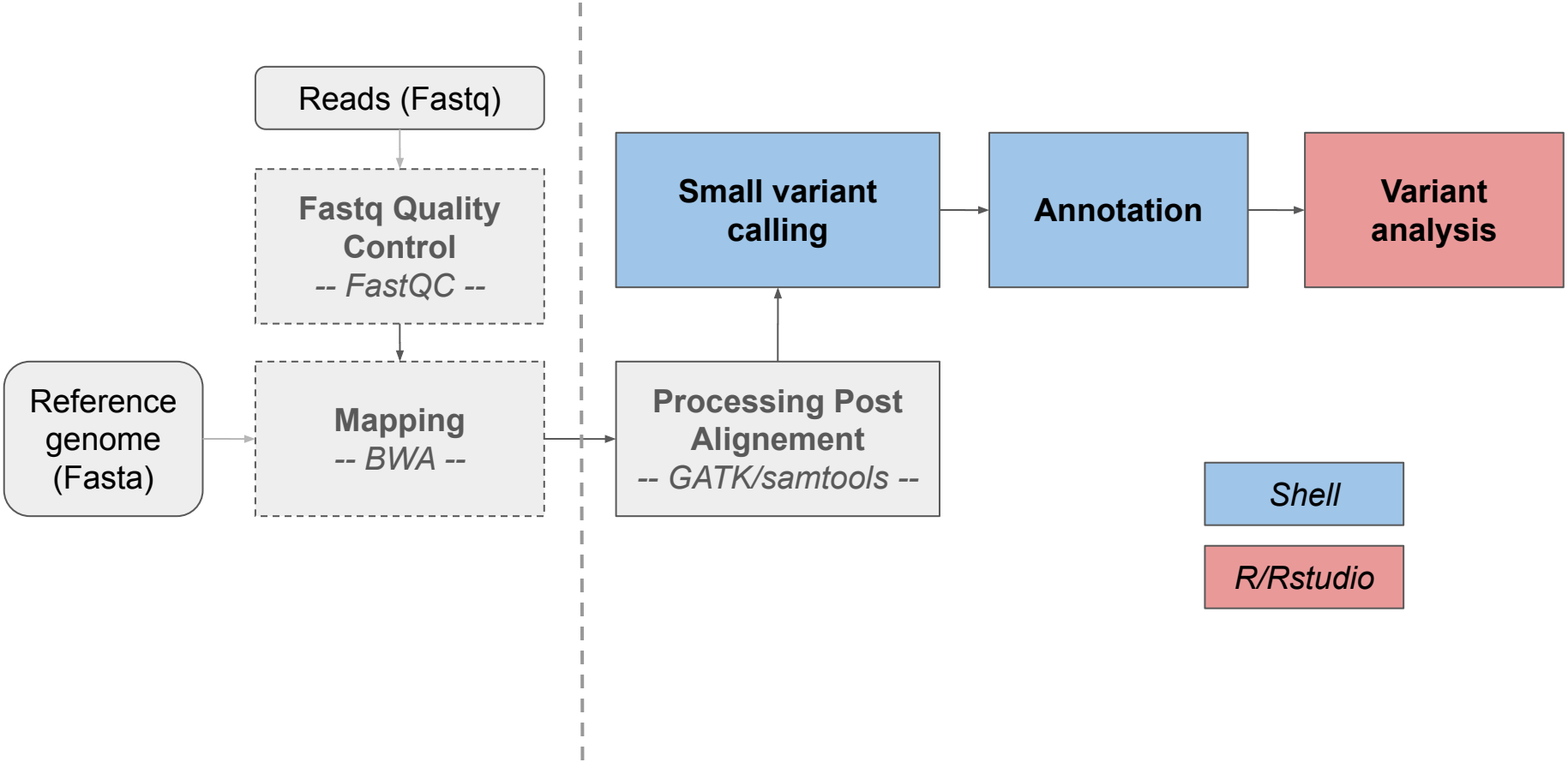
Variant calling

Vivien Deshaies - AP-HP

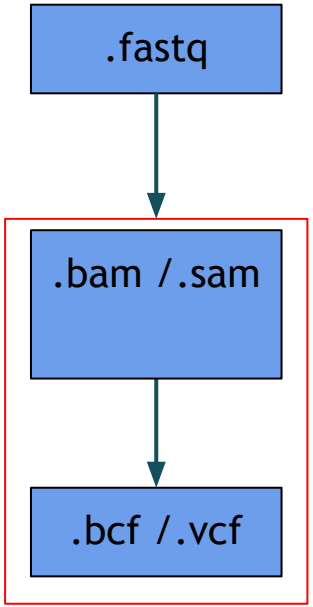
École de bioinformatique INRAe-IFB-INSERM 2025

Workflow


Reads (Fastq)
Fastq Quality Control
-- FastQC --
Reference genome (Fasta)
Mapping
-- BWA --
Processing Post Alignement
-- GATK/samtools --
Small variant calling
Annotation
Variant analysis
Shell
R/Rstudio

Qu'appelle t-on "Variant Calling"

Détection **automatisée** des variants (SNVs, Indels de petite taille) à partir d'un fichier contenant des données de séquençage alignées (BAM)




```
@H5:1:H3T27BBXY:8:1101:1955:1191/1
ATTNTTATAGATTCTAGGAAGTTGCTCGAGAAGTTTTCTAATTAGTAGAAGTTGTTGGAGAAGCGTCCTAGTTAGCGGAAGTAGCTCGAGAAGCTTCCTATTCAGTAATATATATAAGAGTCGAGG
+
AAA#FJJFJJJJFFJJJJJJJJFJJFJFJJJJJJ<<AJJJJJJJJJJJJJA<JJFJJJJJJJJJJFF<<JJJFJJJJFAJFJJ<JFJJJJJJJJF<FJJAJ-FFJFFAAAFJ<A-FJFJJ-7FFFJ
```

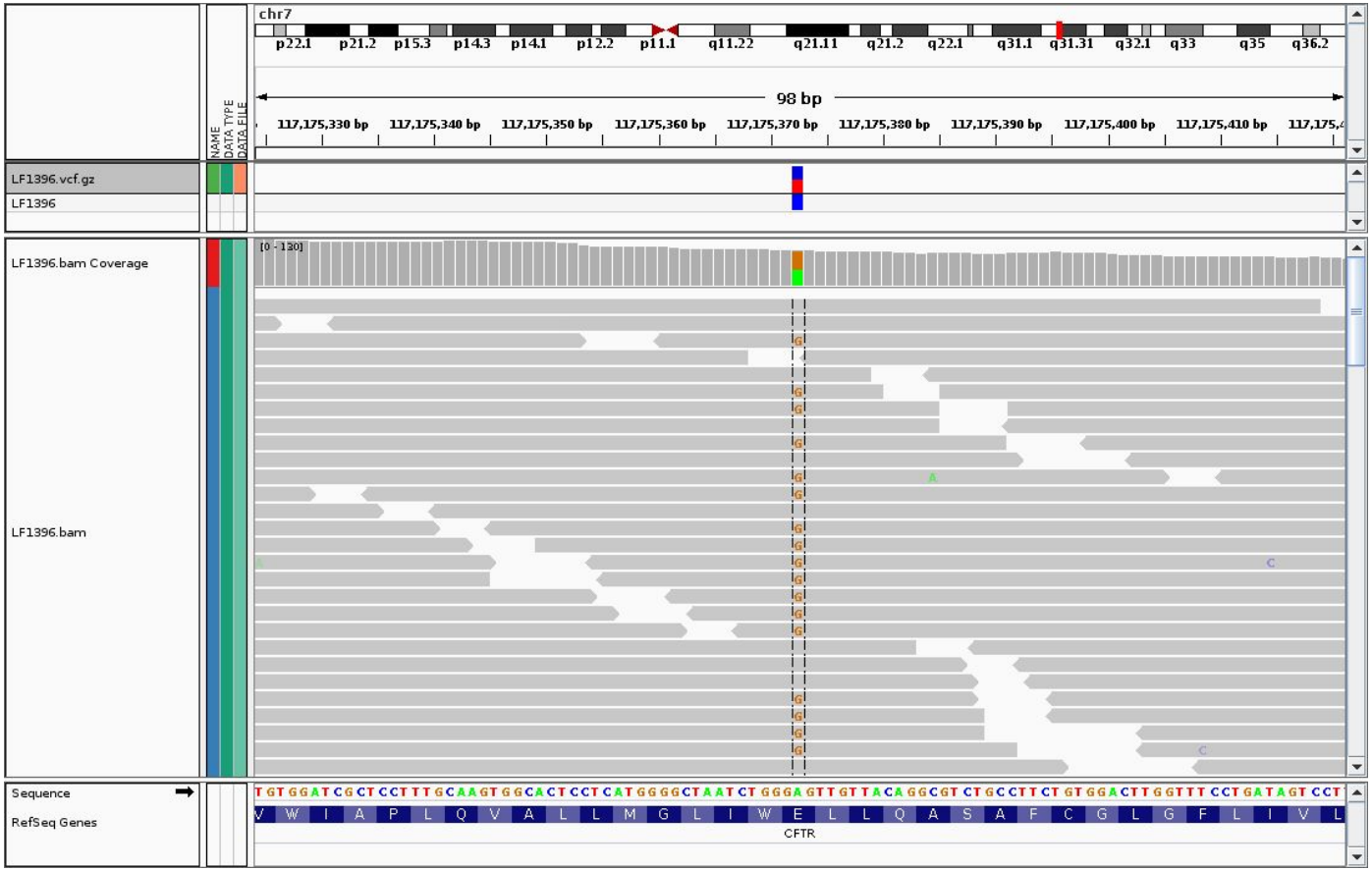
```
H5:1:H3T27BBXY:8:1110:4878:2035 83      Chr01   1568    60      136M    =       1495    -209    AAACCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAA
H5:1:H3T27BBXY:8:1128:11657:35198       99      Chr01   1572    60      151M    =       1843    422     CCTAAACCCTAAACCCTAAACCC
H5:1:H3T27BBXY:8:1217:6045:36200        163     Chr01   1575    60      115M    =       1575    126     AAACCCTAAACCCTAAACCCTAA
H5:1:H3T27BBXY:8:1217:6045:36200        83      Chr01   1575    60      126M    =       1575    -126    AAACCCTAAACCCTAAACCCTAA
H5:1:H3T27BBXY:8:2227:16863:39963       83      Chr01   1582    60      89M     =       1560    -111    AACCCCTAACCCCTAAACCCTAA
```

```
#CHROM  POS     ID      REF     ALT     QUAL    FILTER  INFO    FORMAT  Ech-456
Chr2    1091    .       C       A       161.77  .       AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=0.672;ClippingRankSum=0.567;DP=44;Exces
Chr2    1226    .       T       A       618.77  .       AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=-6.233;ClippingRankSum=1.014;DP=201;Exc
Chr2    1708    .       G       A       133.77  .       AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=0.000;ClippingRankSum=-0.720;DP=6;Exces
```

Qu'appelle t-on "Variant Calling"

.vcf

.bam /.sam



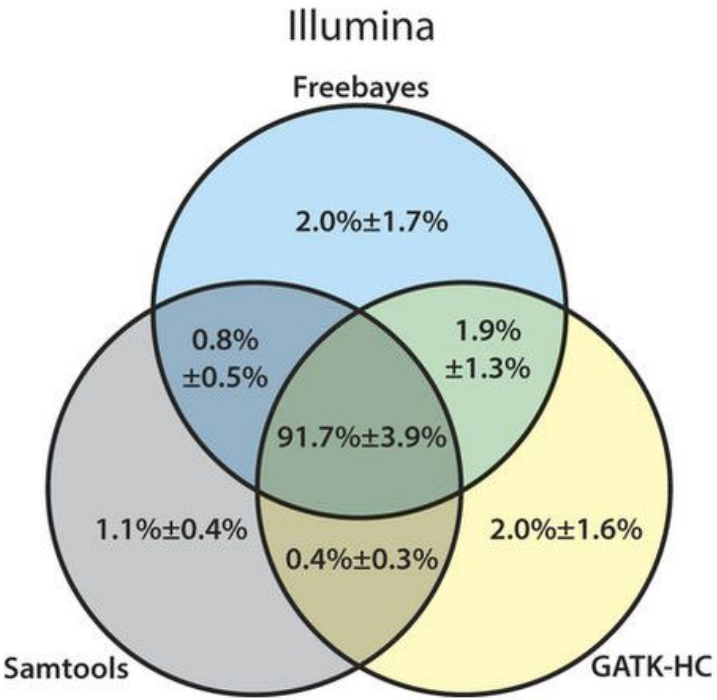
https://jchoigt.wordpress.com/2012/07/18/working-with-23andme-exome-data-my-cf-allele-and-the-need-for-verification/

Variant callers

- Choix du variant caller en fonction de la question biologique
- Utilisés classiquement par la communauté :
    - GATK Haplotype Caller
    - Samtools mpileup/Bcftools
    - Samtools mpileup/VarScan2
    - FreeBayes
    - GATK Mutect2 (spécifique à la détection tumorale)
    - DiscoSnp (variant calling sans génome de référence)
    - DeepVariant : variant calling par analyse d'images pileup (regions complexes, low depth)

→ Aucun outil n'est parfait : la qualité du calling dépend de l'ensemble du pipeline, des données analysées, et des paramètres utilisés pour filtrer les résultats

Concordance entre variant callers



- **Concordance de 91.7%** entre Freebayes, Samtools, GATK HC (Hwang et al., 2015)

- D'autres analyses montrent des taux plus bas :
  - **70%** (O'Rawe et al., Genome Med, 2013)
  - **57%** (Cornish et al., BioMed, 2015)

- La **sensibilité** et la **précision** diffèrent selon les outils et les paramètres utilisés

/!\ Existence de variants qui sont spécifiques aux différents callers /!\

Hwang et al., "Systematic comparison of variant calling pipelines using gold standard personal exome variants" Scientific Reports, vol. 5, pp. 17875, 2015.

Difficultés - Limitations

- De nombreux variants Faux Positifs peuvent survenir des étapes précédentes :
  - Artéfacts issus des **cycle PCR** pendant la préparation des échantillons
  - Artéfacts liés à **la technologie de séquençage** (PacBio, HiSeq, NextSeq, …)
  - Difficultées d'**alignement** (régions d'ADN répétées)
  - **Erreurs de lecture** lors du "BaseCalling"

- Des algorithmes complexes de détection compliquent l'interprétation des résultats

En conclusion

- La détection de variant permet d'i**dentifier des SNVs et petits Indels** à partir d'un fichier d'alignement au format BAM

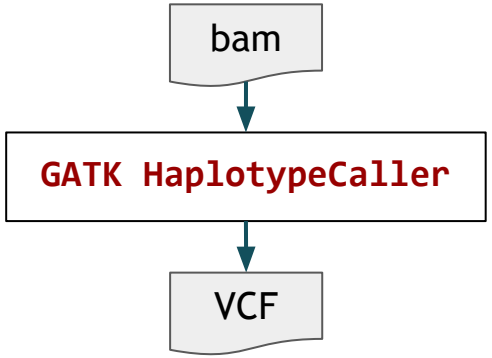
- De nombreux outils existent pour la détection de variants, leur efficacité dépend de nombreux paramètres (mapping, qualité des données, paramètres de filtrage des résultats)

- La "**sensibilité**" et la "**précision**" permettent d'évaluer la qualité des résultats de détection de variant. Pour un même outil ces mesures varient selon les seuils de qualité utilisés.

Aller au jupyterNoteBook

1/GATK HaplotypeCaller avec sortie VCF

Single-sample variant calling



VCF (variant call format)

VCF header

```
##fileformat=VCFv4.2
##FILTER=<ID=LowQual,Description="Low quality">
##FORMAT=<ID=AD,Number=R,Type=Integer,Description="Allelic depths for the ref and alt alleles in the order listed">
##FORMAT=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Approximate read depth (reads with MQ=255 or with bad mates are filte…
##FORMAT=<ID=GQ,Number=1,Type=Integer,Description="Genotype Quality">
##FORMAT=<ID=GT,Number=1,Type=String,Description="Genotype">
##FORMAT=<ID=PL,Number=G,Type=Integer,Description="Normalized, Phred-scaled likelihoods for genotypes as defined in the …
##GATKCommandLine=<ID=HaplotypeCaller,CommandLine="HaplotypeCaller  --min-base-quality-score 18 --emit-ref-confidence NO…
##INFO=<ID=AF,Number=A,Type=Float,Description="Allele Frequency, for each ALT allele, in the same order as listed">
##INFO=<ID=AN,Number=1,Type=Integer,Description="Total number of alleles in called genotypes">
 …
##INFO=<ID=ReadPosRankSum,Number=1,Type=Float,Description="Z-score from Wilcoxon rank sum test of Alt vs. Ref read posit…
##INFO=<ID=SOR,Number=1,Type=Float,Description="Symmetric Odds Ratio of 2x2 contingency table to detect strand bias">
##contig=<ID=6,length=119458736>
##source=HaplotypeCaller
```

Body

#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	SRR1262731
6	37913396	.	T	A	67.64	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:3,2:5:75:75,0,105
6	37916445	.	GT	G	58.60	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:1,2:3:28:66,0,28
6	37921683	.	C	CA	55.60	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:7,2:9:63:63,0,279

SNP

Insertion

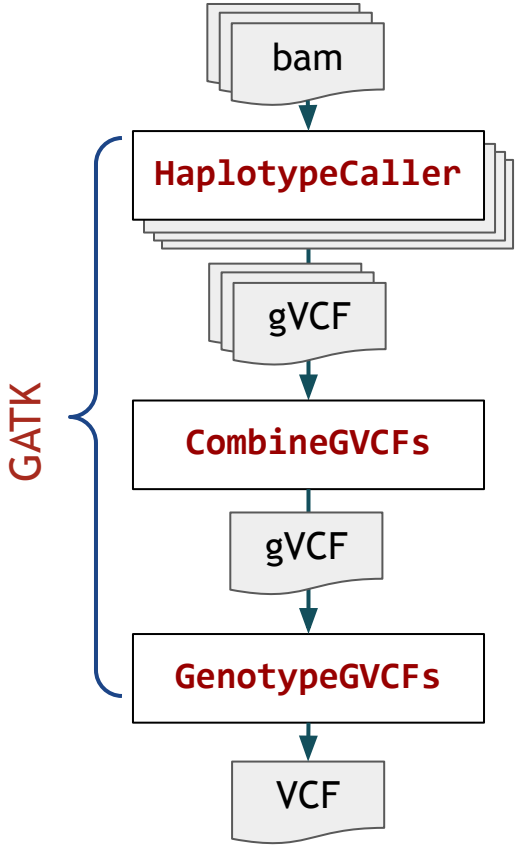
Deletion

Génotype

Qualité du génotype

2/GATK HaplotypeCaller en mode GVCF

Multi-sample variant calling



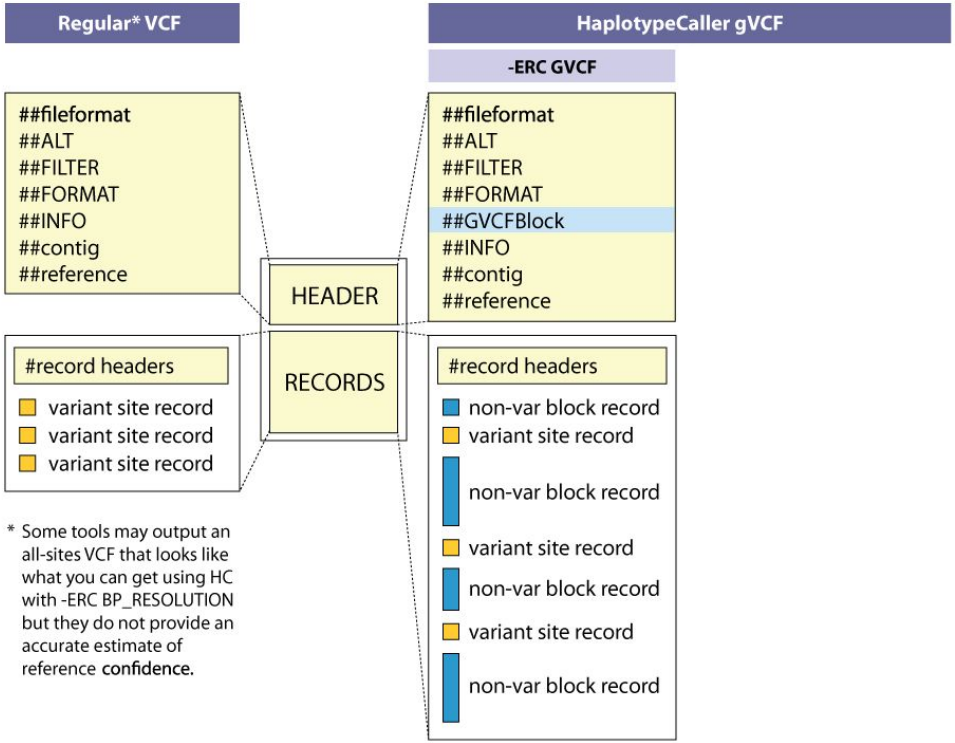
- En 3 étapes (=> 3 outils) :

Variant-calling avec sortie gvcf / par échantillon

Combiner les sorties gvcf en 1 sortie gvcf

Identifier les variants simultanément sur tous les échantillons

Sorties VCF *vs.* gVCF (option -ERC)



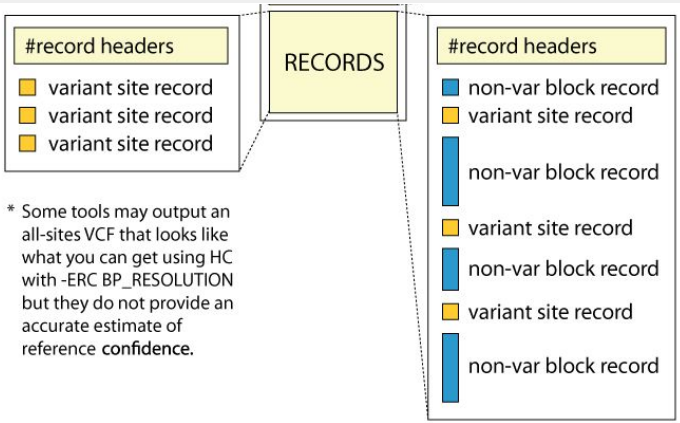
Sorties VCF *vs.* gVCF (option -ERC)

VCF

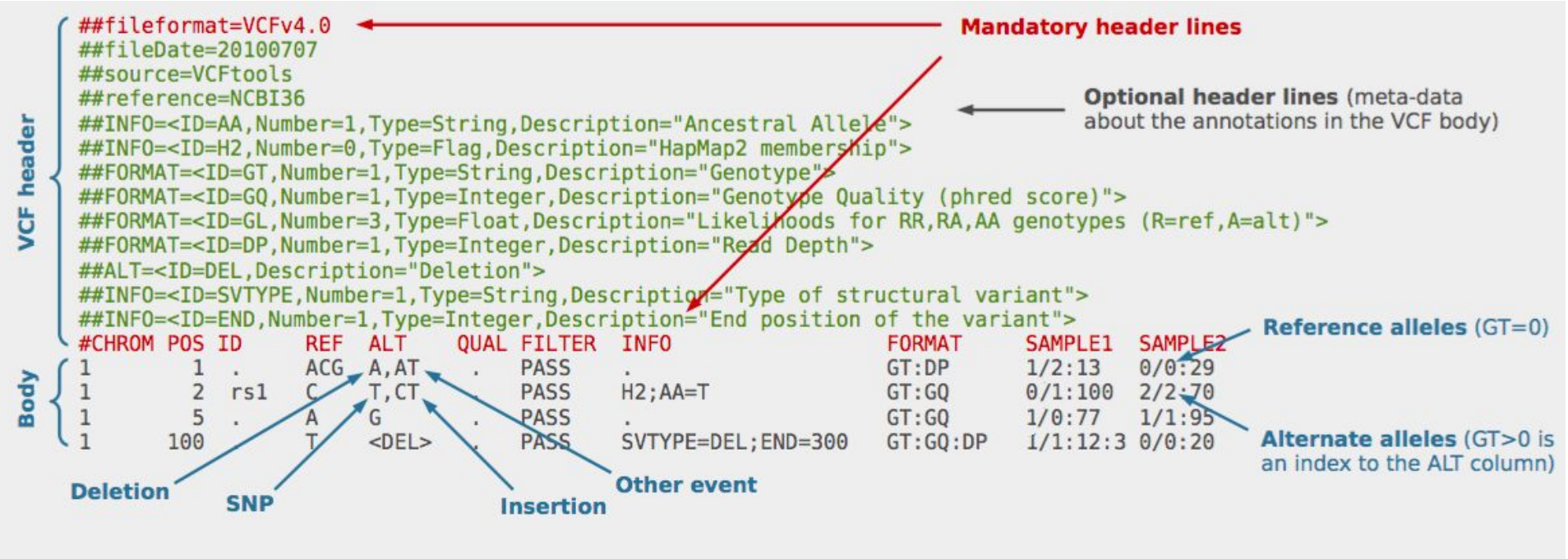
#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	SRR1262731
6	37913396	.	T	A	67.64	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:3,2:5:75:75,0,105
6	37916445	.	GT	G	58.60	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:1,2:3:28:66,0,28
6	37921683	.	C	CA	55.60	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:7,2:9:63:63,0,279

gVCF

#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	SRR1262731
6	37913111	.	G	<NON_REF>	.	.	END=37913131	GT:DP:GQ:MIN_DP:PL	0/0:3:9:3:0,9,114
6	37913132	.	A	<NON_REF>	.	.	END=37913133	GT:DP:GQ:MIN_DP:PL	0/0:4:12:4:0,12,170
...									
6	37913394	.	T	<NON_REF>	.	.	END=37913395	GT:DP:GQ:MIN_DP:PL	0/0:5:12:5:0,12,180
6	37913396	.	T	A,<NON_REF>	67.64	.	BaseQRankSum...	GT:AD:DP:GQ:PL:SB	0/1:3,2,0:5:75:75,..
6	37913397	.	A	<NON_REF>	.	.	END=37913400	GT:DP:GQ:MIN_DP:PL	0/0:5:12:5:0,12,180

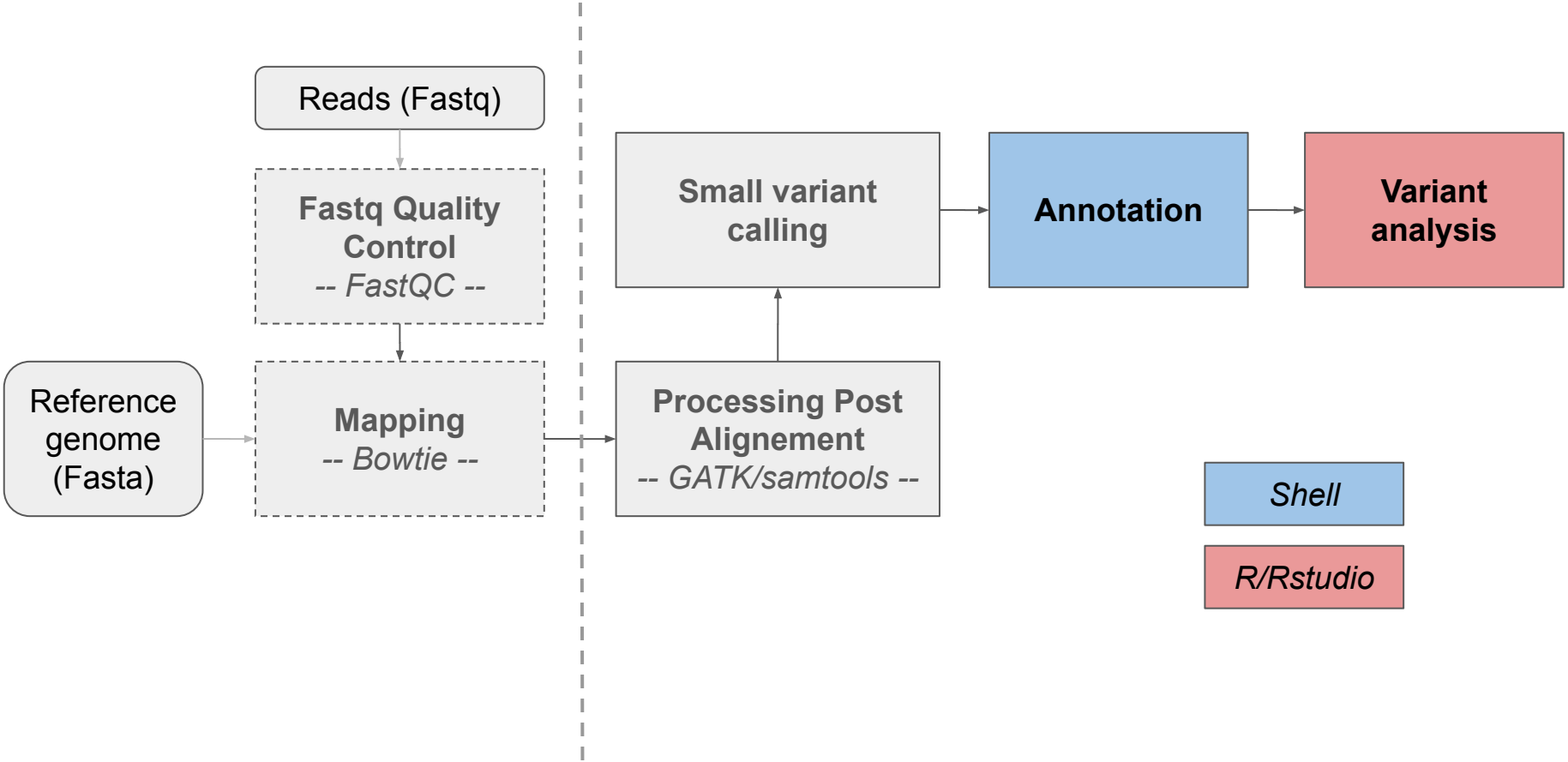


VCF Multi-échantillons



https://petridishtalk.com/2013/02/01/variant-discovery-annotation-filtering-with-samtools-the-gatk/

Workflow


Reads (Fastq)
Fastq Quality Control
-- FastQC --
Reference genome (Fasta)
Mapping
-- Bowtie --
Processing Post Alignement
-- GATK/samtools --
Small variant calling
Annotation
Variant analysis
Shell
R/Rstudio

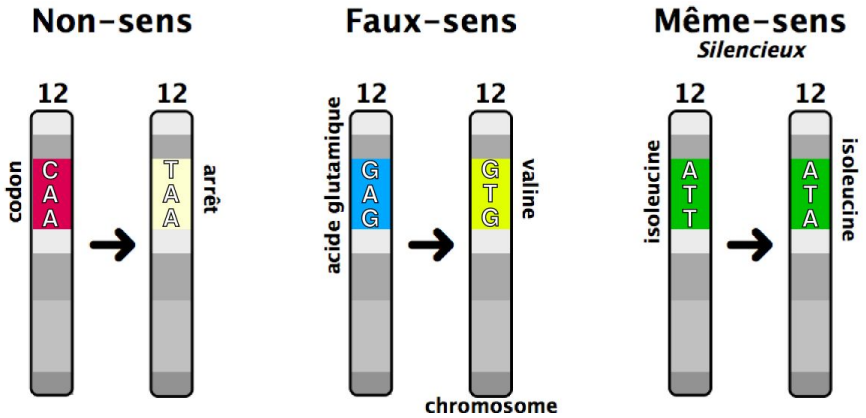
Annotation des variants

- Ajout d'informations biologiques pertinentes aux variants :

→ Est-ce que mes variants sont connus ?

→ Où se positionnent mes variants ?

→ Quel est l'effet d'une mutation sur le CDS qui le contient ?

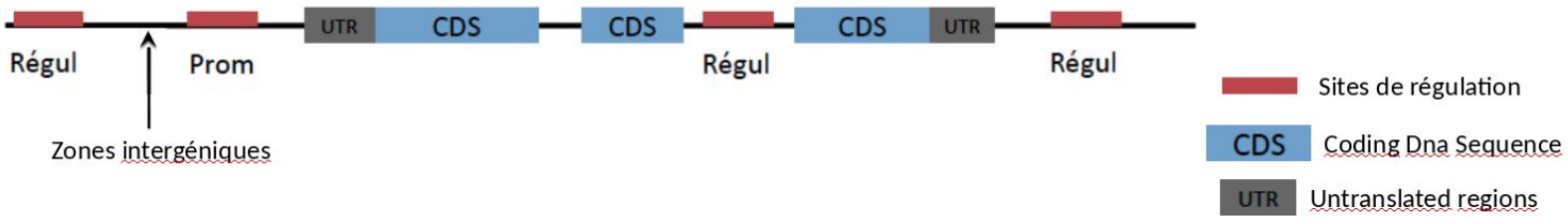


Annotation des variants

- Annotation structurale :
  → Mon variant se trouve-t-il dans un intron, un exon ?

- Annotation fonctionnelle :
  → Informations sur la région ? Exemple : CDS codant pour une protéine

- Impacts potentiels :
  → Dans le cas d'un CDS, protéine produite tronquée, allongée, décalée… ou silencieuse (redondance du code génétique)



Annotation des variants

- Nécessité d'avoir des bases de données associées aux organismes étudiés (Ensembl, Refseq...)

- Exemples d'**outils/algorithmes** :
  → SnpEff
  → VEP
  → Annovar
  → SIFT, POLYPHEN2, CADD…
  → dbNSFP,

Aller au jupyterNoteBook