



Workflow & Conclusion

Pierre Pericard, Rachel Legendre, Emilie Drouineau, Thibault Dayris, Claire Toffano-Nioche

Reprise du workflow : définition

Workflow = enchaînement d'étapes individuelles

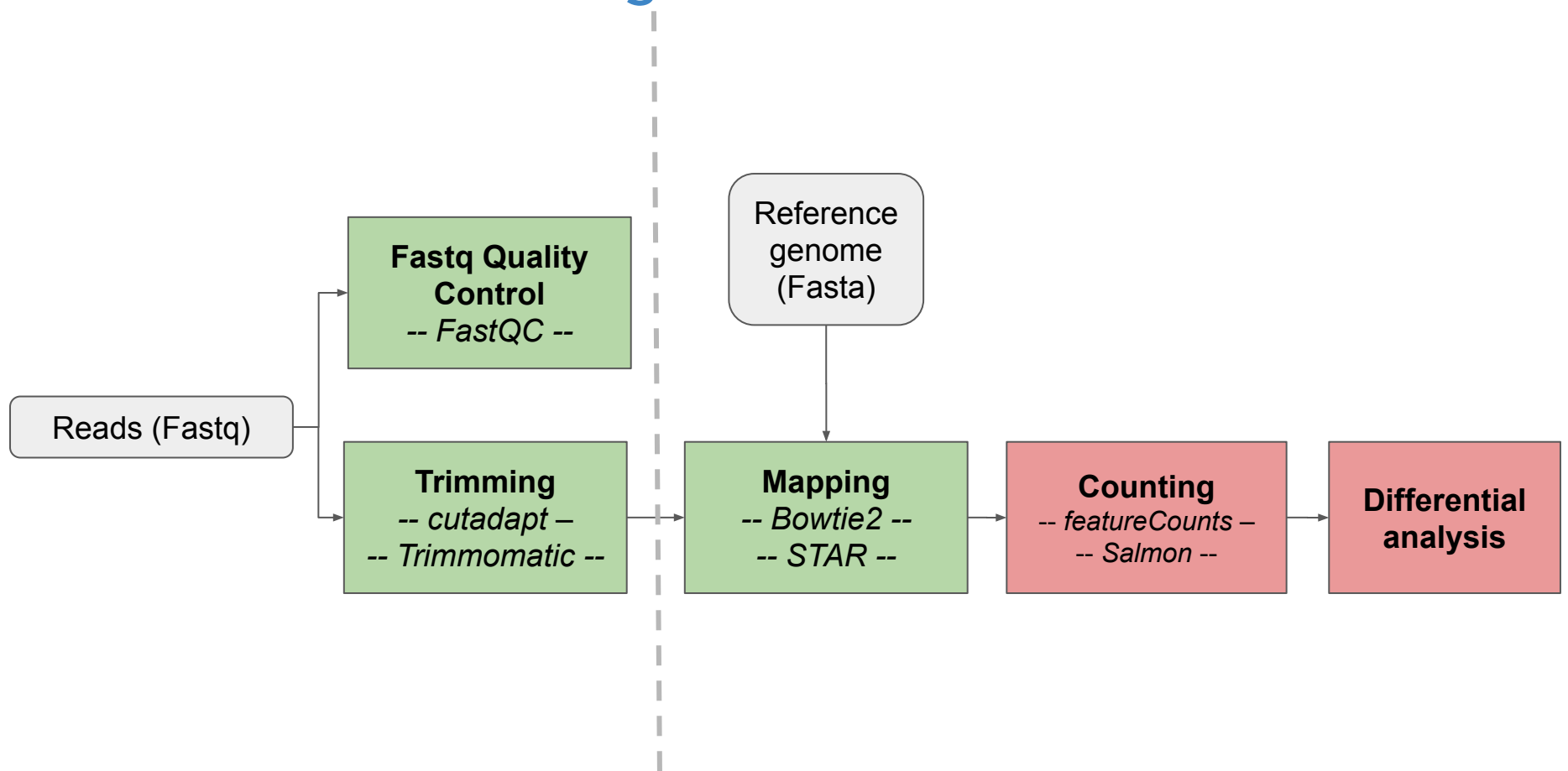
- Écriture sous forme de **scripts** en bash
 - Commence par un “**she-bang**” (**#!**) qui indique l'interpréteur du script (**#!/bin/bash**)
 - Les lignes commençant par un “**#**” sont des commentaires et ne sont pas interprétées
 - Créer des **variables** pour généraliser votre script (pas spécifique à un échantillon)

Reprise du workflow : définition

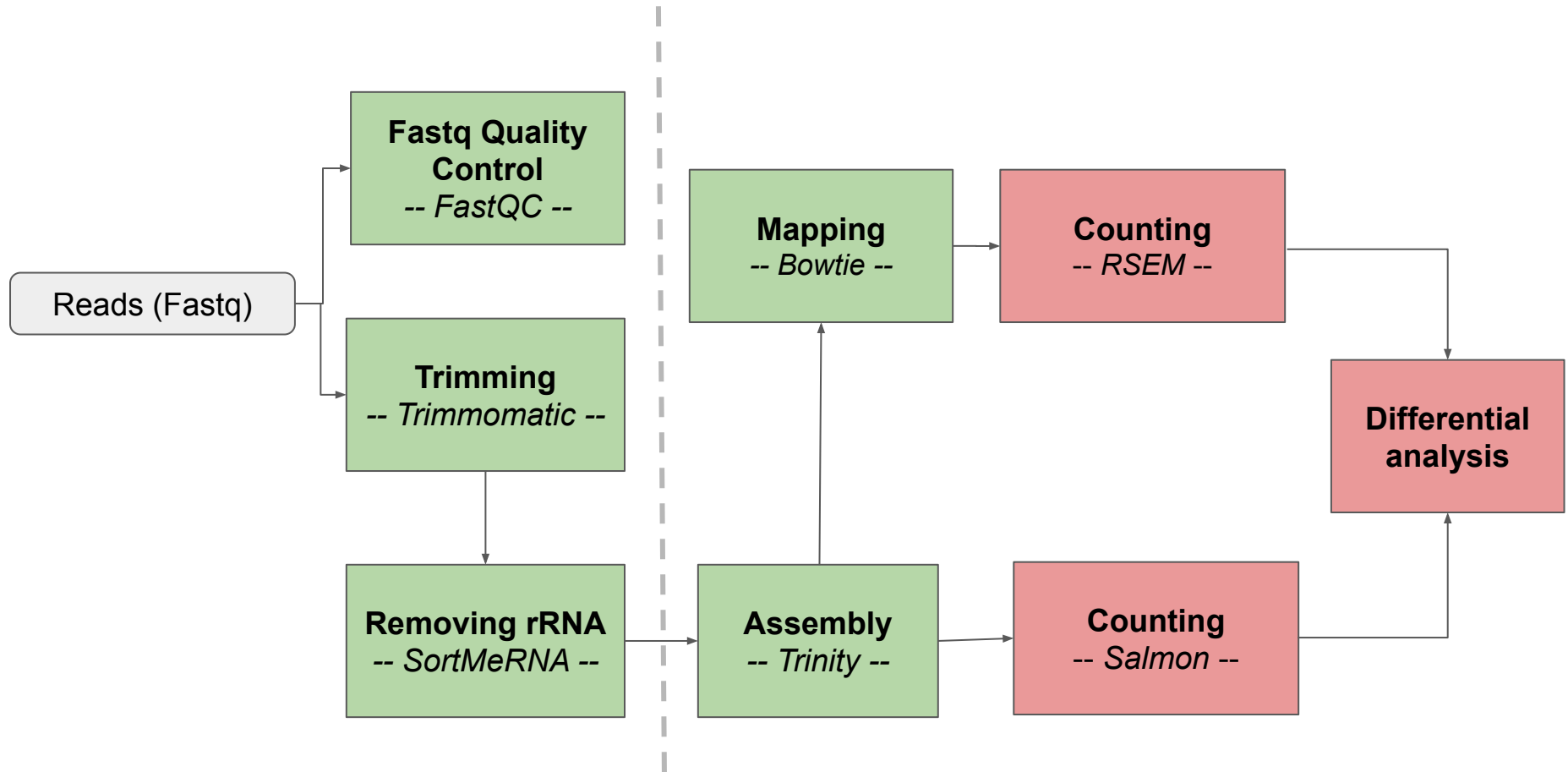
Workflow = enchaînement d'étapes individuelles

- Écriture sous forme de **scripts** en bash
 - Commence par un “**she-bang**” (**#!**) qui indique l'interpréteur du script (**#!/bin/bash**)
 - Les lignes commençant par un “**#**” sont des commentaires et ne sont pas interprétées
 - Créer des **variables** pour généraliser votre script (pas spécifique à un échantillon)
- Utilisation d'un gestionnaire de workflow (Galaxy, Nextflow, Snakemake, CWL, ...)

Workflow - avec un génome de référence



Workflow - sans génome de référence



Exercice

Objectif : lancer le même outil (FastQC) sur 6 échantillons différents



2325_ebail_0

2 CPUs, 2 Go RAM

Exercice

Objectif : lancer le même outil (FastQC) sur 6 échantillons différents

Nécessite :

- Écriture d'un script bash
- Déclaration de variables pour généraliser les échantillons et les répertoires de travail
- Réalisation d'une boucle pour lancer l'outil sur chaque échantillon

```
$ ls /shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data
```

```
$ cd <path/to/your/project>
```

```
$ mkdir -p TP_rnaseq/workflow
```

```
$ cd TP_rnaseq/workflow
```

```
$ cp /shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/TP/fastqc.sh .
```

Script1: écriture des lignes de commandes

```
#!/bin/bash
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
fastqc --outdir fastqc_res  
/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/K01_R1.fastq.gz
```

```
fastqc --outdir fastqc_res  
/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/K01_R2.fastq.gz
```


Lancement du script

Sauvegarder votre script et lancez le dans le terminal

```
$ bash fastqc.sh
```

Utilisation de variable

“Les variables sont des éléments qui associent un nom (l'identifiant) à une valeur, qui sera implantée dans la mémoire du système programmé. Une variable contient une valeur qui peut varier au cours de l'exécution du programme.”

```
$ echo $HOME  
/shared/home/ppericard  
  
$ PROJECT=/shared/projects/<your_project>/  
  
$ echo $PROJECT  
/shared/projects/project_ppericard/
```

Utilisation de variable

Une variable permet d'anonymiser un script.

```
$ PRENOM="Pierre"
```

'PRENOM' est le nom de la variable, "Pierre" est sa valeur

On peut ensuite utiliser une variable dans une ligne de commande

```
# la commande echo, affiche les arguments qui lui sont donnés  
$ echo ${PRENOM}
```

Créez :

- la variable **DATA_DIR** qui prendra comme valeur le chemin du dossier qui contient les fichiers fastq
- 2 variables, R1 et R2, qui correspondront aux noms des 2 fichiers fastq **R1** et **R2**.

Script2: anonymisation avec des variables

```
#!/bin/bash
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
fastqc --outdir fastqc_res  
/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/K01_R1.fastq.gz
```

```
fastqc --outdir fastqc_res  
/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/K01_R2.fastq.gz
```

Script2: anonymisation avec des variables

```
#!/bin/bash
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
R1="${DATA_DIR}/K01_R1.fastq.gz"
```

```
R2="${DATA_DIR}/K01_R2.fastq.gz"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
fastqc --outdir fastqc_res ${R1}
```

```
fastqc --outdir fastqc_res ${R2}
```

Lancement du script

On lance à nouveau le script dans le terminal

```
$ bash fastqc.sh
```

On vérifie que ça marche et on peut arrêter avec **Ctrl + C**

Utilisation d'une boucle

Une boucle permet d'itérer sur une liste de valeurs pour une variable

```
$ for PRENOM in Pauline Sarah Mathieu Pierre Claire Elise Charlotte Erwan  
do  
    echo ${PRENOM}  
    echo "=====  
done
```

A partir de la liste des fichiers R1 et R2 du dossier DATA_DIR, créez 2 boucles (une pour les fichiers R1 et une pour les fichiers R2) pour lancer la ligne de commande fastqc sur tous les fichiers du dossier fastq.

Script3: automatiser sur plusieurs valeurs

```
#!/bin/bash
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
R1="${DATA_DIR}/K01_R1.fastq.gz"
```

```
R2="${DATA_DIR}/K01_R2.fastq.gz"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
fastqc --outdir fastqc_res ${R1}
```

```
fastqc --outdir fastqc_res ${R2}
```


Script3: automatisation sur plusieurs valeurs

```
#!/bin/bash
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
for R1 in $DATA_DIR/*_R1.fastq.gz  
do  
    fastqc --outdir fastqc_res ${R1}  
done
```

```
for R2 in $DATA_DIR/*_R2.fastq.gz  
do  
    fastqc --outdir fastqc_res ${R2}  
done
```

Script3: automatiser sur plusieurs valeurs

```
#!/bin/bash
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebaii/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
for FQFILE in $DATA_DIR/*.fastq.gz # On simplifie encore  
do  
    fastqc --outdir fastqc_res ${FQFILE}  
done
```

Lancement du script

On lance à nouveau le script dans le terminal

```
$ bash fastqc.sh
```

Lancement du script

On lance à nouveau le script dans le terminal

```
$ bash fastqc.sh
```

C'est long non ???

Ajout des options pour SLURM

On commence à décrire un peu plus précisément les ressources nécessaires à votre étape

```
#!/bin/bash

#SBATCH --account=your_project
#SBATCH --job-name=your_job
#SBATCH --cpus-per-task=1 # Modifier en fonction des besoins
#SBATCH --mem=2GB          # Idem

module load ...

...
```

Pleins d'autres options utiles:

voir intro SLURM et <https://ifb-elixirfr.gitlab.io/cluster/doc/quick-start/>

Script4: ajout des options SLURM

```
#!/bin/bash
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
for FQFILE in $DATA_DIR/*.fastq.gz  
do  
    fastqc --outdir fastqc_res ${FQFILE}  
done
```

Script4: ajout des options SLURM

```
#!/bin/bash
```

```
#SBATCH --account=2325_ebair
```

```
#SBATCH --job-name=fastqc
```

```
#SBATCH --cpus-per-task=1
```

```
#SBATCH --mem=2GB
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
for FQFILE in $DATA_DIR/*.fastq.gz
```

```
do
```

```
  fastqc --outdir fastqc_res ${FQFILE}
```

```
done
```

Script4: ajout des options SLURM

```
#!/bin/bash
```

```
#SBATCH --account=2325_ebair
```

```
#SBATCH --job-name=fastqc
```

```
#SBATCH --cpus-per-task=1
```

```
#SBATCH --mem=2GB
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
for FQFILE in $DATA_DIR/*.fastq.gz
```

```
do
```

```
  srun fastqc --outdir fastqc_res ${FQFILE} # Optionnel mais facilite le suivi
```

```
done
```


Lancement du script

Cette fois ci, on lance le script avec la commande **sbatch**

```
$ sbatch fastqc.sh
```

Et on vérifie si ça se passe bien avec la commande **squeue**

```
$ squeue  
...  
$ squeue -u $USER  
$ sacct -u $USER
```

Lancement du script

Cette fois ci, on lance le script avec la commande **sbatch**

```
$ sbatch fastqc.sh
```

Et on vérifie si ça se passe bien avec la commande **squeue**

```
$ squeue  
...  
$ squeue -u $USER  
$ sacct -u $USER
```

C'est toujours aussi long...

On va vraiment prendre un café à chaque fois qu'on lance un FastQC ??? 

Parallélisation des tâches

Au lieu de lancer chaque job l'un après l'autre, de manière séquentielle, on va les lancer en parallèle

```
#!/bin/bash

#SBATCH --account=your_project
#SBATCH --job-name=your_job
#SBATCH --cpus-per-task=1
#SBATCH --mem=2GB
#SBATCH --array=1-4 # Modifier en fonction du nb de tâches à lancer en parallèle

module load ...

# Je sélectionne le Nième fichier de ma liste
INPUT=$(ls *.txt | awk "NR==${SLURM_ARRAY_TASK_ID}")

srun super_logiciel --input $INPUT
```

Script5: parallélisation des tâches

```
#!/bin/bash
```

```
#SBATCH --account=2325_ebair
```

```
#SBATCH --job-name=fastqc
```

```
#SBATCH --cpus-per-task=1
```

```
#SBATCH --mem=2GB
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
for FQFILE in $DATA_DIR/*.fastq.gz
```

```
do
```

```
  srun fastqc --outdir fastqc_res ${FQFILE}
```

```
done
```

Script5: parallélisation des tâches

```
#!/bin/bash
```

```
#SBATCH --account=2325_ebair
```

```
#SBATCH --job-name=fastqc
```

```
#SBATCH --cpus-per-task=1
```

```
#SBATCH --mem=2GB
```

```
#SBATCH --array=1-12
```

```
mkdir -p fastqc_res
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"
```

```
module load fastqc/0.11.9
```

```
FQFILE=$(ls $DATA_DIR/*.fastq.gz | awk "NR==${SLURM_ARRAY_TASK_ID}")
```

```
srun fastqc --outdir fastqc_res ${FQFILE}
```

Lancement du script SLURM

On lance le script avec la commande **sbatch**

```
$ sbatch fastqc.sh
```

Et on vérifie si ça se passe bien avec les commandes **squeue** ou **sacct**

```
$ squeue -u $USER
```

```
$ sacct -u $USER
```

Maintenant ça va super vite !

Vous êtes prêt.e.s à spammer le cluster de l'IFB ;-))

Bonus

Mise en pratique: Alignement avec STAR

On vous propose maintenant de mettre en pratique ce que vous venez de voir et d'écrire un script SLURM pour aligner tous les échantillons sur le génome de référence avec STAR

```
$ module load star/2.7.9a  
$ STAR --help
```

<https://github.com/alexdobin/STAR/blob/master/doc/STARmanual.pdf>

Index STAR: `/shared/bank/arabidopsis_thaliana/TAIR10.1/star-2.7.9a/`

Annotation (GTF):

`/shared/bank/arabidopsis_thaliana/TAIR10.1/gtf/GCF_000001735.4_TAIR10.1_genomic.gtf`

Mise en pratique: Alignement avec STAR

Petite commande bash utile: la substitution dans les variables

https://wiki.bash-hackers.org/syntax/pe#search_and_replace

```
$ FILE_A="/tp_workflow/toto_a.txt"
```

```
$ echo ${FILE_A}
~/tp_workflow/toto_a.txt
```

```
$ FILE_B=${FILE_A/_a/_b}
```

```
$ echo ${FILE_B}
~/tp_workflow/toto_b.txt
```

Script6: Alignement avec STAR

On ne triche pas, la solution est 3 slides plus loin ;-)

Lancement du script

On voudra lancer le script avec la commande **sbatch**

```
$ sbatch star_align.sh
```

Attention: l'alignement avec STAR est gourmand en ressource.
Il faudra peut-être envisager de donner plus de CPUs et de RAM à votre outil...

Et on n'oublie pas de vérifier si ça se passe toujours bien

```
$ squeue -u $USER  
$ sacct -u $USER
```

Script6: Alignement avec STAR

Ok, c'est bon. La solution est juste après

Script6: Alignement avec STAR

```
#!/bin/bash
```

```
#SBATCH --account=2325_ebair  
#SBATCH --job-name=star_align  
#SBATCH --cpus-per-task=8  
#SBATCH --mem=20GB  
#SBATCH --array=1-6
```

```
OUT_DIR="/path/to/my/project/TP_rnaseq/workflow/star_res"  
mkdir -p $OUT_DIR
```

```
DATA_DIR="/shared/projects/2325_ebair/atelier_rnaseq/04-Workflow/data/"  
STAR_INDEX="/shared/bank/arabidopsis_thaliana/TAIR10.1/star-2.7.9a/"  
GTF="/shared/bank/arabidopsis_thaliana/TAIR10.1/gtf/GCF_000001735.4_TAIR10.1_genomic.gtf"
```

```
module load star/2.7.9a
```

```
R1IN=$(ls $DATA_DIR/*_R1.fastq.gz | awk "NR==${SLURM_ARRAY_TASK_ID}")  
R2IN=${R1IN/_R1/_R2}  
BASENAME=${R1IN/_R1.fastq.gz/.STAR_TAIR10.1_}
```

```
srunch STAR --runThreadN ${SLURM_CPUS_PER_TASK} --genomeDir ${STAR_INDEX} --sjdbGTFfile ${GTF} --readFilesCommand zcat  
--readFilesIn ${R1IN} ${R2IN} --outFileNamePrefix ${OUT_DIR}/${BASENAME} --outSAMtype BAM SortedByCoordinate  
--outSAMunmapped Within KeepPairs
```