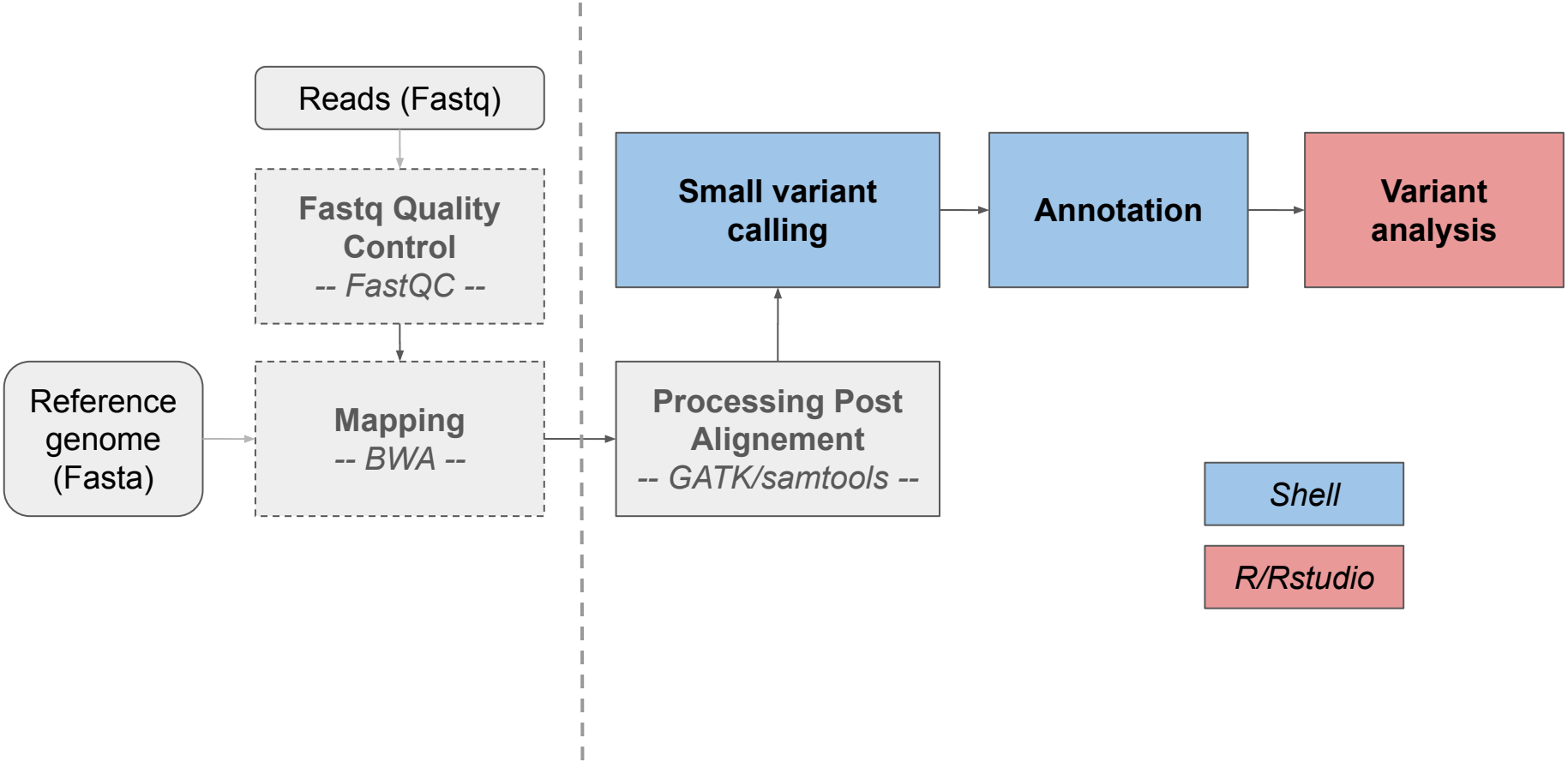
Variant calling

Gabrièle Adam - INRAE

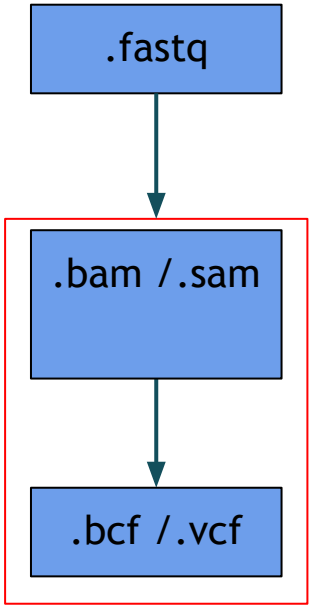
École de bioinformatique AVIESAN-IFB-INSERM 2023

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
```

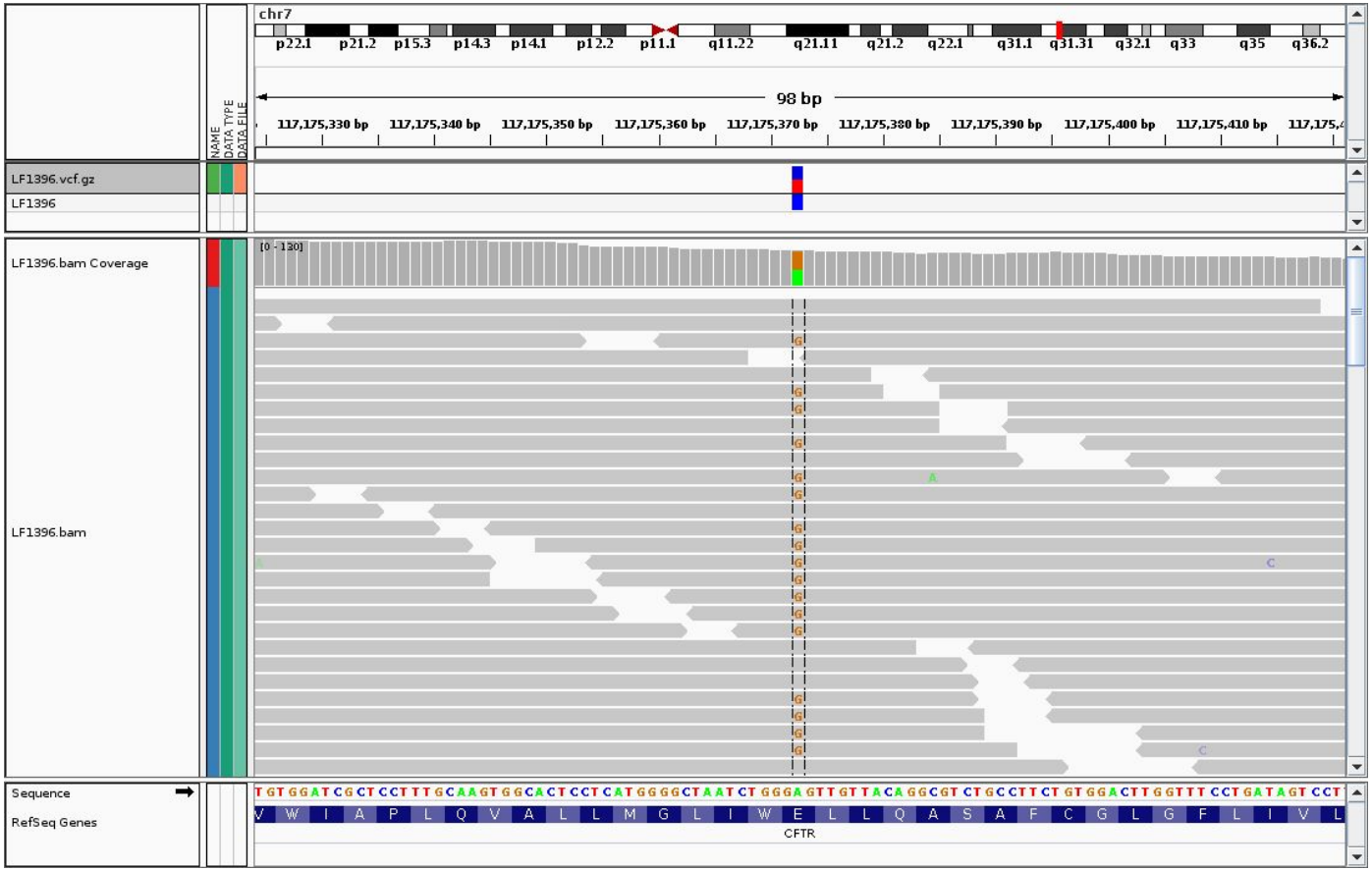
```
H5:1:H3T27BBXY:8:1110:4878:2035 83      Chr01   1568    60      136M    =       1495    -209    AAACCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAA
H5:1:H3T27BBXY:8:1128:11657:35198       99      Chr01   1572    60      151M    =       1843    422     CCTAAACCCTAAACCCTAAACCC
H5:1:H3T27BBXY:8:1217:6045:36200        163     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



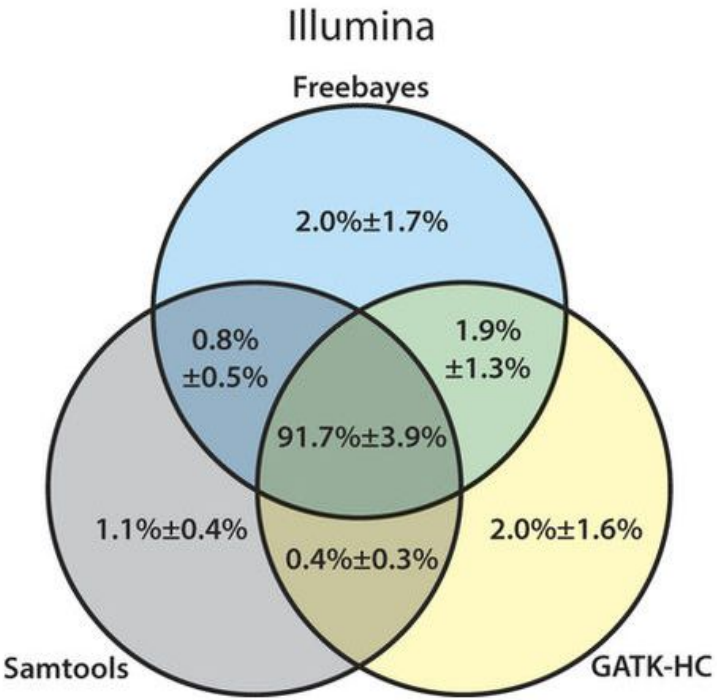
https://jchoigt.wordpress.com/2012/07/18/working-with-23andme-exome-data-my-cf-allele-and-the-need-for-verification/

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 (???) (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.

Partie TP

- **GATK HaplotypeCaller :**
  - GATK (Genome Analysis ToolKit) est une suite d'outils développée par le Broad Institute
  - Bonne documentation (Best Practices)
  - Permet la gestion d'analyse de plusieurs échantillons (format gVCF)
  - Comporte une étape de réassemblage et réalignement local des indel.
  - Algorithme bayésien (modèles statistiques pour estimer la probabilité de chaque génotype possible, en prenant en compte les différents biais pouvant introduire du bruit dans les données)

GATK HaplotypeCaller

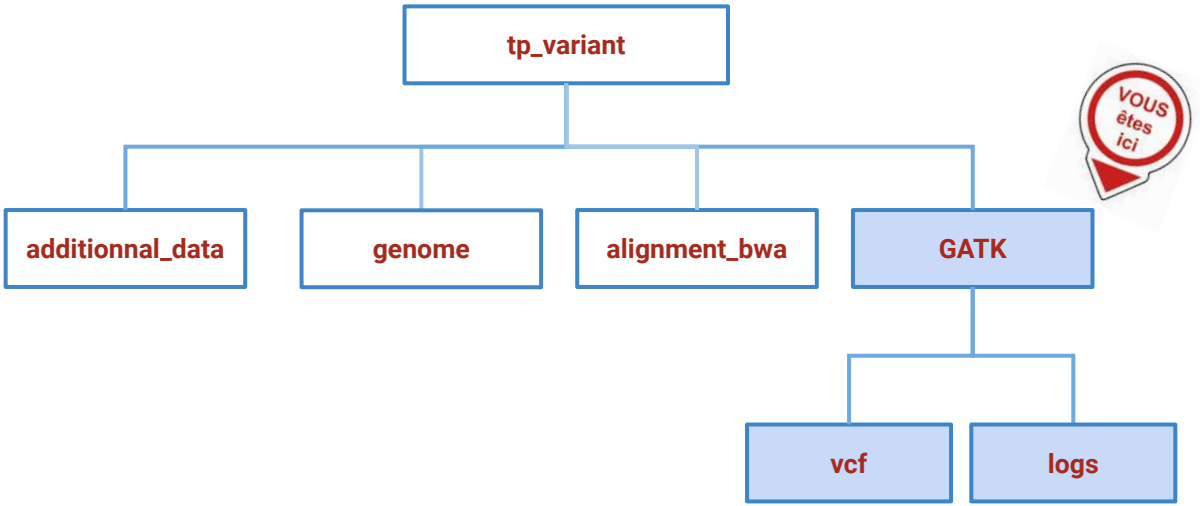
```
$ module load gatk4/4.2.3.0        # si vous ne l'avez pas déjà fait
```

```
$ gatk HaplotypeCaller                        # affiche l'aide d'HaplotypeCaller
Required Arguments:
--input,-I:String       BAM/SAM/CRAM file containing reads. This argument must be specified at least once.

--output,-O:String      File to which variants should be written  Required.

--reference,-R:String   Reference sequence file  Required.

--min-base-quality-score,-mbq:Byte
                        Minimum base quality required to consider a base for calling  Default value: 10.
...
--emit-ref-confidence,-ERC:ReferenceConfidenceMode
                        Mode for emitting reference confidence scores …
                        Default value: NONE. Possible values: {NONE, BP_RESOLUTION, GVCF}
```

1/GATK HaplotypeCaller avec sortie VCF

Single-sample variant calling

```
# Création d'un répertoire pour l'appel des variants
$ mkdir -p ~/tp_variant/GATK/vcf
$ cd ~/tp_variant/GATK/
```



1/GATK HaplotypeCaller avec sortie VCF

Single-sample variant calling

```
# Création d'un répertoire pour l'appel des variants
$ mkdir -p ~/tp_variant/GATK/vcf
$ cd ~/tp_variant/GATK/
# Détection de variant GATK avec sortie VCF
$ gatk HaplotypeCaller --java-options '-Xmx8G' \
     --input ~/tp_variant/SRR1262731_extract.sort.md.filt.onTarget.bam \
     --reference ~/tp_variant/genome/Bos_taurus.UMD3.1.dna.toplevel.6.fa \
     --min-base-quality-score 18  \
     --minimum-mapping-quality 30 \
     --emit-ref-confidence "NONE" \
     --output vcf/SRR1262731_extract_GATK.vcf \
     --intervals ~/tp_variant/additionnal_data/QTL_BT6.bed

$ ls -ltrh vcf/
$ less -S vcf/SRR1262731_extract_GATK.vcf
```

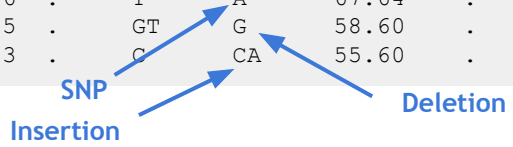
VCF (variant call format)

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 filtered)"
##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 VCF s
##GATKCommandLine=<ID=HaplotypeCaller,CommandLine="HaplotypeCaller  --min-base-quality-score 18 --emit-ref-confidence NONE --
##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=BaseQRankSum,Number=1,Type=Float,Description="Z-score from Wilcoxon rank sum test of Alt Vs. Ref base qualities">
##INFO=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Approximate read depth; some reads may have been filtered">
##INFO=<ID=ExcessHet,Number=1,Type=Float,Description="Phred-scaled p-value for exact test of excess heterozygosity">
##INFO=<ID=FS,Number=1,Type=Float,Description="Phred-scaled p-value using Fisher's exact test to detect strand bias">
##INFO=<ID=InbreedingCoeff,Number=1,Type=Float,Description="Inbreeding coefficient as estimated from the genotype likelihoods
##INFO=<ID=MLEAC,Number=A,Type=Integer,Description="Maximum likelihood expectation (MLE) for the allele counts (not necessari
##INFO=<ID=MLEAF,Number=A,Type=Float,Description="Maximum likelihood expectation (MLE) for the allele frequency (not necessar
##INFO=<ID=MQ,Number=1,Type=Float,Description="RMS Mapping Quality">
##INFO=<ID=MQRankSum,Number=1,Type=Float,Description="Z-score From Wilcoxon rank sum test of Alt vs. Ref read mapping qualiti
##INFO=<ID=QD,Number=1,Type=Float,Description="Variant Confidence/Quality by Depth">
##INFO=<ID=ReadPosRankSum,Number=1,Type=Float,Description="Z-score from Wilcoxon rank sum test of Alt vs. Ref read position b
##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

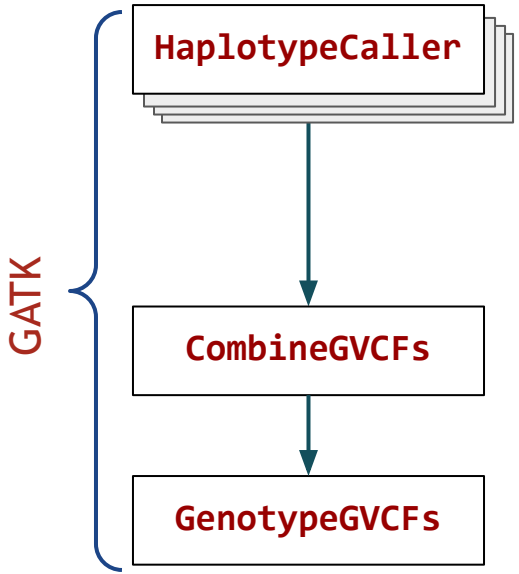
#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	SRR1262731
6	37913396	.	T	A	67.64	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:3,2:5:75:75,0,105
6	37916445	.	GT	G	58.60	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:1,2:3:28:66,0,28
6	37921683	.	C	CA	55.60	.	AC=1;AF=0.500;...	GT:AD:DP:GQ:PL	0/1:7,2:9:63:63,0,279



1/GATK HaplotypeCaller en mode GVCF

Multi-sample variant calling

- En 3 étapes (=> 3 outils) :



Variant-calling avec sortie gvcf / par échantillon

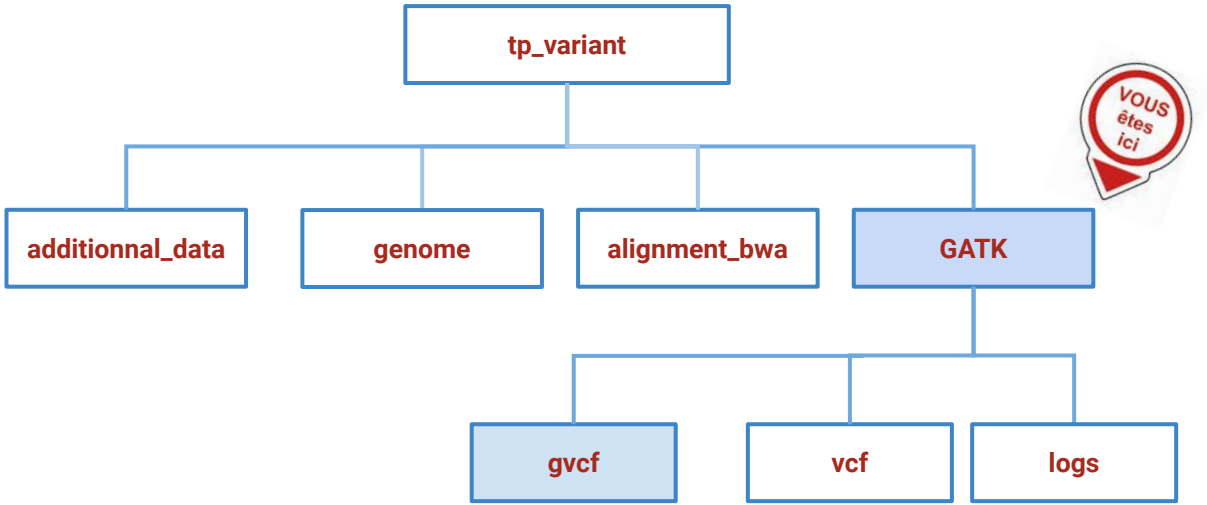
Combiner les sorties gvcf en 1 sortie gvcf

Identifier les variants simultanément sur tous les échantillons

1/GATK HaplotypeCaller en mode GVCF

Multi-sample variant calling

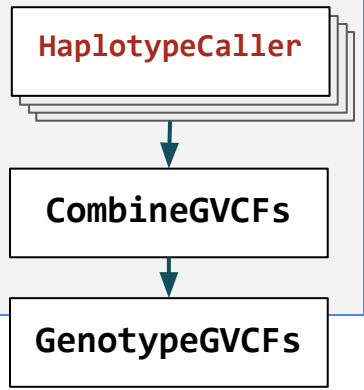
```
# Création d'un répertoire pour l'appel des variants
$ mkdir -p ~/tp_variant/GATK/gvcf
```



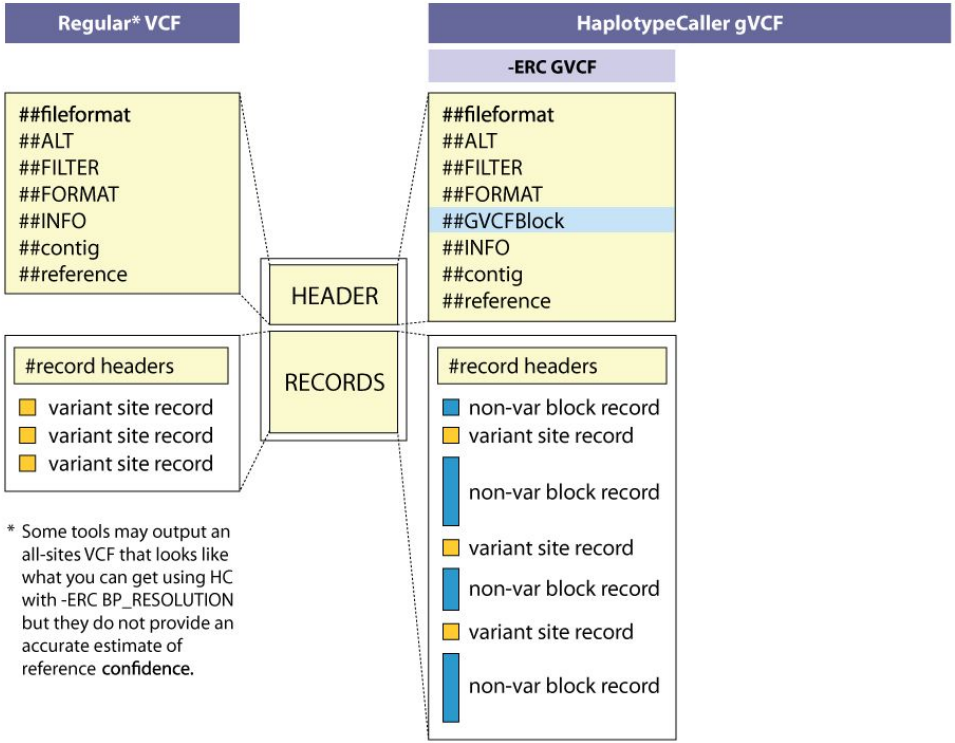
1/GATK HaplotypeCaller en mode GVCF

Multi-sample variant calling

```
# 1.Détection de variants GATK avec sortie gVCF
$ mkdir -p ~/tp_variant/GATK/gvcf
$ gatk HaplotypeCaller --java-options '-Xmx8G' \
    --input ~/tp_variant/SRR1262731_extract.sort.md.filt.onTarget.bam \
    --reference ~/tp_variant/genome/Bos_taurus.UMD3.1.dna.toplevel.6.fa \
    --min-base-quality-score 18  \
    --minimum-mapping-quality 30 \
    --emit-ref-confidence "GVCF" \
    --output gvcf/SRR1262731_extract_GATK.g.vcf \
    --intervals ~/tp_variant/additionnal_data/QTL_BT6.bed

$ ls -ltrh gvcf/
$ less -S gvcf/SRR1262731_extract_GATK.g.vcf
```



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



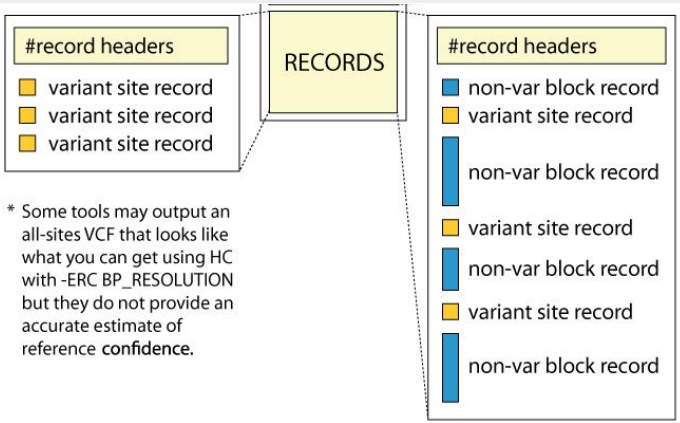
Sorties VCF *vs.* gVCF (option -ERC)

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

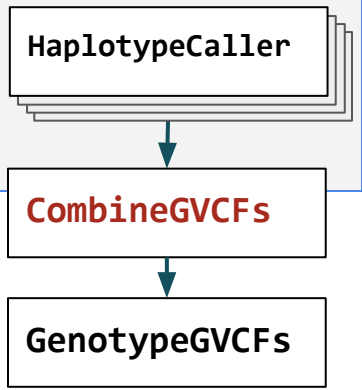
#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	SRR1262731
6	37913111	.	G	<NON_REF>	.	.	END=37913131	GT:DP:GQ:MIN_DP:PL	0/0:3:9:3:0,9,114
6	37913132	.	A	<NON_REF>	.	.	END=37913133	GT:DP:GQ:MIN_DP:PL	0/0:4:12:4:0,12,170
...									
6	37913394	.	T	<NON_REF>	.	.	END=37913395	GT:DP:GQ:MIN_DP:PL	0/0:5:12:5:0,12,180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



1/GATK HaplotypeCaller en mode GVCF

Multi-sample variant calling

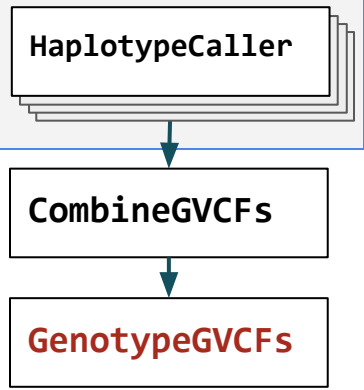
```
# 2.Fusion des fichiers gVCFs en un seul gVCF
$ gatk CombineGVCFs --java-options '-Xmx8G' \
    --variant gvcf/SRR1262731_extract_GATK.g.vcf \
    --variant  ~/tp_variant/additionnal_data/SRR1205992_extract_GATK.g.vcf \
    --variant  ~/tp_variant/additionnal_data/SRR1205973_extract_GATK.g.vcf \
    --reference ~/tp_variant/genome/Bos_taurus.UMD3.1.dna.toplevel.6.fa \
    --intervals ~/tp_variant/additionnal_data/QTL_BT6.bed \
    --output gvcf/pool_GATK.g.vcf
```



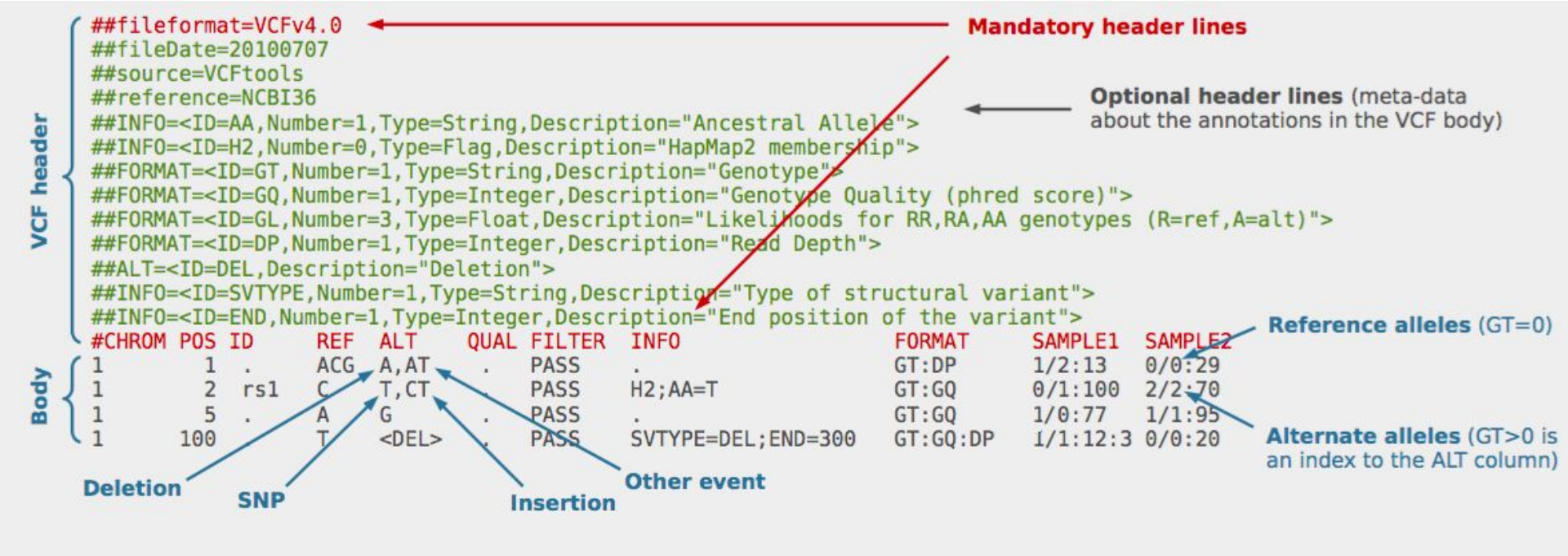
1/GATK HaplotypeCaller en mode GVCF

Multi-sample variant calling

```
# 3.Détection de variants simultanée sur les 3 échantillons du gVCF
$ gatk GenotypeGVCFs --java-options '-Xmx8G' \
     --variant  gvcf/pool_GATK.g.vcf \
     --reference ~/tp_variant/genome/Bos_taurus.UMD3.1.dna.toplevel.6.fa \
     --output vcf/pool_GATK.vcf

$ less -S vcf/pool_GATK.vcf
```

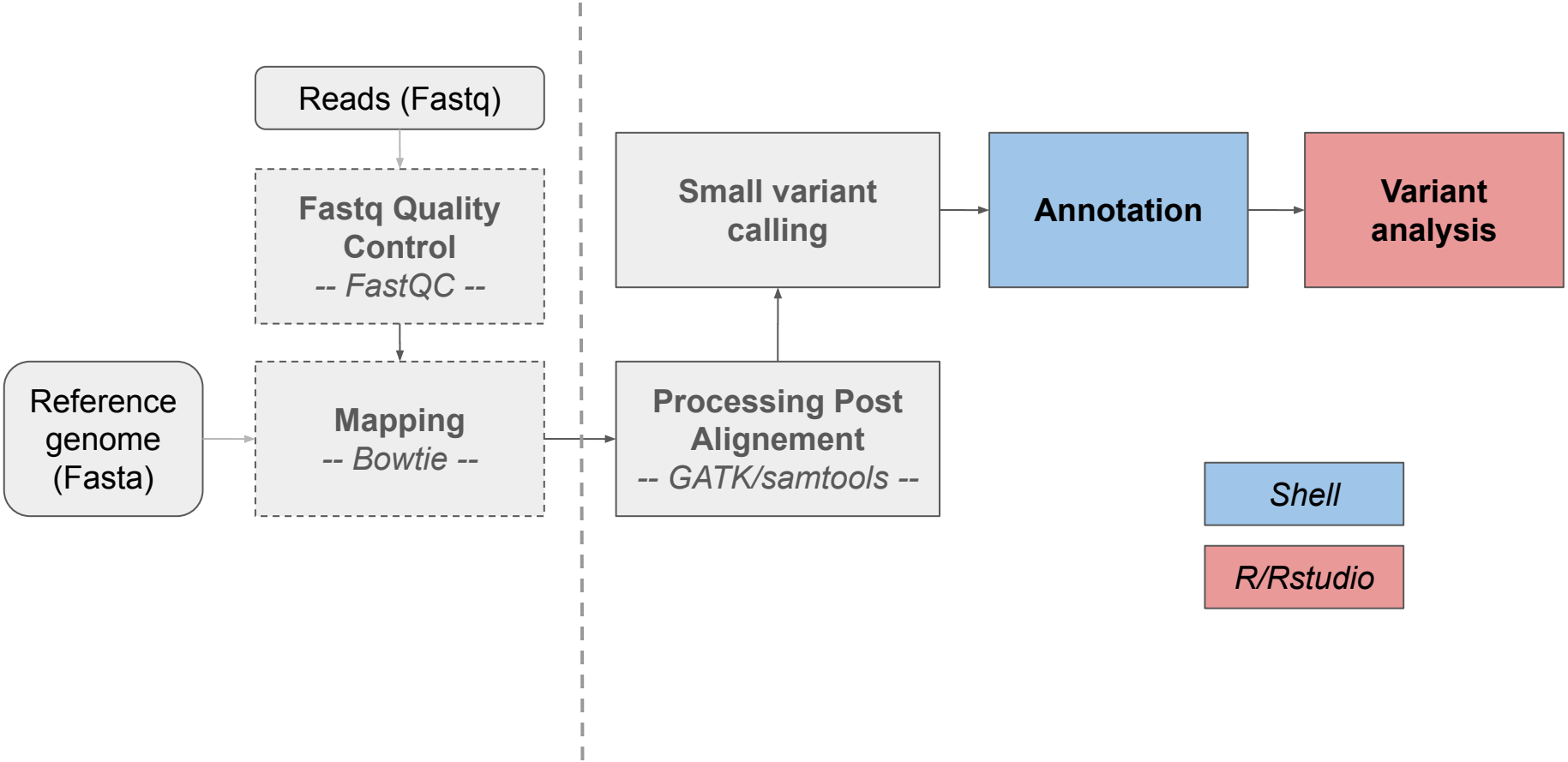


VCF Multi-échantillons



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

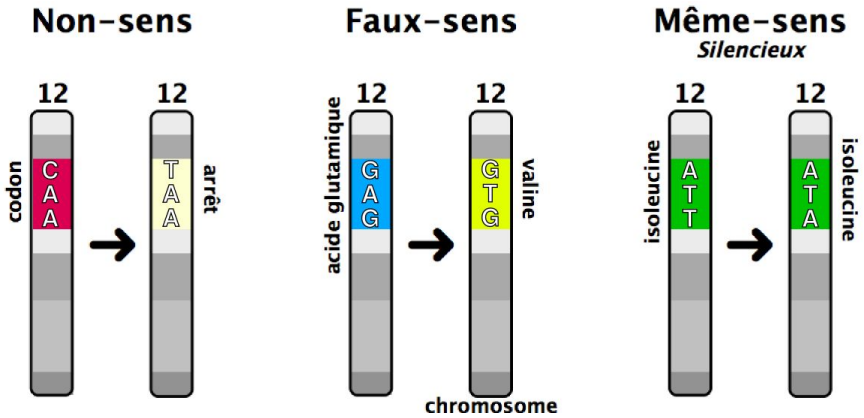
Annotation des variants

- 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 ?

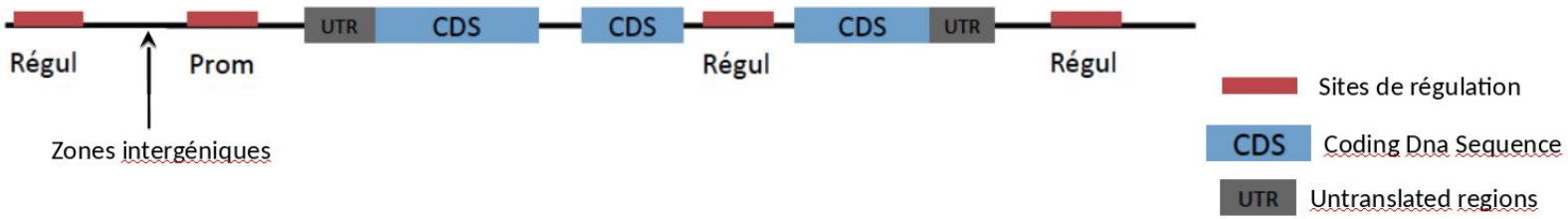


Annotation des variants

- 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,

SnpEff

Création de la base de données SnpEff

```
# Création de la base de données SnpEff
$ module load snpeff/4.3.1t
$ echo BosTaurus.genome > snpeff.config # <genome_name>.genome

$ mkdir -p BosTaurus
$
$ cp ~/tp_variant/genome/Bos_taurus.UMD3.1.dna.toplevel.6.fa BosTaurus/sequences.fa
$ cp ~/tp_variant/genome/Bos_taurus.UMD3.1.93.chromosome.6.gff3 BosTaurus/genes.gff
$
$ echo -e "BosTaurus\nSnpEff4.3t" > BosTaurus.db
$
$ snpEff build -c snpeff.config -gff3 -v BosTaurus -dataDir .
```

SnpEff
Annotation des variants

```
# Annotation avec notre base de données
$ snpEff eff -c snpeff.config -dataDir . BosTaurus -s snpeff_res.html \
~/tp_variant/GATK/vcf/pool_GATK.vcf > GATK.annot.vcf


$ less -S GATK.annot.vcf
```

http://pcingola.github.io/SnpEff/snpeff/inputoutput/#eff-field-vcf-output-files