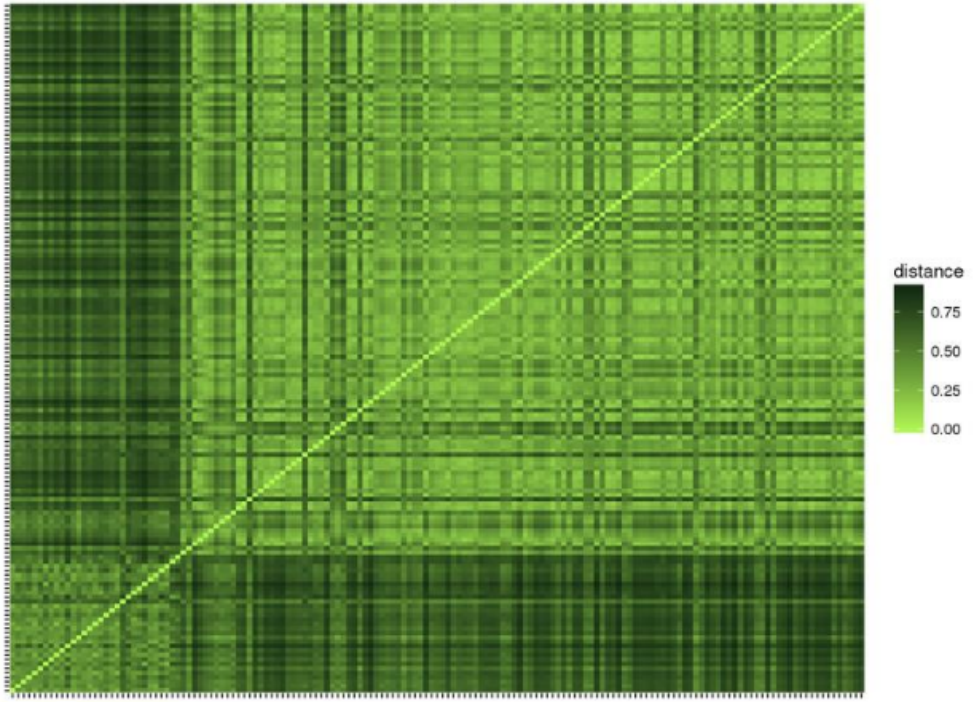
4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité **β**

UniFrac



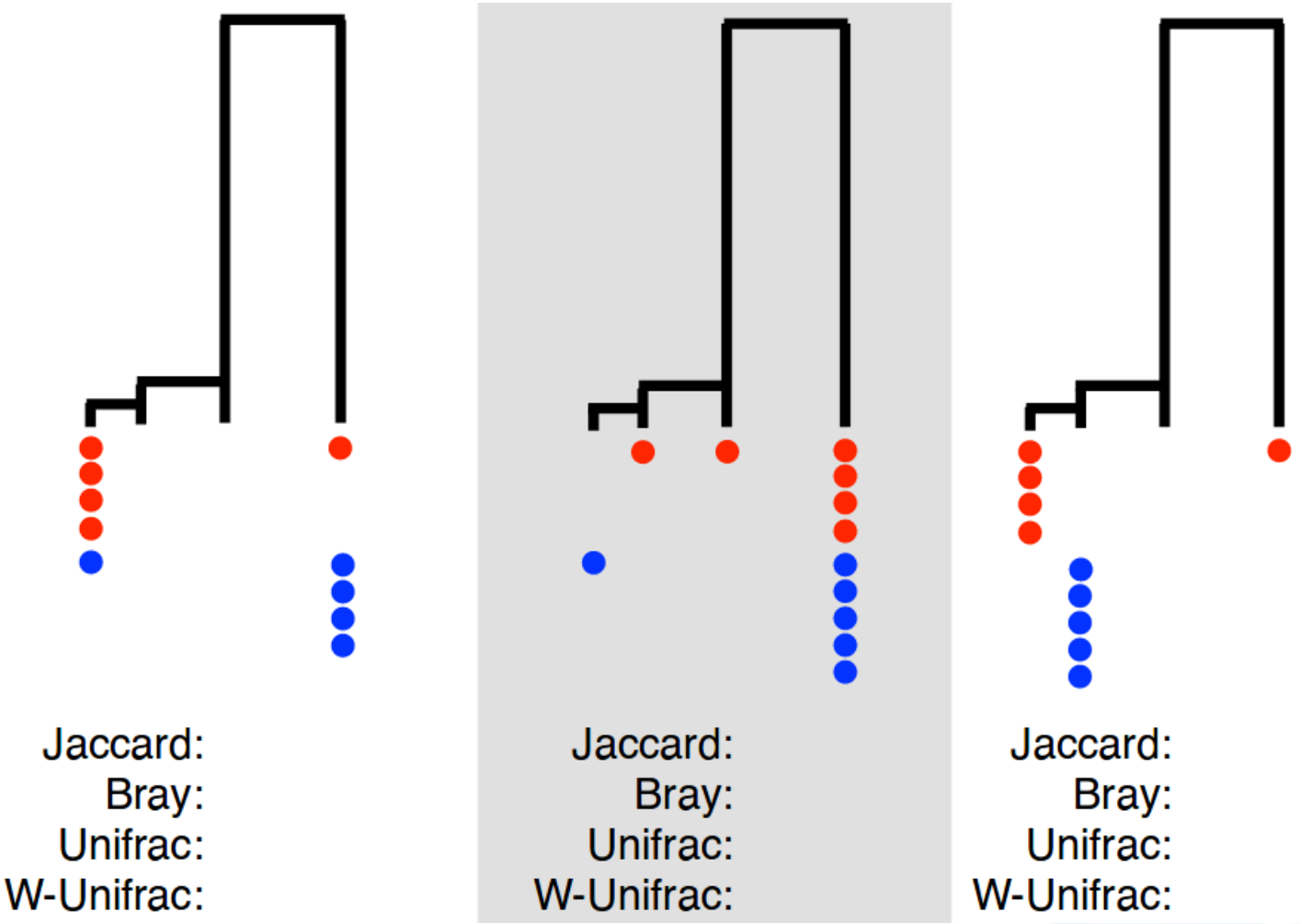
wUniFrac



UniFrac > wUniFrac : les OTUs abondants sont proches phylogénétiquement

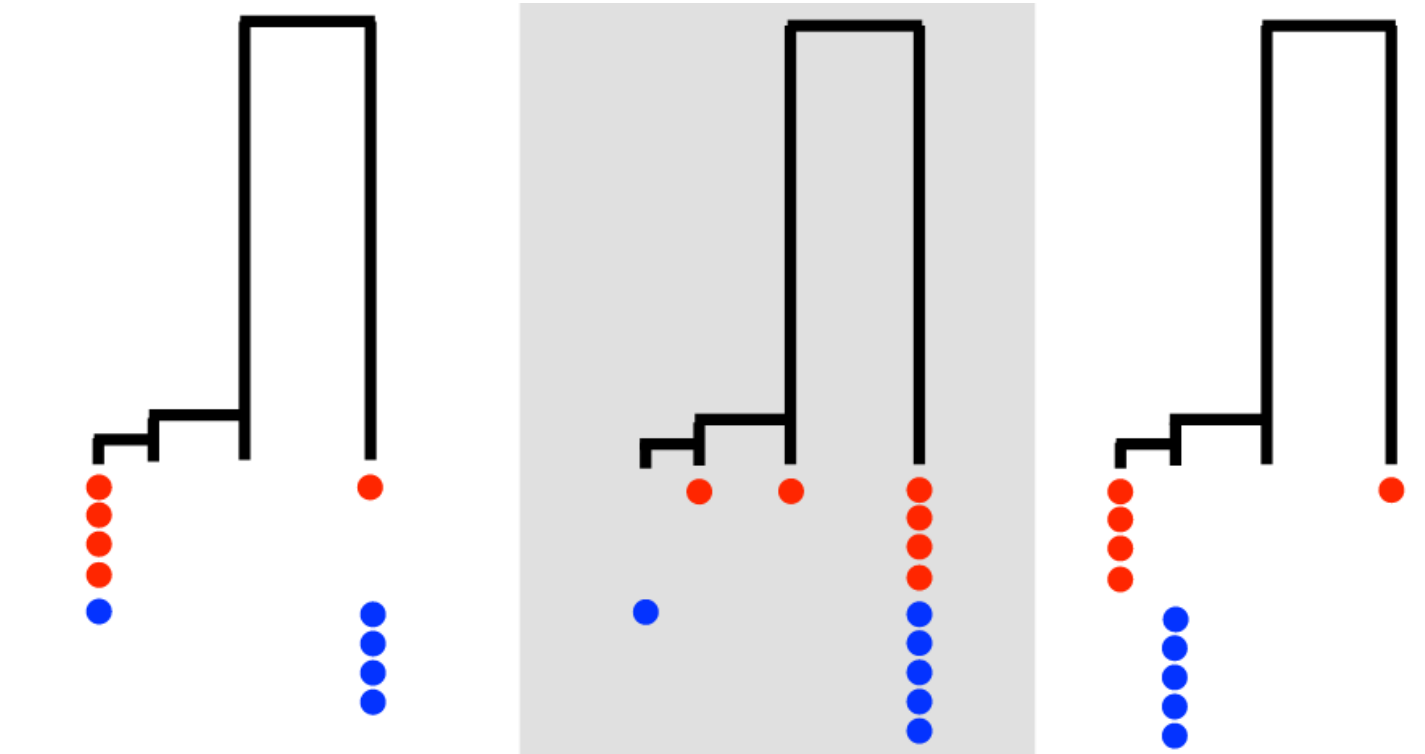
4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité β



4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité β



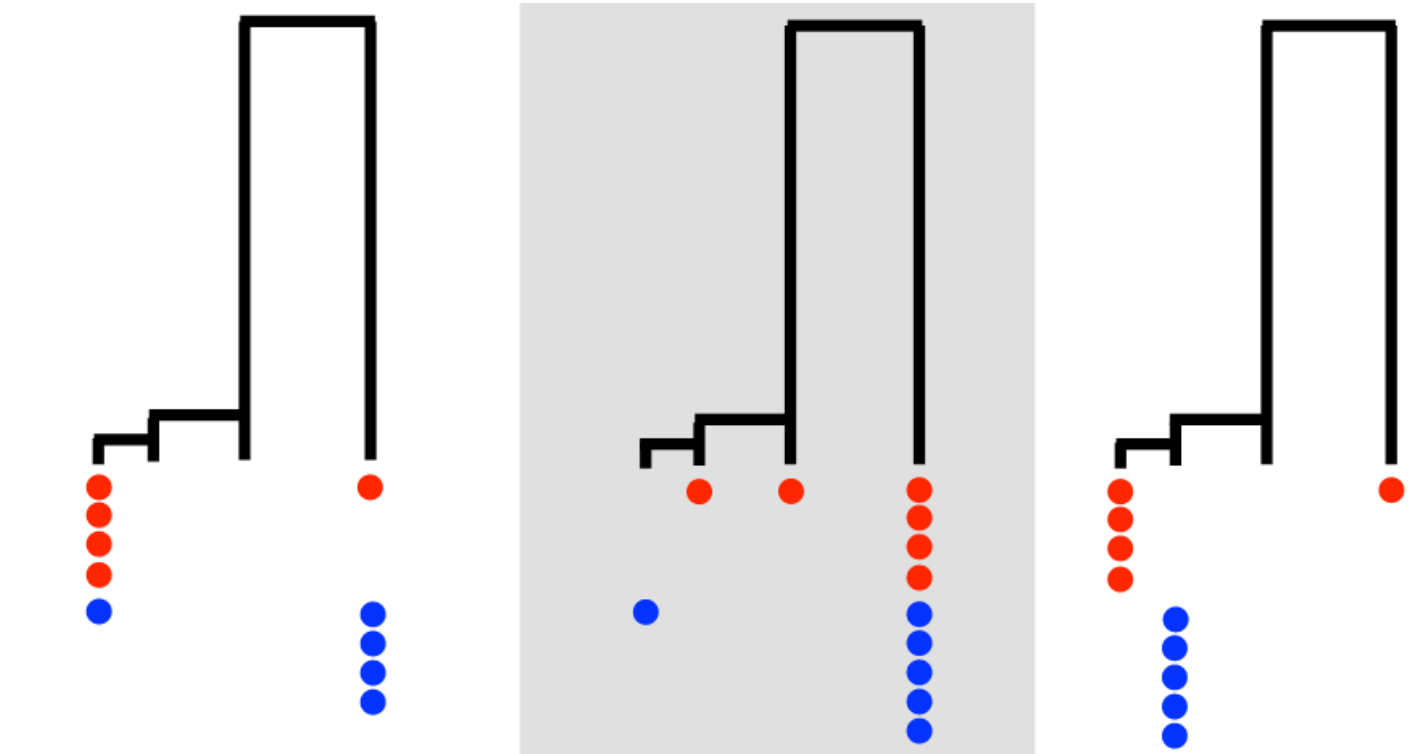
Jaccard: d=0
Bray:
Unifrac:
W-Unifrac:

Jaccard: distant
Bray:
Unifrac:
W-Unifrac:

Jaccard: distant
Bray:
Unifrac:
W-Unifrac:

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité β



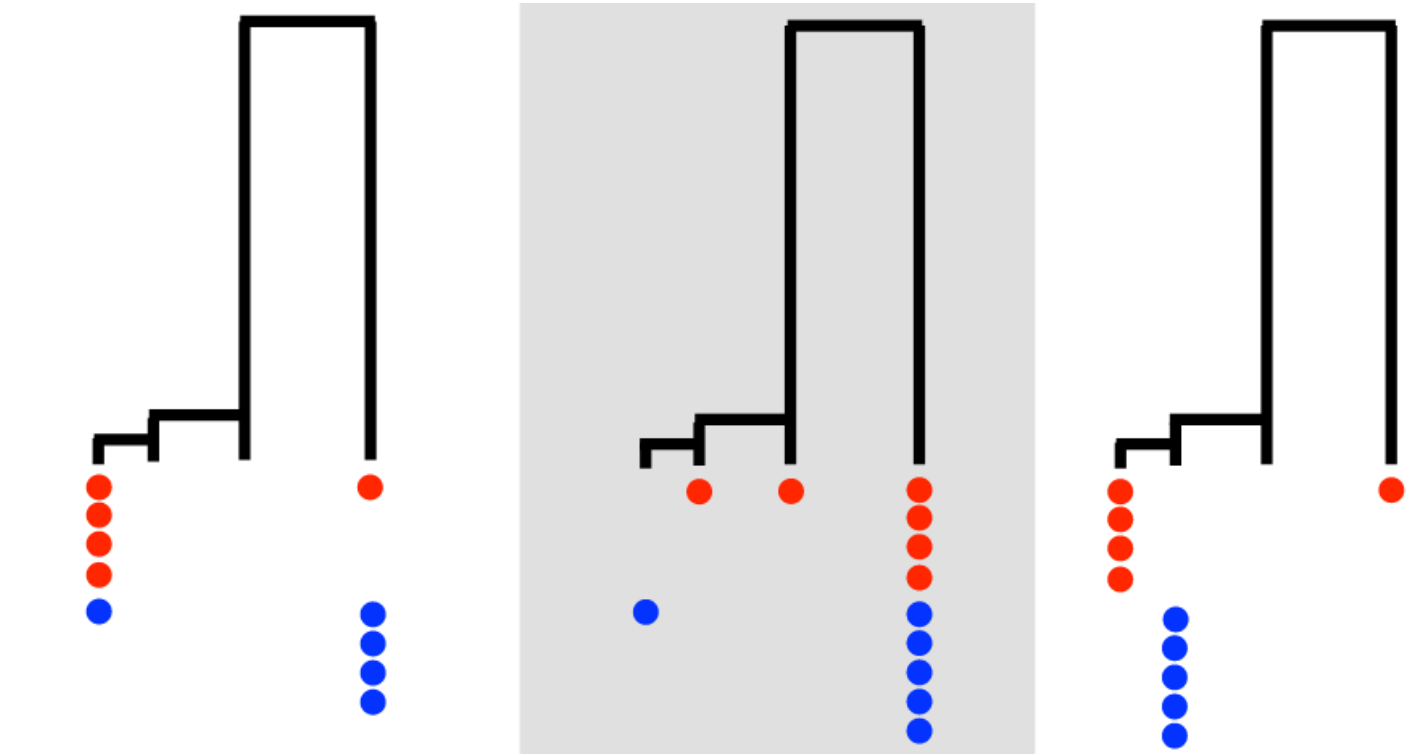
Jaccard: d=0
Bray: distant
Unifrac:
W-Unifrac:

Jaccard: distant
Bray: similaire
Unifrac:
W-Unifrac:

Jaccard: distant
Bray: distant
Unifrac:
W-Unifrac:

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité β



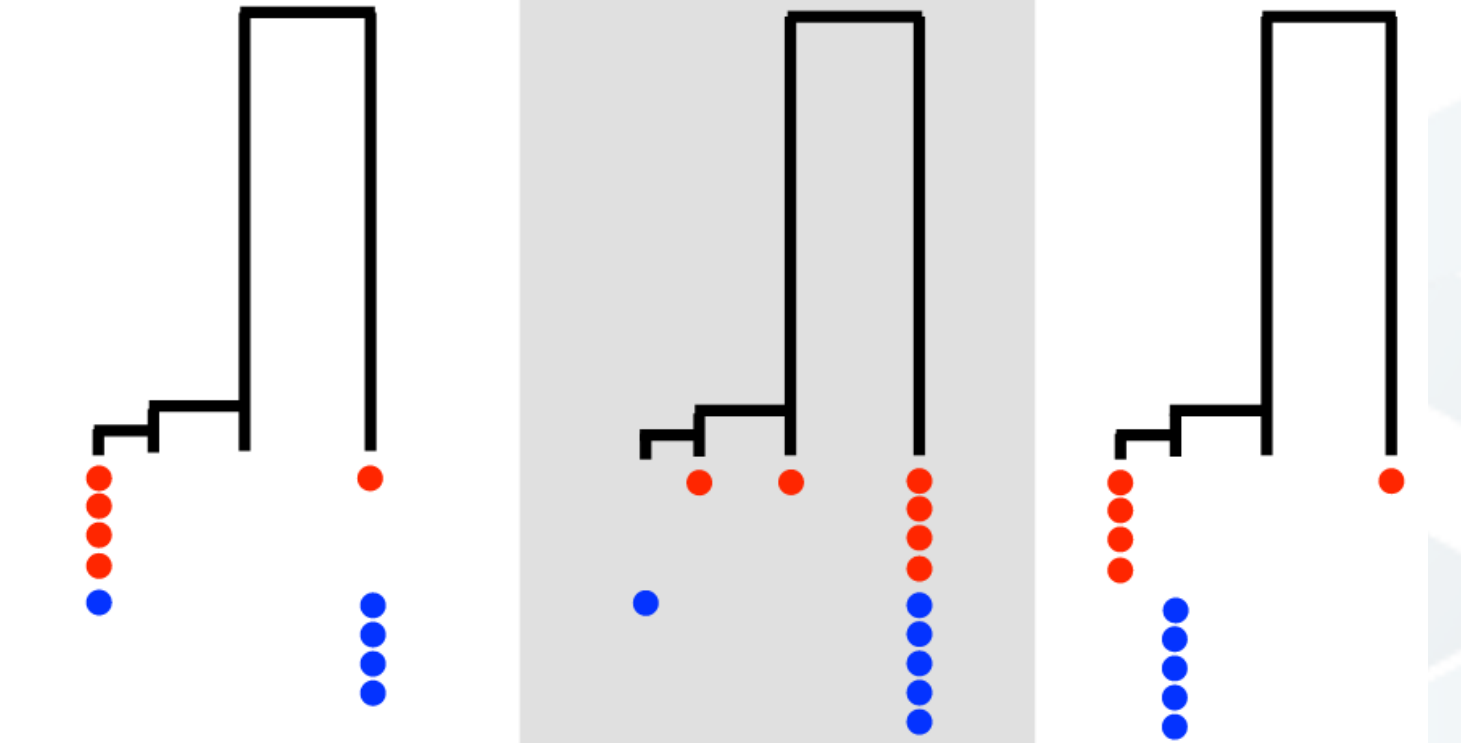
Jaccard: d=0
Bray: distant
Unifrac: d=0
W-Unifrac:

Jaccard: distant
Bray: similaire
Unifrac: similaire
W-Unifrac:

Jaccard: distant
Bray: distant
Unifrac: distant
W-Unifrac:

4. Analyses exploratoires

Analyse de la biodiversité – diversité β



Jaccard: d=0
Bray: distant
Unifrac: d=0
W-Unifrac: distant

Jaccard: distant
Bray: similaire
Unifrac: similaire
W-Unifrac: similaire

Jaccard: distant
Bray: distant
Unifrac: distant
W-Unifrac: similaire

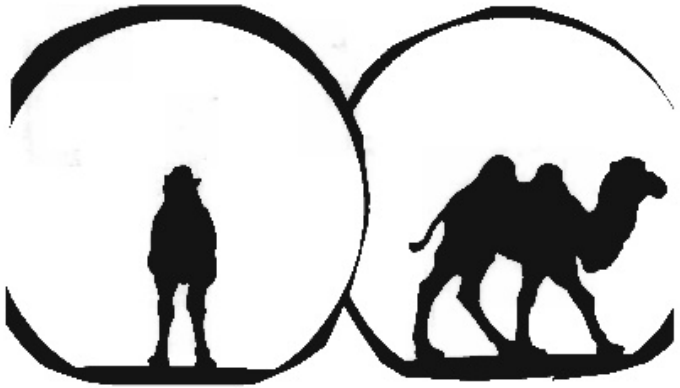
4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires - MDS

Objectif : Projeter des données de grande dimension dans un sous espace de plus faible dimension.

L'**ACP** (Analyse en Composantes Principales) recherche des combinaisons linéaires d'OTUs qui

- sont non corrélés,
- préservent au mieux la variance de la composition des communautés.



Chameau ou dromadaire ?

Mais les données méta-omics :

- peuvent être corrélées,
- l'ACP n'est pas adaptée pour capturée la diversité.

4. Analyses exploratoires

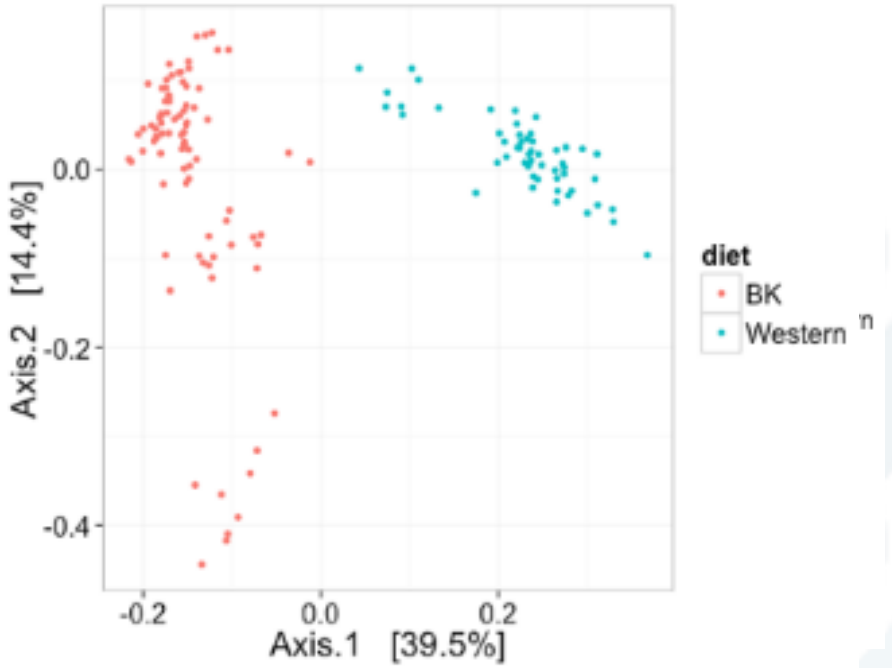
Méthodes exploratoires - MDS

La **MDS** (Multi-Dimensional Scaling) est équivalente à l'ACP mais capture la diversité **β**.

P taxa

N samples

0,1,5,1,0,1,2,1,0,0,9,…
7,2,0,0,0,0,0,0,1,0,0,…
0,0,0,0,0,0,8,0,0,0,1,…
0,0,0,1,0,1,2,0,0,0,5,…
0,1,0,2,0,0,0,1,0,0,4,…
0,0,0,1,9,1,2,5,2,0,1,…
0,0,0,0,0,1,2,1,8,0,0,…
0,0,0,0,9,4,0,0,0,0,1,…



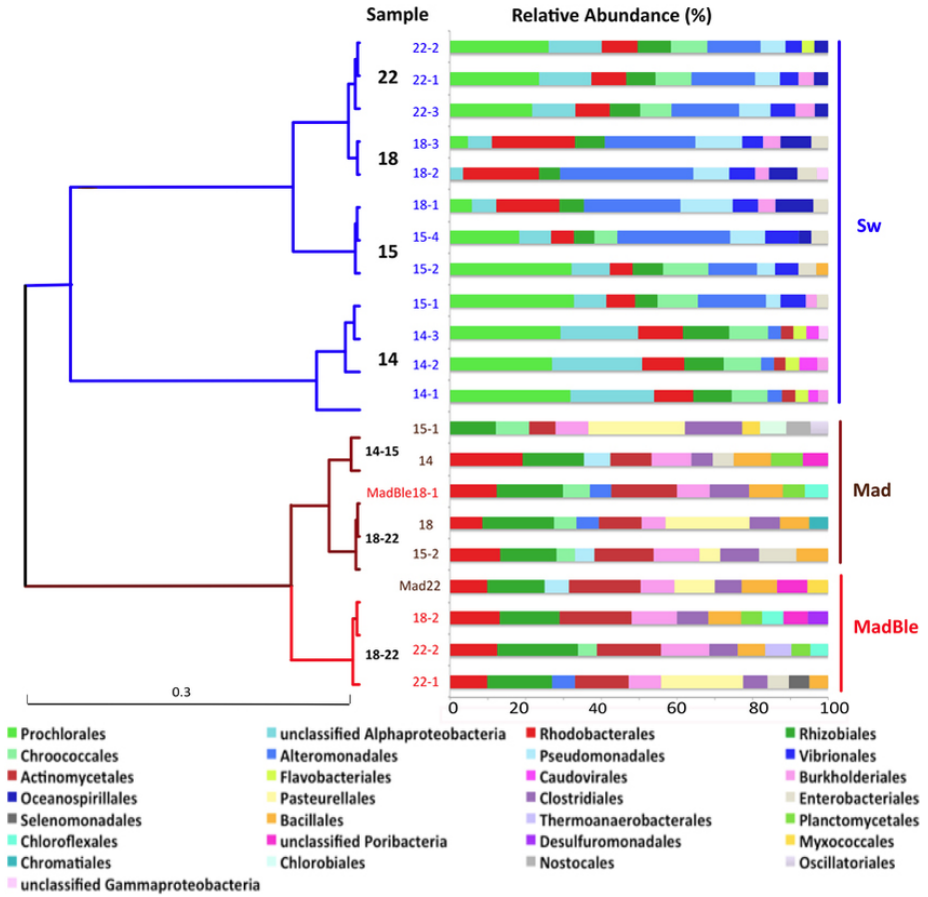
P-dimensions

2-dimensions

4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique

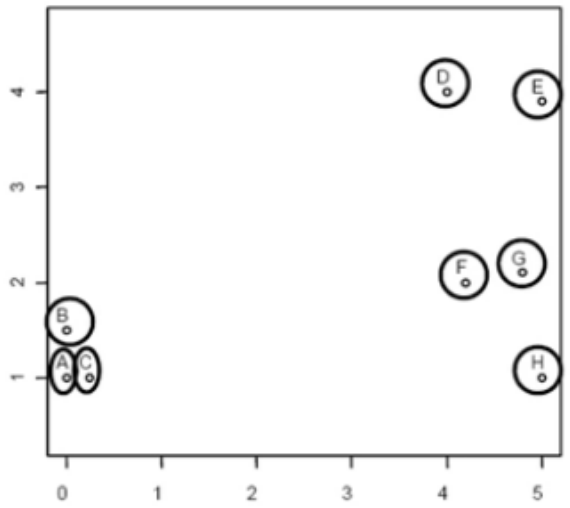
Objectif : Regrouper les échantillons selon leur diversité.



Sw = seawater
Mad = corail sain
MadBle = corail blanchi

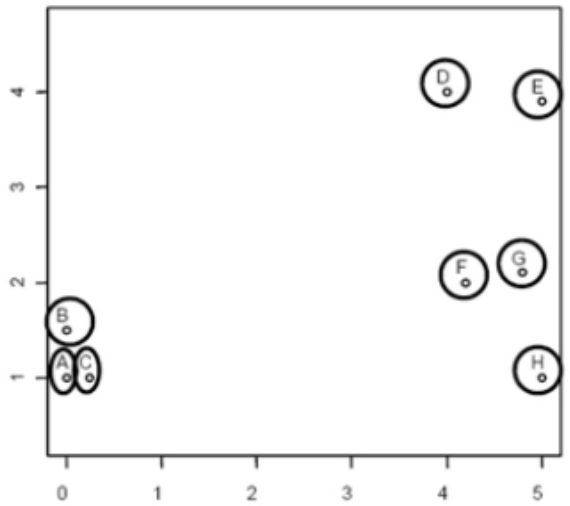
4. Analyses exploratoires

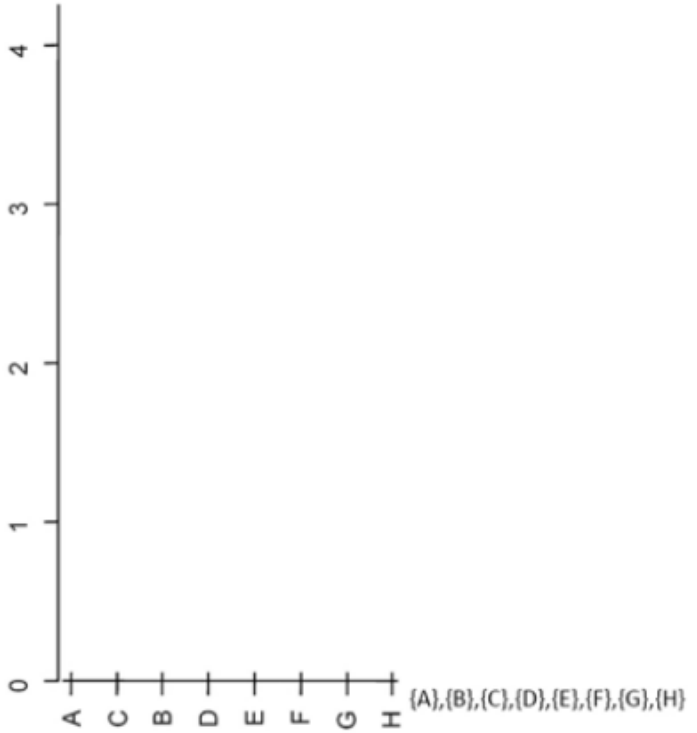
Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique



4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique

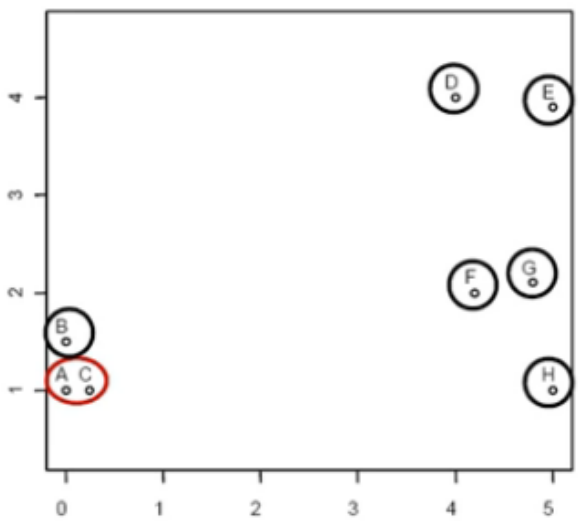


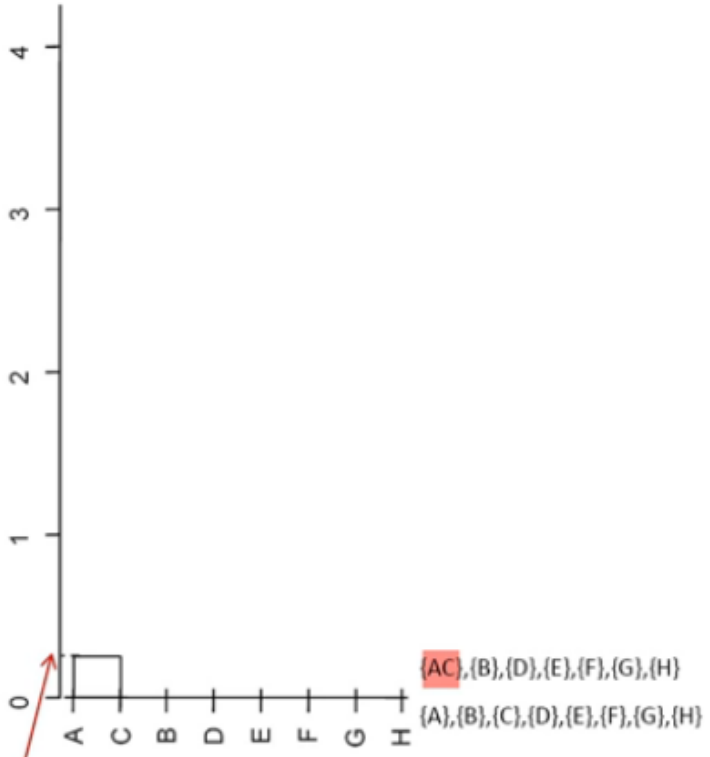


	A	B	C	D	E	F	G
B	0.50						
C	0.25	0.56					
D	5.00	4.72	4.80				
E	5.78	5.55	5.57	1.00			
F	4.32	4.23	4.07	2.01	2.06		
G	4.92	4.84	4.68	2.06	1.81	0.61	
H	5.00	5.02	4.75	3.16	2.90	1.28	1.12

4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique



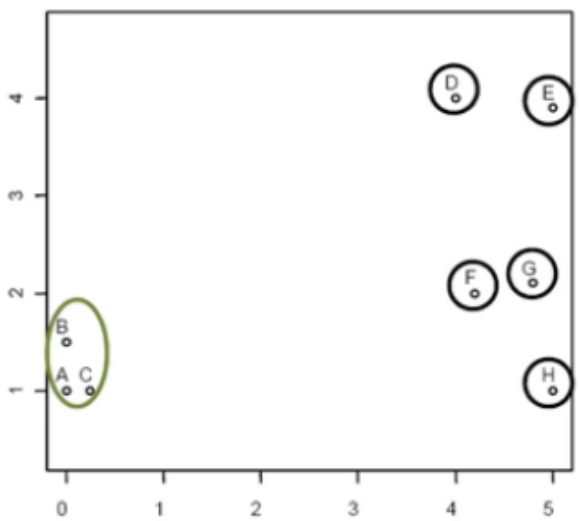


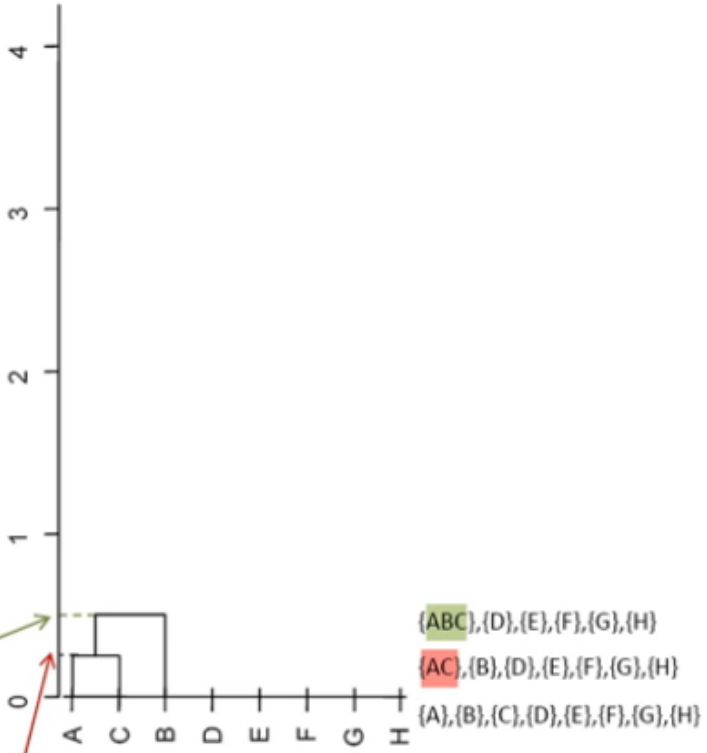
	A	B	C	D	E	F
B	0.50					
C	0.25	0.56				
D	5.00	4.72	4.80			
E	5.78	5.55	5.57	1.00		
F	4.32	4.23	4.07	2.01	2.06	
G	4.92	4.84	4.68	2.06	1.81	0.61
H	5.00	5.02	4.75	3.16	2.90	1.28	1.12

1er regroupement

4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique





2e regroupement

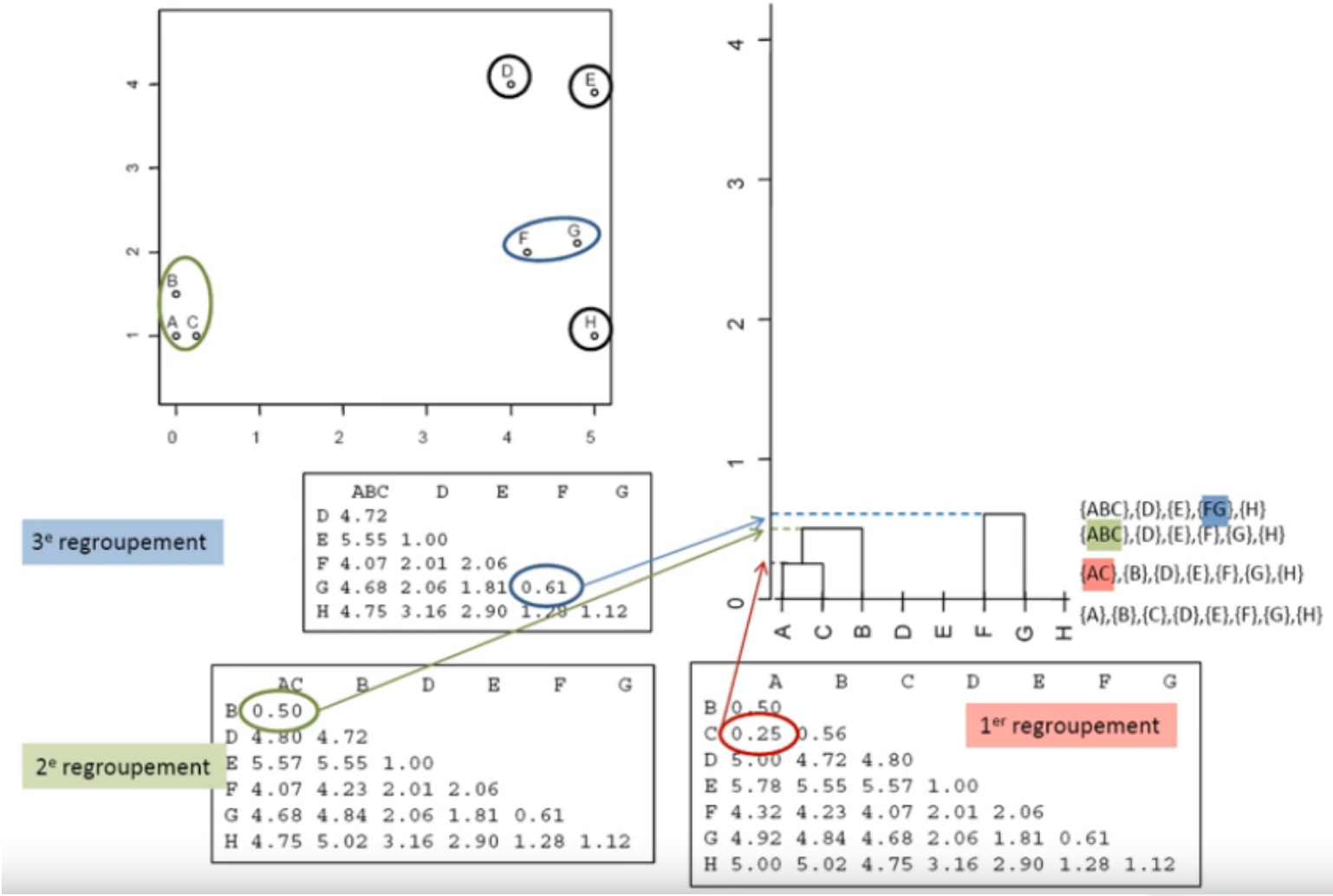
	AC	B	D	E	F
B	0.50				
D	4.80	4.72			
E	5.57	5.55	1.00		
F	4.07	4.23	2.01	2.06	
G	4.68	4.84	2.06	1.81	0.61
H	4.75	5.02	3.16	2.90	1.28

1er regroupement

	A	B	C	D	E	F
B	0.50					
C	0.25	0.56				
D	5.00	4.72	4.80			
E	5.78	5.55	5.57	1.00		
F	4.32	4.23	4.07	2.01	2.06	
G	4.92	4.84	4.68	2.06	1.81	0.61
H	5.00	5.02	4.75	3.16	2.90	1.28

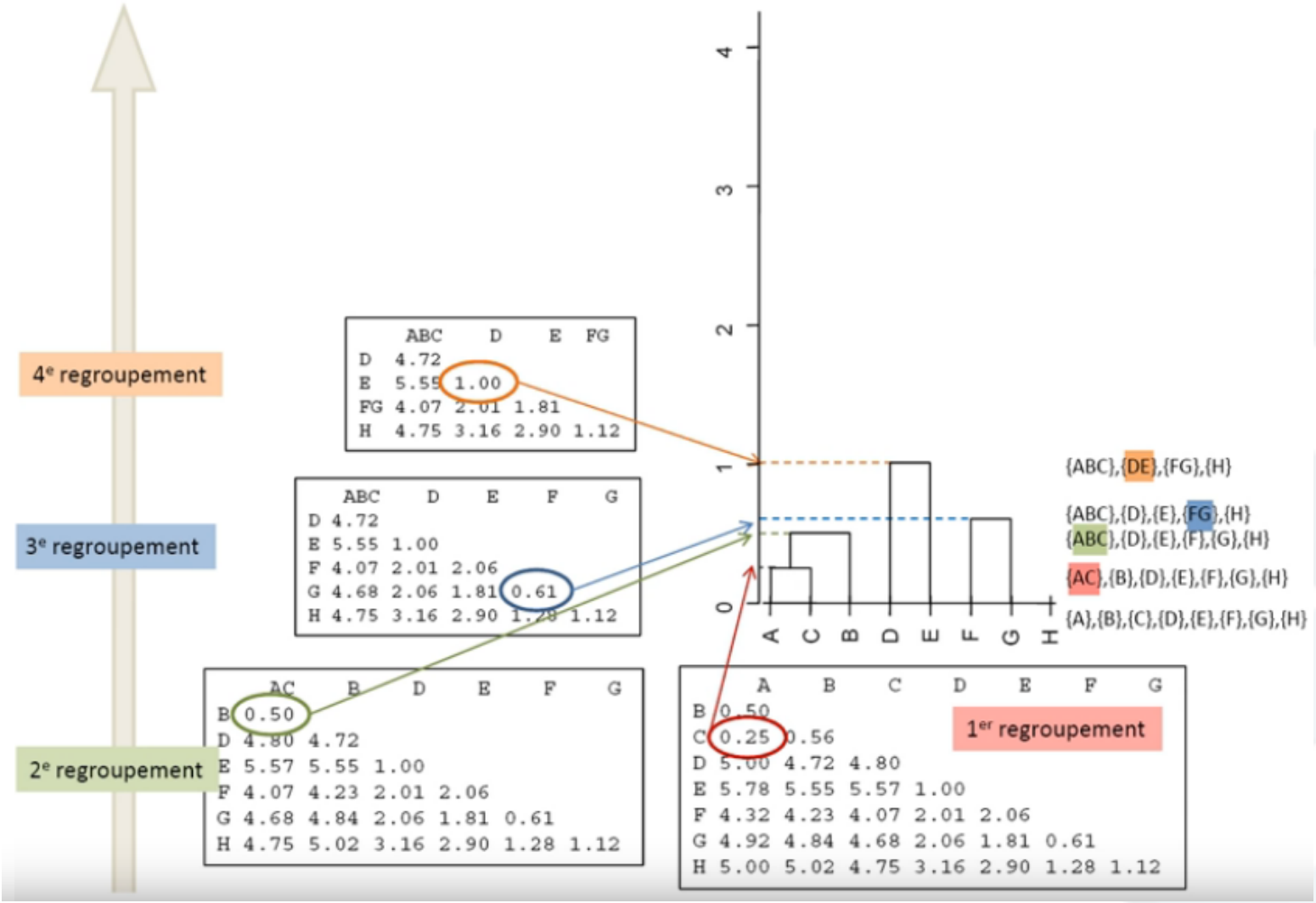
4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique



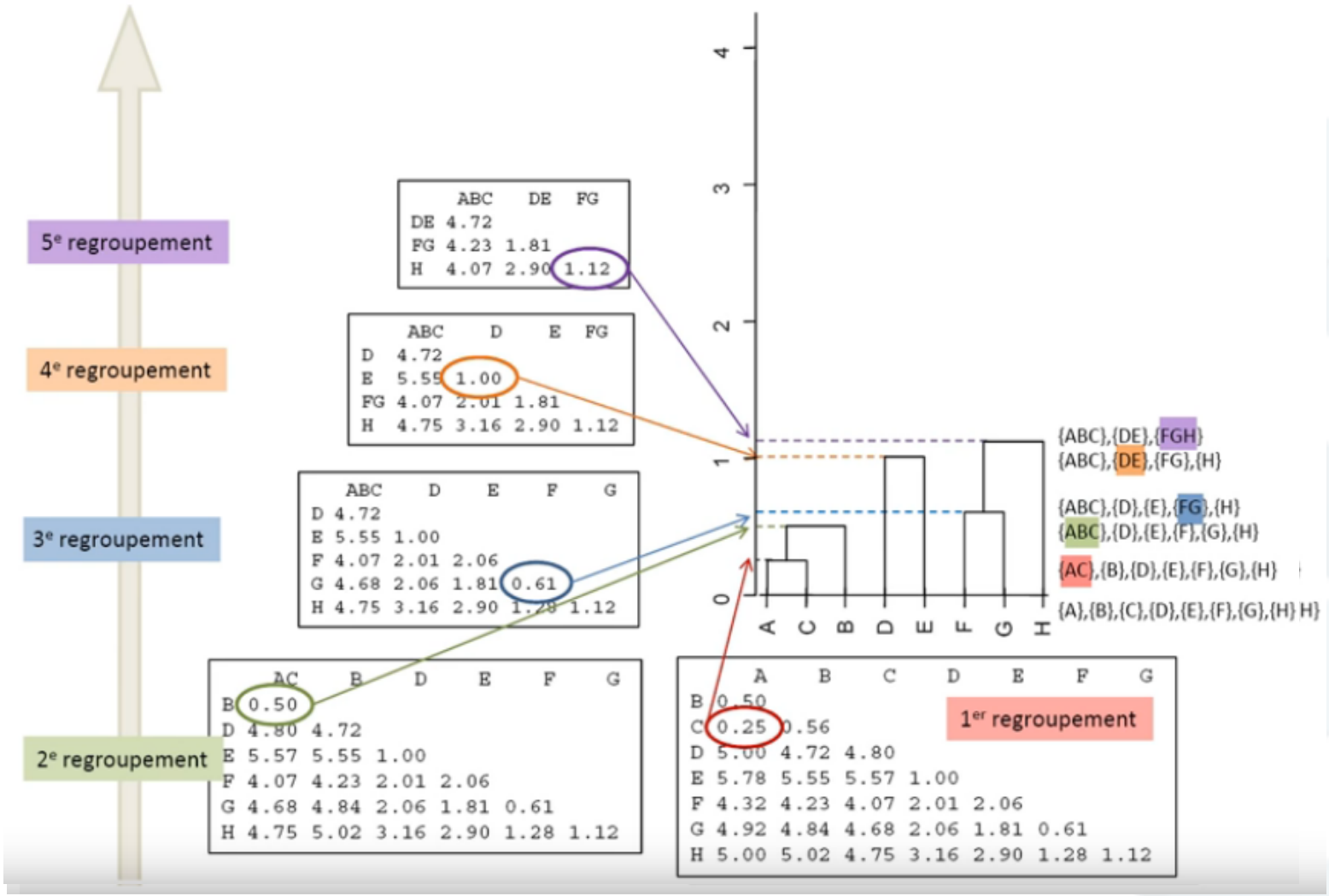
4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique



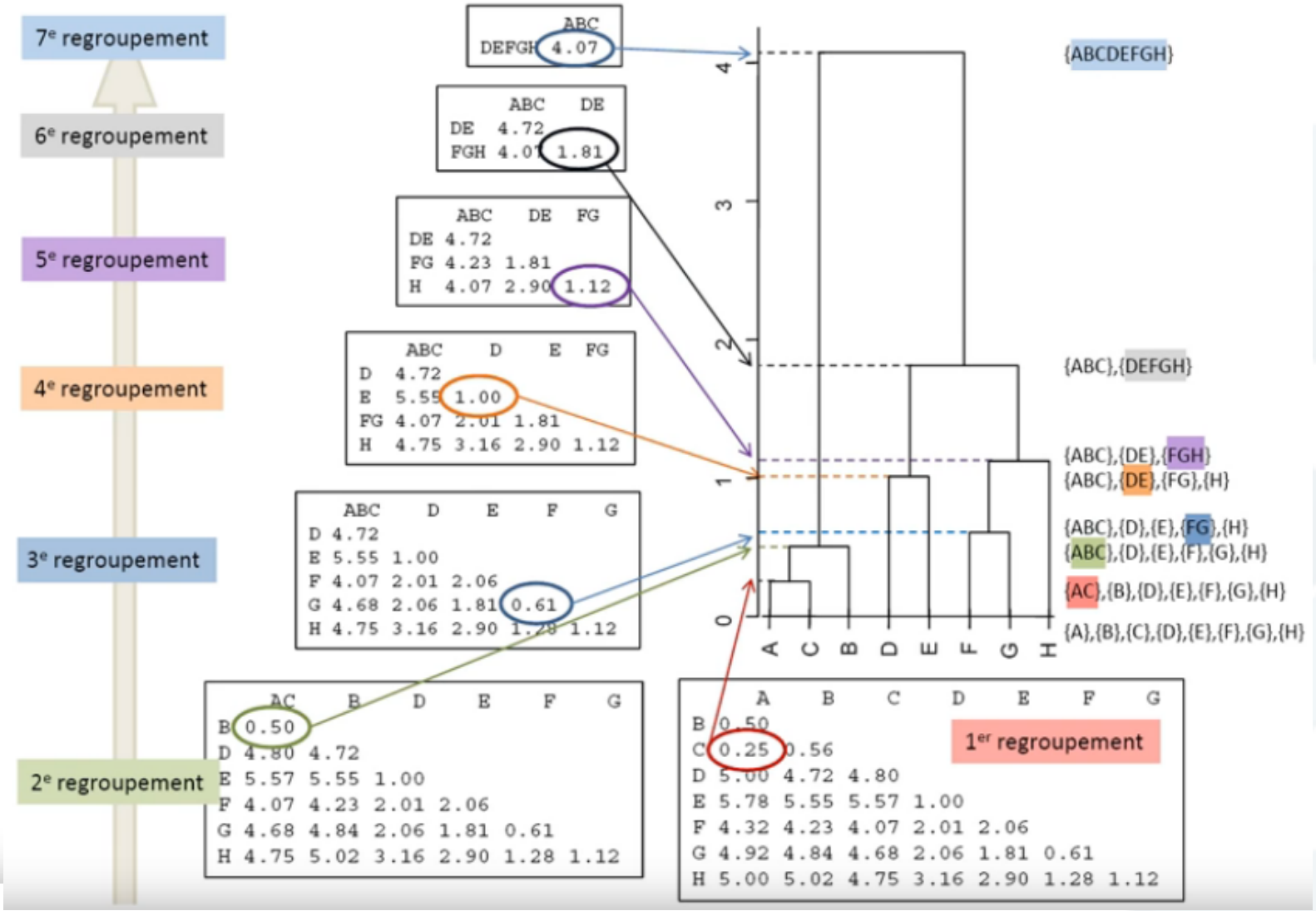
4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique



4. Analyses exploratoires

Méthodes exploratoires – Classification hiérarchique



Genotoul Bioinfo

5. Impact carbone du calcul

BGES du cluster GenoToul

- Matériel informatique : **fabrication, transport & eol**
- Consommation électrique
- **Fluide frigorigène** (fuites en R410A : fluide frigorifique à très fort effet de serre)
- **Déplacements** professionnel du personnel
- Déplacements domicile / travail

5. Impact carbone du calcul

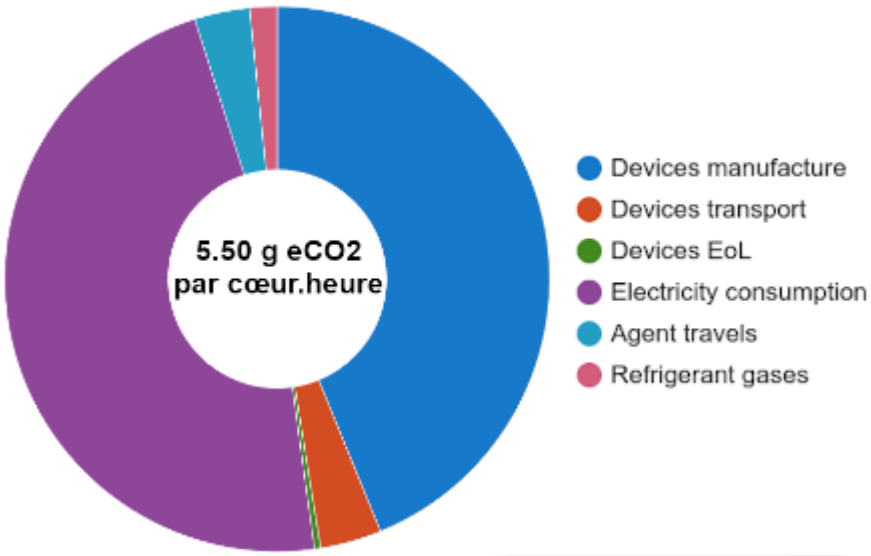
BGES du cluster GenoToul

- Durée de fonctionnement des appareils de **7 ans**
- Efficacité de la consommation d'énergie (PUE) du centre d'hébergement de 1,4
- Facteur d'émission de 0,1080 kg CO2e / kWh
- Temps de calcul total en 2019 de **18.000.000 heures**

5. Impact carbone du calcul

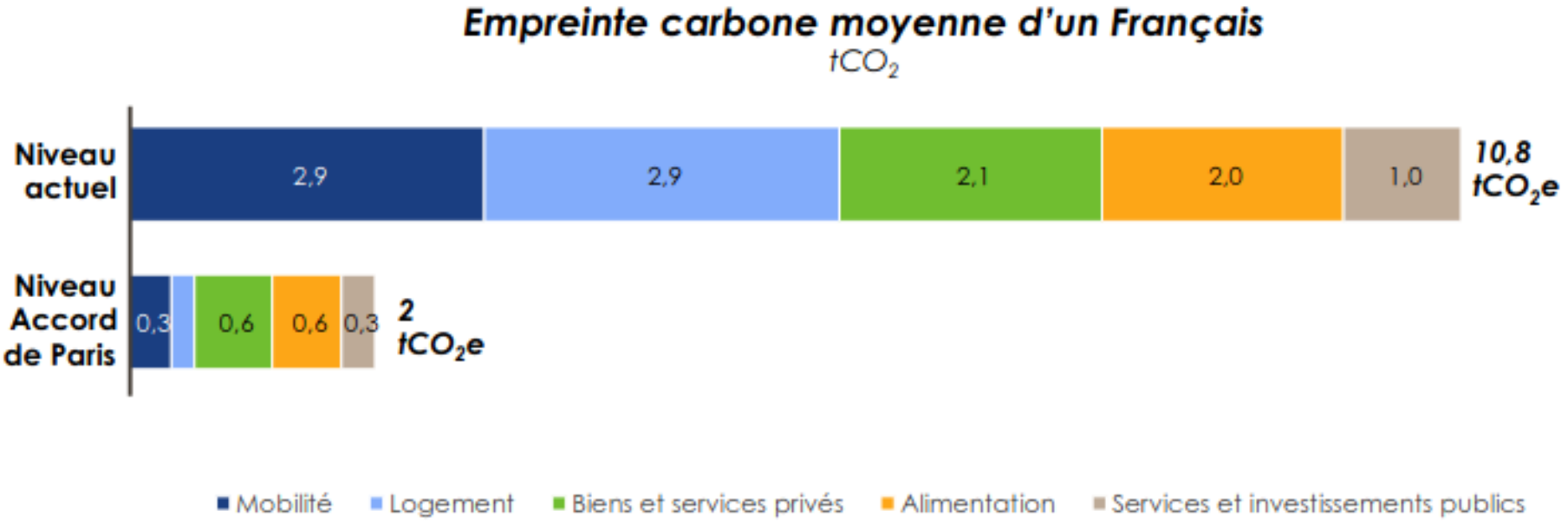
BGES du cluster GenoToul

	Émissions totales de GES en 2019 (kg CO2e)	Émissions de GES par cœur.heure (g CO2e)
Fabrication du matériel	43 373	2.41
Transport du matériel	3 519	0.20
EoL du matériel	310	0.02
Consomation éléctrique	46 799	2.60
Transport des agents	3 250	0.18
Fluide frigorigène	1 673	0.09
TOTAL	**98 924**	**5.50**



5. Impact carbone du calcul

BGES du cluster GenoToul



* Source Carbone 4, 2019. Faire sa part ? Pouvoir et responsabilité des individus, des entreprises et de l'État face à l'urgence climatique.

Budget carbone ~= 370 000 heures CPU

Genotoul Bioinfo

Quizz

https://view.genial.ly/64f5de6285e901001079880b/interactive-content-m2-metagenomic

TP Partie 1

https://forgemia.inra.fr/genotoul-bioinfo/metagwgs/-/wikis/TP-metaG-HiFi-several-samples

A la fin : Retour d'expérience en commun : que pensez-vous de cette manière de travailler ? Quels en sont les avantages et les inconvénients ? En terme de lancement, d'accès aux résultats, de gestion des erreurs etc

Automatisation via NextFlow

- Permet d'enchaîner des traitements (« process ») drivés par les données (input/output) définis dans les « channels ». https://www.nextflow.io/docs/latest/basic.html
- Gère aussi de manière transparente la parallélisation sur différentes infra
- Permet de relancer après une erreur et/ou une correction. Ne relance pas ce qui s'est bien terminé et n'est pas impacté par la modification.
- La commande lancée peut être un exécutable, un script perl, python, bash ou R…
- Le script NextFlow en lui-même est en Groovy
- Grosse communauté nfCore : https://nf-co.re/pipelines

Exemple de syntaxe Groovy

```
process blastThemAll {
  input:
  path query_file

  "blastp -query ${query_file} -db nr"
}

workflow {
  def proteins = Channel.fromPath( '/some/path/*.fa' )
  blastThemAll(proteins)
}
```

Démarrera lorsque le channel ne sera pas vide

Les répéteurs

```
process alignSequences {
  input:
  path seq
  each mode
  each path(lib)

  """
  t_coffee -in $seq -mode $mode -lib $lib > result
  """
}

workflow {
  sequences = Channel.fromPath('*.fa')
  methods = ['regular', 'espresso']
  libraries = [ file('PQ001.lib'), file('PQ002.lib'), file('PQ003.lib') ]

  alignSequences(sequences, methods, libraries)
}
```

Doc très bien faite : https://www.nextflow.io/docs/latest/process.html
Patterns : https://github.com/nextflow-io/patterns

Genotoul Bioinfo

Singularity/ Apptainer

Un conteneur : vous permet d'exécuter une ou plusieurs applications linux à l'intérieur d'un environnement isolé et reproductible qui ne dépend que du noyau linux de la machine sur laquelle vous êtes. Un conteneur ressemble à une machine virtuelle, sauf qu'il n'embarque pas nécessairement un système d'exploitation au complet, ce qui lui permet de se lancer en quelque secondes et d'être plus léger.

Singularity : L'objectif initial est de proposer une solution de conteneurisation adaptée aux besoins des scientifiques qui doivent exécuter des applications conteneurisées sur des clusters de calculs (HPC).
A la différence d'autres systèmes de conteneurs (comme Docker), Singularity ne demande aucun droit de type administrateur, aucun démon, ne virtualise pas le réseau et dialogue directement avec le système de fichiers de son hôte. Chaque conteneur est lancé et s'arrête en même temps que l'application qu'il encapsule.

Singularity / Apptainer - Vocabulaire

Image : Comme dans le cadre des machines virtuelles, on appelle "image" une description statique de conteneur, une sorte de photographie de machine, que vous pouvez échanger avec vos collaborateurs, et à partir de laquelle on peut instancier et exécuter des conteneurs. Singularity possède son propre mécanisme d'images, mais peut aussi s'interfacer avec les images Docker.

Conteneur :
Une machine virtuelle légère, chargée en mémoire, qui sert à lancer une application au sein d'un environnement isolé et reproductible. Un conteneur s'instancie à partir d'une image.

Registre :
Entrepôt ou l'on stocke des images prêtes à l'emploi. Le registre central officiel de Singularity est consultable sur la toile à l'adresse https://singularity-hub.org/ (https://singularity-hub.org/).

TP Partie 2

https://forgemia.inra.fr/genotoul-bioinfo/metagwgs/-/wikis/TP-metaG-HiFi-several-samples

Vous commencerez votre compte-rendu de TP individuel en répondant aux questions posées dans l'ordre.

TP Partie 3

https://forgemia.inra.fr/genotoul-bioinfo/metagwgs/-/wikis/TP-metaG-HiFi-several-samples

Vous continuerez votre compte-rendu de TP individuel en répondant aux questions posées dans l'ordre.

Vous me l'enverrez par mail ce soir avant 17h00 : claire.hoede@inrae.fr