Assemblage de fragments d'ADN

Georges Gonthier

georges.gonthier@inria.fr

Dans la course au séquençage de tous les génomes de la biosphère l'informatique joue un rôle de tout premier plan. En effet, les procédés physico-chimiques ne permettent de « lire » que des courtes chaînes d'ADN (typiquement 500 bases), alors qu'un génome en comporte quelques dizaines de milliers à quelques dizaines de milliards pour les plus complexes comme le blé (celui de l'homme a trois milliards de bases). Les biologistes en sont donc réduits à lire une multitude de petits gragments répartis aléatoirement, puis à tenter d'*assembler* les morceaux de ce gigantesque puzzle.

L'informatique s'est révélée un instrument puissant pour cet assemblage; une compagnie privée a même fait sensation (et scandale) en parvenant la première, en trois ans, à séquencer le génome humain, en s'appuyant sur une solution purement informatique. Le consortium international public, qui œuvrait depuis dix ans, utilisait lui une approche plus conservatrice consistant à construire une « carte physique » du génome : une énorme collection de gros fragments d'ADN (quelques dizaines de milliers de bases), soigneusement répertoriés et conservés sous forme de chromosomes artificiels dans des bactéries (ou BAC). L'assemblage était limité à ces BAC, dont on établissait la position physique sur le chromosome par d'autres moyens expérimentaux.

La compagnie en question a gagné la course en assemblant directement des chromosomes entiers; mais elle garde jalousement ses programmes. Dans ce projet informatique, on vous propose de programmer un nouvel algorithme [1], qui, bien qu'il ne soit pas encore utilisé « industriellement », promet d'améliorer significativement l'efficacité et la fiabilité de l'assemblage.

1 Données du problème

Le génome d'une espèce est, rappelons-le, composé d'un ensemble de molécules d'ADN, réparties en chromosomes (voire en plasmides pour certaines bactéries). Ces molécules sont des polymères formés à partir de seulement quatre molécules élémentaires, qui ne diffèrent que par la base aminée qu'elles portent — Adényne, Cytosine, Guanine, ou Thymine, que l'on abbrège en A, C,G, T. Leur célèbre forme, la double hélice, est composée de deux longues chaînes (ou *brins*) jumelées et complémentaires: chaque A fait face à un C, chaque G à un T. On peut donc les décrire abstraitement avec un (long) mot sur ces quatre lettres; c'est le *code génétique* de l'espèce. Ce projet traite uniquement de la détermination de ce code; mais l'interprétation du code est aussi un défi majeur pour la bioinformatique.

On peut «lire» expérimentalement le code, mais seulement sur de courts segments (environ 500 bases). En effet la méthode consiste à créer par polymérisation des copies des préfixes du codes, colorés (littéralement!) en fonction de leur dernière lettre. On trie alors ces préfixes par poids moléculaire (par électrophorèse) pour lire le code. Malheureusement, la précision du tri et le rendement de la polymérisation diminuent avec la longueur des préfixes.

La méthode dite de *séquençage aléatoire* (*shotgun sequencing* en anglais) consiste à effectuer une myriade de lectures sur des segments (appelés *inserts*) pris au hasard dans le génome. L'ensemble des *fragments* lus, mis bout à bout, couvriraient environ 10 fois la longueur du génome. On tente ensuite d'obtenir algorithmiquement un *assemblage* de ces fragments en utilisant leurs chevauchements:

$$\begin{array}{cccccccc} \cdot & A & T & T & A & \cdot & \cdot & \cdot \\ G & A & T & T & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & T & A & C & C & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & A & C & C & A \\ G & A & T & T & A & C & C & A \end{array}$$

Malheureusement, il faut ensuite faire un long travail de vérification expérimentale, car la résolution de ce monstrueux puzzle est forcément partielle, pour trois raisons :

- Les recouvrements ne sont pas parfaits en raison des erreurs expérimentales de lecture.
- Statistiquement, il y a forcément des «trous» (*gaps*) dans la couverture des lectures, même si leur distribution est uniforme (et il y a des biais expérimentaux).
- Surtout, les codes génétiques contiennent de nombreuses répétitions, dont certaines sont très longues; or les recouvrements avec des segments répétés peuvent donner de fausses indications sur l'assemblage des fragments (avez-vous déja essayé d'assembler un de ces puzzle représentant un tas de pièces de monnaie?).

C'est ce dernier point qui est le plus gênant, car les deux premiers admettent des solutions statistiques assez satisfaisantes (pour le second point, on recoupe les parties moins fiables des lectures). En conséquence, le résultat d'un assemblage n'est pas un code complet, mais un ensemble plus ou moins réduit de segments, appelés *contigs*. Il reste donc ensuite à déterminer expérimentalement l'ordre des contigs, dans une phase de *finition*, qui est en général très coûteuse.

Un schéma expérimental astucieux permet d'alléger considérablement le travail de finition: on sélectionne des inserts assez longs (2 000 à 40 000 bases, dont on séquence les *deux* extrémités. Cette technique, qui porte le joli nom de *double-barrelled shotgun sequencing*, double statistiquement la longueur de lecture: en effet, au lieu de fragments isolés, on a maintenant des *paires* de fragments séparés par une distance connue. En outre ces paires permettent d'enjamber (*span*) les zones dont le séquençage est difficile, en particulier (et c'est ce qui nous intéresse ici) le début et la fin de segments répétés. Il faut toutefois noter que les données d'appariement sont à utilisées avec précaution: elles sont souvent (10 à 20%) erronées parce que les longs inserts sont fragiles.

2 L'algorithme eulérien

On peut aborder le problème de l'assemblage naïvement, en agglomérant graduellement les fragments présentant les meilleurs chevauchements. Avec de bonnes heuristiques, cette approche marche assez bien, mais elle donne des résultats *faux* pour les segments répétés à plusieurs endroits dans le génome. Pour obtenir des résultats acceptables, il est donc nécessaire d'écarter les fragments chevauchant le début ou la fin d'un segment répété, ce qui gonfle artificiellement le nombre de contigs et complique la phase de finition.

Au fond, l'assemblage naïf revient à chercher un chemin *hamiltonien* (qui passe une fois par chaque sommet) dans le graphe dont les sommets sont les fragments et les arcs sont les chevauchements entre fragments; or on ne connaît pas d'algorithme non exponentiel pour ce problème (il est NP-complet).

Dans ce projet on vous propose d'utiliser une approche différente, due à P. Pevner et H. Tang [1]. Dans cette approche, on construit non pas un ensemble de contigs linéaires, mais un *automate fini* qui reconnaît toutes les séquences compatibles avec les données expérimentales. Les cycles dans le graphe de cet automate correspondront donc aux segments répétés du génome dont la position exacte n'a pas pu être déterminée. Ceci permet non seulement d'éviter une fragmentation artificielle des contigs, mais en plus d'utiliser directement les données d'appariement pour l'assemblage, comme nous l'expliquerons ci-dessous. Notez toutefois que le graphe de l'automate peut ne pas être connexe, à cause des gaps de lecture.

L'algorithme proposé se décompose en six phases

1. Tout d'abord, on applique un filtre statistique très strict qui permet en pratique d'éliminer toutes les erreurs expérimentales des lectures, en corrigeant ou en écartant toutes les données suspectes.
2. Ensuite, on construit le graphe de De Bruijn des fragments, qui constitue une première approximation de l'automate.
3. On raffine et on simplifie le graphe de l'automate, de façon à obtenir un automate où chaque fragment correspond à un chemin linéaire.
4. On utilise les chemins de cet automate pour compléter les données d'appariement, ce qui donne de nouvelles séquences de lecture, et on utilise ces nouvelles séquences pour raffiner à nouveau le graphe.
5. On utilise les données d'appariement pour relier les différentes composantes connexes de l'automate (*scaffolding*).
6. On réintègre les données écartées dans la première phase pour tenter de combler les gaps au maximum.

Pour ce projet informatique, on se limitera aux étapes 2, 3 et 4, qui sont décrites en plus de détail ci-dessous. Ainsi il ne sera pas nécessaire de se plonger dans les différentes heuristiques statistiques.

2.1 Le graphe de De Bruijn

On prend, comme première approximation de l'automate, le *graphe de De Bruijn* d'ordre k du génome (où k est typiquement pris entre 16 et 20). Il s'agit du graphe dont les sommets sont toutes les sous-chaînes de longueur $k-1$ du génome, et dont les arcs correspondent aux sous-chaînes de longueur k du génome. Plus précisément, si $\alpha u \beta$ est une sous-chaîne de longueur k du génome, alors il y a un arc qui va du sommet αu au sommet $u\beta$, qu'on étiquette par α.

Tout chemin du graphe de De Bruijn qui emprunte tous ses arcs exactement une fois (un *parcours eulérien*) donne une chaîne ADN contenant exactement les mêmes sous-chaînes de longueur k que le génome. Contrairement à la recherche de parcours hamiltonien, qui demande un temps exponentiel, la recherche de parcours eulérien est très aisée. Si on connaît la *multiplicité* des arcs du graphe (c'est-à-dire que si une chaîne de longueur k apparaît m fois dans le génome, on a exactement m exemplaires de l'arc correspondant dans le graphe), on peut même trouver un parcours eulérien en temps *linéaire*, avec un parcours en profondeur (cf. la composition d'informatique fondamentale 2002).

Si on ne connaît pas les multiplicités, alors on peut recalculer en temps polynomial les multiplicités minimales qui permettent de parcourir tout le graphe (c'est le problème dit du *facteur chinois* [2]): en effet, ce parcours existe si et seulement si tous les sommets comportent autant d'arcs entrants que sortants (sauf les sommets correspondant au début et à la fin du génome). Il suffit donc de trouver δ chemins reliant les sommets ayant trop d'arcs entrants à ceux ayant trop d'arcs sortant, où δ est le déséquilibre total, ce qui peut se faire en itérant au plus δ fois une variante du calcul des plus courts chemins.

En pratique, on ne peut pas calculer exactement le graphe de De Bruijn, parce que ceci nécéssiterait de connaître par avance la totalité génome. On peut cependant en obtenir une excellente approximation, construite à partir de l'ensemble des chaînes de longueur k apparaissant dans les fragments, plutôt que dans le génome. Bien sûr, on n'obtiendra pas les multiplicités; en outre, il y aura quelques sommets et arcs manquants, à cause des gaps de lecture. Ainsi, le graphe obtenu ne sera en général pas connexe, et il aura plusieurs sommets *source* (sans arcs entrants) et *puits* (sans arcs sortant).

Il y a de très grandes chances pour qu'il y ait autant de sources que de puits, et que chaque source ou puits ne soit relié que par un seul arc au graphe: en effet il y a peu de chance pour qu'un gap se produise dans les segments répétés, qui sont au moins deux fois plus couverts par les fragments. On se placera donc sous cette hypothèse (que l'on vérifiera); on essayera donc de produire M contigs, comme autant de chemins reliant les M sources aux M puits.

2.2 Détachements et coupures

On ne peut toutefois pas faire l'assemblage simplement par parcours eulérien du graphe de De Bruijn. Celui-ci est en effet beaucoup trop ambigu: il a beaucoup de parcours eulériens, et certains sont très différents du génome réel. Ceci est du au fait qu'on a fortement dégradé les données expérimentales lors de la construction du graphe, en découpant des fragments de 500 bases en fragments de 20 bases ou moins. Chacun des fragments correspond donc à un chemin de longueur 480 dans le graphe de De Bruijn; on ne recherche pas n'importe quel parcours eulérien du graphe, mais un parcours *sur-eulérien* qui contient chacun de ces chemins.

Il n'y a pas d'algorithme évident pour calculer de tels parcours. L'idée central de l'algorithme de Pevner et Tang est de procéder à une série de transformations sur le graphe pour tenter de ramenr le problème à un parcours eulérien. Si $\langle G_0, C_0\rangle$ est la paire initiale $\langle$graphe de De Bruijn, chemins associés aux fragments$\rangle$, on obtient une séquence de récritures

$$\langle G_0, C_0\rangle \hookrightarrow \langle G_1, C_1\rangle \hookrightarrow \cdots \hookrightarrow \langle G_N, C_N\rangle$$

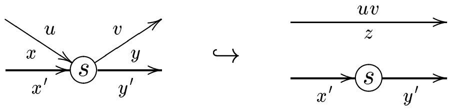
qui aboutit (idéalement) à une paire telle que C_N soit simplement l'ensemble des arc de G_N. Chaque transformation doit être *correcte*, en ce sens que les chaînes correspondant aux parcours sur-eulériens de $\langle G_{i+1}, C_{i+1}\rangle$ doivent être les mêmes que celles correspondants à celles des parcours sur-eulériens de $\langle G_i, C_i\rangle$ pour tout $i < N$.

Pour y parvenir il faut étiqueter les arcs des G_i par des chaînes ADN plutôt que par des bases isolées (d'ailleurs, il fallait déja le faire pour les arcs menant aux puits de G_0). Ainsi, un exemple élémentaire de transformation correcte consiste à contracter un sommet s de G_i n'ayant qu'un seul arc entrant x et un seul arc sortant y, respectivement étiquetés u et v; on élimine s et on remplace x et y par un nouvel arc z:

$$\xrightarrow[x]{u} (s) \xrightarrow[y]{v} \qquad \hookrightarrow \qquad \xrightarrow[z]{uv}$$

Dans C_i, on remplace la séquence xy par z partout où elle apparaît; on remplace également les y initiaux et les x terminaux par z: si on note, respectivement, C_i^{xy}, $C_i^{\rightarrow x}$, $C_i^{y\rightarrow}$ les sous-ensembles de C_i qui contiennent la séquence xy (respectivement se terminent par x, commencent par y), et que ces ensembles sont disjoints, on obtient $C_i + 1$ en remplaçant les chemins $\sigma xy\sigma' \in C_i^{xy}$ par $\sigma z\sigma'$, les chemins $\sigma x \in C_i^{\rightarrow x}$ par σz, et les chemins $y\sigma' \in C_i^{y\rightarrow}$ par $z\sigma'$ (on effectue des substitutions multiples si C_i^{xy}, $C_i^{\rightarrow x}$, $C_i^{y\rightarrow}$ ont un intersection).

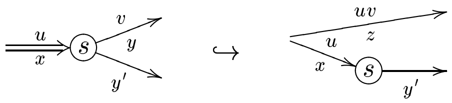
Cette transformation reste valable si x et y ne sont pas les seuls arc entrants ou sortants de s, mais sont tous deux des arcs *simples*. Dans ce cas, on ne supprime pas s, et la transformation s'appelle le *détachement* de la séquence xy:



La transformation est correcte dès lors que C_i^{xy} n'est pas vide: en effet puisque x et y ne sont pas multiples, le parcours sur-eulérien ne passe qu'une seule fois par ces arcs, et puisqu'il contient un chemin de C_i^{xy}, il emprunte y après x. Le parcours sur-eulérien contient donc un chemin $\sigma x \in C_i^{\to x}$ si et seulement si il contient σxy, lequel correspond à la même chaîne que $\sigma z \in C_{i+1}$.

En revanche, cette transformation n'est *pas* correcte si par exemple x est un arc multiple (donc la fin d'un segment répété). En effet dans ce cas un chemin $\sigma x \in C_i^{\to x}$ pourrait apparaître suivi d'un arc $y' \neq y$ dans le parcours sur-eulérien, et il ne serait donc pas correct de remplacer x par z dans ce cas. Toutefois, si tous les arcs sortants de s sont simples, on peut tenter de résoudre cette ambiguité en recoupant les chemins:

- Deux chemins de C_i sont dits *compatibles* si leur union est encore un chemin linéaire: une paire de chemins compatibles est donc soit de la forme $\{\sigma\sigma', \sigma'\sigma''\}$ (chevauchement), soit de la forme $\{\sigma', \sigma\sigma'\sigma''\}$ (inclusion).
- La séquence xy est *détachable* si C_i^{xy} n'est pas vide et que tout chemin de $C_i^{\to x}$ est incompatible, soit avec un chemin de C_i^{xy}, soit avec un chemin de $C_i^{xy'}$ pour *chaque* y' tel que $C_i^{xy'}$ ne soit pas vide.
- Dans le *détachement* de xy, on ne supprime pas x de G_i, et on ne remplace les x terminaux par z que pour les chemins de $C_i^{\to x}$ qui sont incompatibles avec les $C_i^{xy'}$.



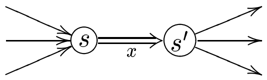
En effet chaque x qui apparaît dans un parcours sur-eulérien est suivi soit de y, soit d'un des y', et chacun de ceux-ci n'apparaît qu'une seule fois. Si σx apparaît dans le parcours mais est incompatible avec un chemin de $C_i^{xy'}$ pour chaque $y' \neq y$, alors il est forcément suivi de x.

Si c'est y qui est multiple, alors on impose une condition analogue pour les chemins de $C_i^{y\to}$, et la transformation reste correcte si x et y sont tous deux multiples, que les deux conditions sont vérifiées, et que tous les autres arcs sont simples. Bien qu'il soit facile de trouver des contre exemples théoriques, en pratique les conditions de détachabilité ne sont pas vérifiées lorsqu'il y a trop d'arêtes multiples, et donc on peut éviter de calculer la multiplicité des arcs sur le graphe initial (au demeurant, il faudrait refaire ces calculs, car si l'heuristique de multiplicité minimale identifie correctement les arc multiples, elle peu faire des erreurs sur la valeur exacte de la multiplicité).

En revanche, le détachement n'est pas correct lorsque les conditions de détachabilité ne sont pas vérifiées. Il se peut toutefois qu'un détachement initialement impossible le devienne à la suite d'autres transformations sur le graphe; ainsi, sur des données réelles on trouve que 95% des séquences d'arcs sont détachables.

Il reste toutefois 5% d'arcs ambigus, qui ne sont détachables ni à gauche, ni à droite. La situation caractéristique est la suivante

- Un arc multiple x va de s à s'; x est le seul arc sortant de s, et le seul arc entrant de s'; par contre s a plusieurs arcs entrants, et s' plusieurs arcs sortant.



- $C_i^{x\rightarrow} \cup C_i^{\rightarrow x}$ est l'ensemble de tous les chemins de C_i contenant x: dans C_i, x ne peut être qu'au début ou à la fin d'un chemin.

Un tel arc x est *supprimable*. La transformation correspondante s'appelle une *coupure*; elle consiste à laisser G inchangé, mais à supprimer x de tous les chemins de C_i, sauf pour le chemin de longueur 1 x, que l'on rajoute.

La pratique montre que ces deux transformations, détachements et coupures, suffisent à ramener le problème du parcours sur-eulérien à celui du parcours eulérien, en tout cas sur les données expérimentales.

2.3 Paires d'extrémités

La phase suivante de l'algorithme utilise les données d'appariement pour lever une bonne parite des ambiguités qui persistent dans le graphe transformé. L'idée est la suivante:

- Dans le dernier graphe, chaque fragment correspond à un arc, avec un décalage entier dû aux détachements et coupures.
- Un insert correspond donc à une paire d'arcs (x, y), et une longueur, qui doit être la longueur d'un chemin commençant en x et se terminant en y (où la longueur d'un arc est celle de la chaîne qui l'étiquette).
- Si il y a *exactement un* chemin de x à y qui a la bonne longueur, alors ce chemin est le séquencement de l'insert; on peut donc rajouter un fragment de 2 000 à 10 000 bases aux données expérimentales!

On peut alors recommencer à faire des détachements et coupures avec ces nouvelles données, ce qui éliminera encore des ambiguités. Ce raffinement va éliminer des chemins superflus dans le graphe, ce qui va permettre d'utiliser d'autres inserts, donc il est avantageux d'itérer le cycle recherche de chemins/détachements plusieurs fois. En pratique, il ne subsiste souvent à la fin que des ambiguités dues à des segments répétés plus longs que les inserts, et donc irréductibles même en théorie. Soulignons enfin que la méthode s'applique même si la longueur n'est connue qu'approximativement, et même en présence d'appariement erronés (puisqu'on ignore les x, y qui ne sont pas connectés par un chemin de la bonne longueur).

3 Travail demandé

Il s'agit de mettre en œuvre l'algorithme de Pevner et Tang pour des lectures *simulées*, sans erreurs.

- Votre programme travaillera principalement avec des fichiers. Il aura en entrée deux fichiers texte, un contenant le génome à assembler (chaîne de A, C, G, T coupée en lignes), l'autre les paramètres de l'expérience (nombre et longueurs d'inserts, longueur des lectures, initialisation du générateur aléatoire, ordre du graphe de De Bruijn, etc). Votre programme devra pouvoir produire l'automate final, sous un format que vous définirez. Optionellement, votre programme pourra écrire et lire l'«expérience» qu'il simule.
- Votre programme devra simuler une expérience de séquencement, puis appliquer l'algorithme d'assemblage décrit dans la section précédente: construction du graphe de De Bruijn, détachements, et complétion des inserts. Il devra ensuite pouvoir comparer ses résultats au vrai génome.

- Bien qu'il ne soit pas nécessaire que votre programme fonctionne avec un génome complet, vous devrez prendre soin de choisir des structures de données raisonnablement efficaces. En particulier, l'utilisation du hachage est indispensable pour la construction du graphe initial.
- On attend de vous une attitude critique vis à vis de votre travail. Essayez plusieurs génomes, plusieurs taux de couverture des lectures, plusieurs ordres de graphe et comparez les résultats obtenus.

Il sera difficile de vous attaquer au problèmes de correction d'erreur dans le volume horaire du projet. D'autres extensions sont par contre possibles:

- Vous pouvez calculer les multiplicités dans le graphe final, et produire les différents ensembles de contigs possibles.
- Vous pouvez utiliser les données d'appariement pour relier les contigs entre eux et ainsi produire un *échafaudage* de la séquence complète.
- Vous pouvez réaliser un affichage graphique des graphes désambigués.

Références

[1] Pavel A. Pevner amd Haixu Tang, "*Fragment Assembly with Double-Barrelled Data*", Bioinformatics Discovery Note, **1**(1), pp. 1–9, 2001. `http://nbcr.sdsc.edu/euler/euler.htm`.

[2] Harold Thimbleby, "*The Directed Chinese Postman Problem*",`http://www.uclic.ucl.ac.uk/harold/`