Voyage initiatique vers la bioinformatique

Alban Mancheron

VOYAGE INITIATIQUE VERS LA BIOINFORMATIQUE : EN ROUTE POUR L'AVENTURE

ALBAN MANCHERON
[Enseignant-chercheur en bioinformatique à l'Université de Montpellier, linuxien depuis 1997 (convaincu depuis 1998)]

MOTS-CLÉS : EMBOSS, BIOINFORMATIQUE, ANALYSE, GÉNOMIQUE COMPARATIVE, SHELL, SARS-COV-2

Dans un précédent article [1], nous avions découvert la suite EMBOSS et mis en évidence des régions d'intérêt de la séquence nucléique de référence du virus SARS-CoV-2. Nous allons donc continuer le chemin en exploitant de nouveaux outils, certains issus de la bioinformatique et d'autres issus de la communauté linuxienne.

Où en étions-nous ? Ah oui, je me souviens...

Nous avions récupéré quelques séquences de **SARS-CoV-2**, dont la séquence de référence du virus (`NC_045512.2`). Nous avions également installé et pris en main la suite **EMBOSS [2,3]**, ce qui nous avait permis de commencer l'analyse des séquences récupérées. Nous avions notamment mis en évidence des régions de la séquence de référence, appelées **ORF** (*Open Reading Frames* – cadres ouverts de lecture), qui correspondent à de potentielles protéines que le virus ferait produire par l'organisme hôte (celui qu'il squatte sans vergogne) et qui lui permettent de se reproduire. Ah oui, j'avais oublié. La biologie est ici présentée sous un angle assez imagé et peut parfois piquer les yeux des puristes (donc, si vous avez dans votre entourage des biologistes, n'essayez pas de frimer en reprenant mes propos, cela pourrait tourner à votre désavantage). Par

exemple, vous pouvez tout à fait vous représenter un virus comme une bombe *fork*. Son seul objectif est de se reproduire et ça finit par faire planter le système, si celui-ci ne parvient pas à le détecter et à l'éradiquer (en l'occurrence, dans le cas du *SARS-CoV-2*, c'est plutôt le système qui « exabuse » – du verbe *exabuser* – la contre-attaque).

Vous aviez tout bien fait la dernière fois, mais vous ne savez plus où sont les résultats que vous aviez obtenus ! Ne vous inquiétez pas, nul besoin de tout refaire (cf. note).

NOTE

Les données récupérées, les résultats obtenus et les scripts développés dans le cadre de cette série d'articles sont disponibles sur la forge logicielle **GitLab** hébergée par **Framasoft** : https://framagit.org/doccy/SARS-CoV-2-bioinfo-analysis.

1. RÉGIONS D'INTÉRÊT DE LA SÉQUENCE DE RÉFÉRENCE

Nous avions récupéré les ORF valides dans le fichier `results/nc_045512.2_ORF.fasta` partiellement reproduit ci-après :

```
>NC_045512.2_1 [468 - 530] Severe acute
respiratory syndrome coronavirus 2
isolate Wuhan-Hu-1, complete genome
MCSSNVRMLELHLMVMLWLSW

...

>NC_045512.2_192 [29866 - 29901] Severe
acute respiratory syndrome coronavirus
2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome
MTKKKKKKKKKK
```

Pour chaque ORF, nous disposons d'un nom de séquence qui est le nom d'origine de la séquence suffixé d'un identifiant (compteur commençant à 1) ; de ses positions dans la séquence (information entre crochets) ; du descriptif associé à la séquence d'origine et de la séquence d'acides aminés correspondant à sa traduction. Nous avions également mentionné que le dernier ORF contenant un codon *start* (une Méthionine), le programme `getorf` avait renvoyé la traduction de la fin de la séquence à partir de la position 29 866 ; cependant, cet ORF n'est pas valide en réalité, c'est juste qu'il va jusqu'à la fin de la séquence.

Avant toute chose, commençons par récupérer les coordonnées des régions codantes potentielles. Pour cela, il suffit de récupérer les lignes du fichier qui commencent par `>` (avec `grep`), puis à capturer l'identifiant, la position de début et la position de fin de l'ORF (avec `sed`), tout conserver sauf la dernière (avec `head`) et enfin rediriger dans le fichier, tout en l'affichant sur la sortie standard (avec `tee`) :

```
$ grep "^>" results/nc_045512.2_ORF.
fasta | sed 's,.*_\(.*\) \[\(.*\) - \
(.*\)\].*,\1\t\2\t\3,' | head -n -1 | tee
results/nc_045512.2_ORF.csv
1468530
2594683

...

19029771 29803
19129806 29841
```

À partir de maintenant, les choses sérieuses peuvent commencer.

1.1 Visualisation des ORF

La bioinformatique admet de très nombreuses définitions (et je n'entrerai pas dans le débat, même si j'ai un avis assez tranché sur la question), cependant il faut comprendre que l'usager des outils développés reste pour une grande majorité un biologiste. Donc, son expertise passera à un moment ou à un autre par une représentation graphique.

Notre objectif est d'annoter des portions de séquences, mais également de permettre de visualiser le produit de nos annotations. Il existe plusieurs formats pour représenter les annotations, parmi eux le format **GFF** (voir encadré) qui, outre son format assez facile à exploiter sous **GNU/Linux**, établit un lien direct entre l'annotation et la *Sequence Ontology* **[4]** donnant ainsi à la fois un formalisme rigoureux et une véritable sémantique aux annotations.

Nous allons donc écrire un script **awk** permettant de transformer notre fichier **CSV** en GFF. Pour cela, nous allons représenter les ORF sous forme de tableaux à trois clés (`id`, `deb` et `fin`). Outre une fonction permettant de renvoyer la taille d'un ORF (lignes 17 à 19), comme je ne sais pas définir une fonction qui renvoie un tableau en `awk` (je ne suis pas certain que cela soit possible, par ailleurs), je contourne la difficulté en passant par un procédé de sérialisation/dé-sérialisation (lignes 24 à 26 et 33 à 37) :

```
01: #!/usr/bin/awk --exec
02:
03: # Assigne simplement le nom du programme
à la variable PROGRAM_NAME.
04: function setProgramName() {
05:   PROGRAM_NAME =
gensub(/^(.*\/)?([^\/]+)\.[^\.]+$/, "\\2",
"g", ENVIRON["_"])
06:   if (!PROGRAM_NAME) {
07:     PROGRAM_NAME =
gensub(/^(.*\/)?([^\/]+)$/, "\\2", "g",
ENVIRON["_"])
08:   }
09:   PROGRAM_NAME = gensub(/^(.*\/)?([^\/]+)
(\.awk)$/, "\\2", "g", ENVIRON["_"])
10:   if (!PROGRAM_NAME) {
11:     PROGRAM_NAME = "filtre_ORF"
12:   }
13: }
14:
15: # Calcule la taille d'un ORF (tableau
dont les clés "deb" et "fin"
16: # définissent les positions de début et
de fin de l'ORF).
17: function taille(orf) {
18:   return orf["fin"] - orf["deb"] + 1
19: }
20:
21: # Renvoie une chaîne descriptive de l'ORF
(tableau dont les clés "id",
22: # "deb" et "fin" définissent
respectivement l'identifiant ainsi que
23: # les positions de début et de fin d
l'ORF).
24: function orf2string(orf) {
25:   return orf["id"] "\t" orf["deb"] "\t"
orf["fin"]
26: }
27:
28: # Remplit le paramètre orf (deuxième
argument) à partir de la chaîne
29: # str (premier argument) descriptive de
l'ORF. Le tableau résultant
30: # disposera des clés "id", "deb" et "fin"
définissant respectivement
31: # l'identifiant ainsi que les positions
de début et de fin de l'ORF.
32: function string2orf(str, orf,    tmp) {
33:   split(str, tmp)
34:   orf["id"] = tmp[1]
35:   orf["deb"] = tmp[2]
36:   orf["fin"] = tmp[3]
37: }
```

Au début du programme, il ne se passe pas grand-chose (lignes 41 à 43), mais à chaque début de fichier passé en ligne de commande (lignes 47 à 57), nous remettons le compteur d'ORF à **0** (variable **nb**), nous initialisons la variable **name** au nom du fichier sans l'extension (ce sera notamment le champ **1** du GFF produit) et nous réinitialisons la position maximale de la séquence pour le fichier en cours à **1** (variable **max_pos**).

```
40: # Initialisation effectuée au
démarrage du script
41: BEGIN {
42:   setProgramName()
43: }
44:
45: # Initialisation effectuée à
l'ouverture de chaque fichier passé en
46: # paramètre
47: BEGINFILE {
48:   nb = 0
49:   name = gensub(/^.*\/([^\/]*)_
ORF\.[^\.]*$/, "\\1", "g", FILENAME)
50:   if (!name) {
51:     name = gensub(/^.*\/([^\/]*)\.
[^\.]*$/, "\\1", "g", FILENAME)
52:   }
53:   if (!name) {
54:     name = FILENAME
55:   }
56:   max_pos = 1
57: }
```

Pour chaque ligne du fichier en cours de lecture (lignes 60 à 68), il suffit d'associer à l'ORF en cours les valeurs de chaque champ à chaque clé (notons que nous ajoutons **3** à la borne de fin, car les positions renvoyées par **getorf** n'incluent pas le codon *stop*). Nous en profitons pour mettre à jour la valeur de la plus grande position.

```
59: # Traitement à effectuer pour une
ligne du fichier en cours.
60: {
61:   ORF[nb]["id"] = $1
62:   ORF[nb]["deb"] = $2
63:   ORF[nb]["fin"] = $3 + 3
64:   ++nb
65:   if ($3 > max_pos) {
66:     max_pos = $3
67:   }
68: }
```

Arrivés à la fin de la lecture du fichier en cours (lignes 71 à 78), nous affichons les métadonnées associées au fichier GFF (la position maximale est une estimation), puis pour chaque ORF, nous produisons une annotation de type ORF (champ **3**). Nous utilisons la taille de l'ORF en guise de score (champ **6**). Nous en profitons pour calculer la phase de lecture (champ **8** de l'annotation).

LE FORMAT GFF

Le « *Generic Feature Format* » permet d'annoter tout ou parties des séquences biologiques. Il s'agit simplement d'un fichier tabulé où chaque ligne représente une annotation. Il y a neuf champs (séparés donc par des tabulations) pour chaque annotation.

Champ	Nom	Description
1	séquence	Nom (identifiant) de la séquence porteuse de l'annotation.
2	source	Identifiant de la source de l'annotation (nom du programme, de la base de données, du consortium...).
3	type	Type de l'élément annoté qui doit correspondre à un des termes de la *Sequence Ontology* **[4]**.
4	début	Position de début de l'annotation sur la séquence (la numérotation commence à 1).
5	fin	Position (incluse) de fin de l'annotation sur la séquence (la numérotation commence à 1).
6	score	Fiabilité de l'annotation (lorsque celle-ci est prédite par un outil, elle est souvent assortie d'une métrique représentative de la fiabilité de la prédiction). L'absence de score est dénotée par un `.`.
7	brin	Indication du brin codant de l'élément (voir **[1]**). Ce champ admet trois valeurs possibles : `+` pour le sens de lecture « normal », `-` pour le sens de lecture inverse et `.` lorsque l'information est indéterminée.
8	phase	Phase du cadre de lecture applicable aux annotations de type **CDS** (voir **[1]**). Celle-ci peut prendre 4 valeurs : `0`, `1` ou `2` si le type de l'annotation est `CDS` et `.` dans les autres cas.
9	attributs	Autres informations relatives à l'annotation.

Le dernier champ est donc celui qui permet d'écrire un peu ce que l'on veut. Il est généralement composé d'une suite de couples `clé=valeur` séparés par des `;`. Il est recommandé d'utiliser le mécanisme d'encodage de la RFC 3986 relative à la syntaxe des URI (*Uniform Resource Identifier*) [5] pour les caractères devant être échappés (tabulation, nouvelle ligne, retour chariot, `#`, `%`, `;`, `=`, `&`, `,`, etc.). C'est-à-dire d'utiliser le symbole `%` suivi du codage hexadécimal à deux symboles correspondant au code ASCII du caractère échappé (p. ex., le `%` est représenté par `%25` et le `;` par `%3B`). Il est suggéré d'utiliser l'encodage UTF-8 pour le reste (cette préconisation est une hérésie pour l'informaticien que je suis, mais pleine de bon sens pour le bioinformaticien que je suis également).

Le format GFF autorise également l'utilisation du `#` en début de ligne pour marquer le début d'un commentaire allant jusqu'à la fin de la ligne.

Enfin, il est possible de fournir des métadonnées. Ces métadonnées sont des lignes qui commencent par `##`. La plus importante est celle permettant d'indiquer la version de la spécification de GFF utilisée dans le fichier (p. ex., `##gff-version 3.1`). Cette information doit figurer en première ligne du fichier. Les autres métadonnées disponibles dépendent de la version utilisée. On retrouve parfois des métadonnées officieuses utilisées par certains outils. Ces métadonnées commencent par `#!` et sont donc ainsi assimilables à des commentaires.

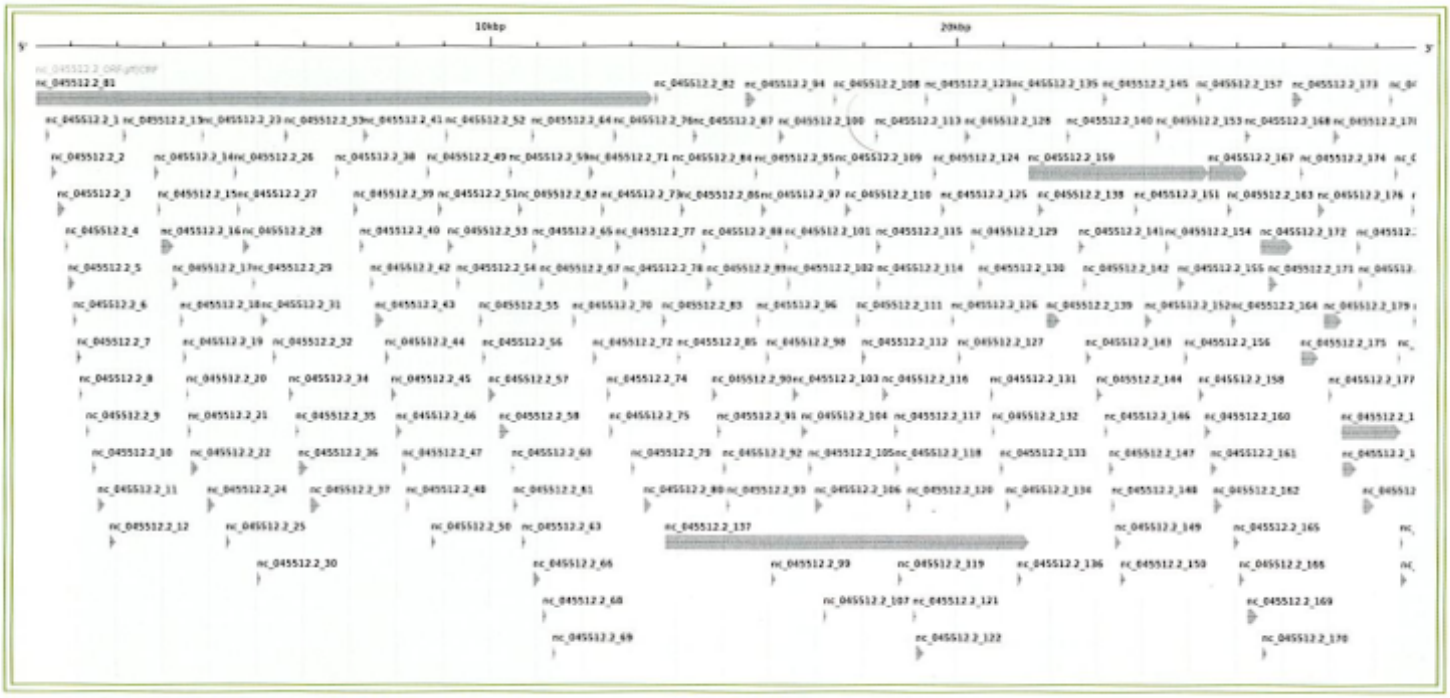

Fig. 1 : Visualisation des ORF valides de la séquence NC_045512.2.

```
70: # Traitement à effectuer à la fin du fichier en cours.
71: ENDFILE {
72:   print "##gff-version 3"
73:   print "##sequence-region " name " 1 " max_pos
74:   OFS = "\t"
75:   for (e in ORF) {
76:     print name, PROGRAM_NAME, "ORF", ORF[e]["deb"], ORF[e]
["fin"], ORF[e]["fin"] - ORF[e]["deb"] + 1, "+", ((ORF[e]["deb"] - 1)
% 3), "ID=" name "_" ORF[e]["id"] ";name=ORF_" ORF[e]["id"]
77:   }
78: }
```

En appliquant ce script (après l'avoir rendu exécutable) au fichier CSV, nous obtenons :

```
$ chmod 755 scripts/csv2gff_ORF.awk
$ scripts/csv2gff_ORF.awk results/nc_045512.2_ORF.csv
| tee results/nc_045512.2_ORF.gff
##gff-version 3
##sequence-region nc_045512.2 1 29841
nc_045512.2 csv2gff_ORF ORF46853366+2
ID=nc_045512.2_1;name=ORF_1
[sortie tronquée]
nc_045512.2 csv2gff_ORF ORF29806298443 9+0
ID=nc_045512.2_191;name=ORF_191
```

Comme la position de fin de la séquence est une estimation, nous allons corriger cela rapidement :

```
$ infoseq data/nc_045512.2.fasta -only -length -auto
-stdoutLength
29903
```

```
$ sed -i 's,##sequence-
region nc_045512.2 1
.*,##sequence-region
nc_045512.2 1 29903,'
results/nc_045512.2_ORF.gff
$ head -n 2 results/
nc_045512.2_ORF.gff
##gff-version 3
##sequence-region
nc_045512.2 1 29903
```

Il existe un outil permettant de visualiser les fichiers GFF. Il s'agit du programme **annotation sketch** de la suite **GenomeTools [6]** qu'il est possible d'installer localement (par exemple, sous **Debian/Ubuntu**) :

```
$ sudo apt install
genometools
```

On peut l'utiliser en ligne de commande (commande `gt sketch`), mais il est également possible d'utiliser l'outil en ligne à l'adresse http://genometools.org/cgi-bin/annotationsketch_demo.cgi (ce que j'ai fait pour cet article en renseignant, pour plus de confort visuel, une largeur de 1600 pixels au lieu des 800 pixels proposés par défaut ; cf. figure 1).

Visuellement, nous nous apercevons aisément que tous les ORF ne semblent pas présenter le même intérêt. Sans entrer dans les détails de la biologie, une protéine est généralement composée en moyenne de 300 à 400 acides aminés, et très rarement moins de 100 acides aminés. Nous allons donc tenter de déterminer des critères permettant de filtrer les ORF à étudier.

1.2 Sélection des ORF candidats

Même s'il paraît que ce n'est pas la taille qui compte, intéressons-nous de plus près à la distribution des longueurs des ORF.

Pour cela, nous pouvons écrire un petit script **gnuplot** assez simpliste :

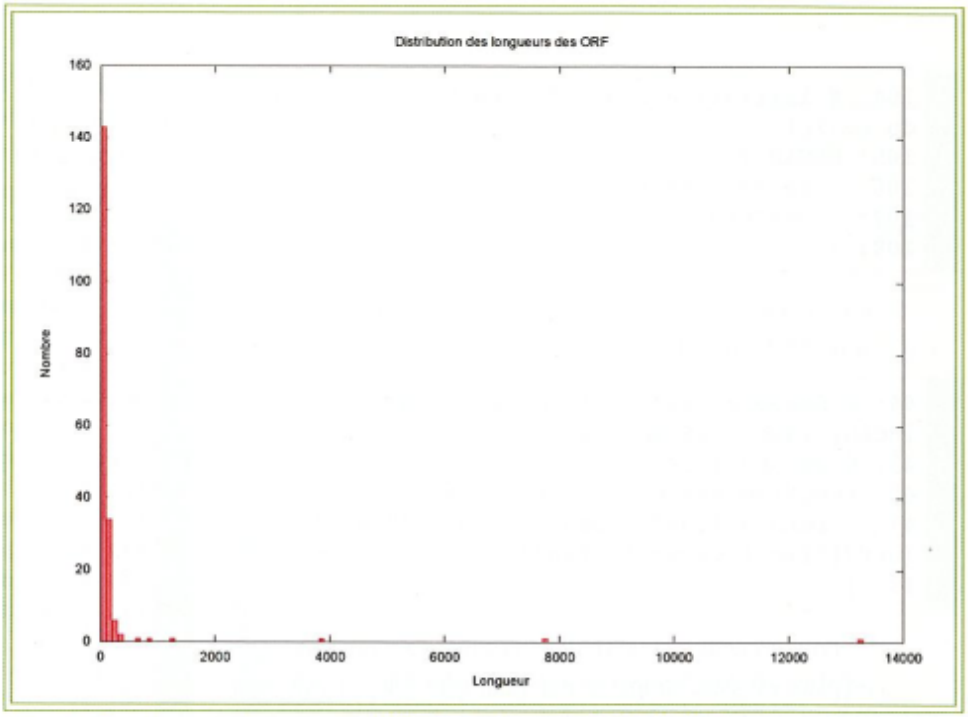

Fig. 2 : Distribution du nombre d'ORF de la séquence NC_045512.2 en fonction de leur longueur.

```
#!/usr/bin/gnuplot

reset

# See http://www.gnuplotting.org/calculating-
histograms/
binwidth = 100
binstart = 0
binval(x) = binwidth*(floor((x-binstart)/
binwidth)+0.5)+binstart

set xrange [binstart:*]
set boxwidth 0.9 * binwidth
set style fill solid 0.5
set title "Distribution des longueurs des ORF"
set xlabel "Longueur"
set ylabel "Nombre"

# Par défaut les graphiques sont affichés.
# On change le terminal pour produire des
images au format PNG.
set terminal png notransparent interlace
truecolor enhanced nocrop font "Arial,18" size
1600,1200
set output "results/nc_045512.2_ORF_
distribution.png"

plot "results/nc_045512.2_ORF.csv" using
(binval($3-$2+1)):(1.0) smooth frequency with
boxes notitle
```

Il reste à le rendre exécutable et à le lancer pour obtenir l'histogramme présenté en figure 2.

```
> chmod 755 scripts/ORF_length_histogram.gp
$ scripts/ORF_length_histogram.gp
$ eog results/nc_045512.2_ORF_distribution.png ||
xdg-open results/nc_045512.2_ORF_distribution.png
```

Cet histogramme fait clairement apparaître 5 grands (voire très grands) ORF candidats. Il est donc très raisonnable de ne pas considérer les petits ORF qui seraient inclus dans des plus grands. Un ORF de 150 nucléotides code pour 49 acides aminés plus 1 codon *stop*, ce qui est vraiment très petit et donc est un critère de filtrage très satisfaisant. Copions le script précédent dans un nouveau script appelé **filtre_ORF.awk** et ajoutons donc une variable permettant de définir le seuil en dessous duquel nous considérerons un ORF comme petit.

```
15: # Initialise les paramètres par défaut du
programme.
16: function setDefaultParameters() {
17:   SEUIL_TAILLE = 150
18: }
```

Cette fonction d'initialisation devra être appelée au démarrage du script.

```
104: # Initialisation effectuée au démarrage
du script
105: BEGIN {
106:    setProgramName()
107:    setDefaultParameters()
108: }
```

Il nous faut également une fonction permettant de tester si un ORF en inclut un autre.

```
44: # Renvoie vrai si le premier ORF (orf1)
inclut intégralement le
45: # second (orf2).
46: function estInclus(orf1, orf2) {
47:    return ((orf1["deb"] <= orf2["deb"]) &&
(orf2["fin"] <= orf1["fin"]))
48: }
```

Pour pouvoir faire le filtrage, la stratégie gloutonne mise en place est assez simple (et non optimale). Elle consiste pour chaque ORF, du plus grand au plus petit, à supprimer les ORF inclus et considérés comme petits. Il nous faut donc pouvoir trier les ORF par tailles décroissantes. Sachant que **awk** propose une fonction **asort(src, dst, cmp)** permettant de remplir le tableau **dst** à partir des données du tableau **src** dans l'ordre défini par la fonction **cmp**. La fonction **cmp** doit prendre 4 paramètres (la position du premier élément à comparer dans le tableau **src**, ce premier élément, la position du second élément à comparer dans le tableau **src** et enfin ce second élément). Cette fonction doit renvoyer **-1** si le premier élément précède le second élément, **1** dans le cas contraire et **0** si ces deux éléments sont équivalents. Ceci aboutit à la définition de la fonction de comparaison de deux ORF en fonction de leur taille :

```
50: # Compare les longueurs des deux ORF v1 et v2
(respectivement aux
51: # positions i1 et i2 d'un tableau). Si v1 est
plus petit que v2 alors
52: # la fonction renvoie 1, si v2 est plus grand
que v2 alors la
53: # fonction renvoie -1, s'ils sont de même
longueur alors la
54: # fonction renvoie 0. Cette fonction permet de
trier les ORF par
55: # tailles décroissantes.
56: function length_cmp_fct(i1, v1, i2, v2) {
57:    l1 = taille(v1)
58:    l2 = taille(v2)
59:    return ((l1 < l2) ? 1 : ((l1 > l2) ? -1 : 0))
60: }
```

Une fois que les ORF auront été filtrés, nous les réordonnerons dans l'ordre d'apparition dans la séquence. Il faut donc également définir une fonction de comparaison basée sur leurs positions dans la séquence.

```
62: # Compare les positions de départ de
deux ORF v1 et v2 (respectivement
63: # aux positions i1 et i2 d'un tableau).
Si v1 débute avant v2 alors la
64: # fonction renvoie -1, si v1 débute
après v2, alors la fonction
65: # renvoie 1, s'ils débutent à la même
position, c'est la fonction
66: # length_cmp_fct qui est appelée. Cette
fonction permet de trier les
67: # ORF par positions croissantes.
68: function pos_cmp_fct(i1, v1, i2, v2) {
69:    return ((v1["deb"] < v2["dev"]) ? -1 :
((v1["deb"] > v2["deb"]) ? 1 : length_cmp_
fct(i1, v1, i2, v2)))
70: }
```

Les tableaux renvoyés par la fonction **asort** sont indexés à partir de **1** (donc ici, nous parcourons le tableau de l'indice **1** à l'indice **nb** inclus). Nous utiliserons la fonction **delete** qui permet de supprimer un élément d'un tableau sans changer son indice. Cette fonction permet également de détruire un tableau (ainsi la ligne 77 déclare implicitement la variable **tmp1** comme étant un tableau). Ainsi, après avoir trié le tableau d'ORF **tab1** passé en entrée par tailles décroissantes (ligne 79), il suffit pour la position **i**, associée à un ORF qui a été conservé jusqu'à présent (test de la ligne 81), de chercher dans les ORF suivants (boucle de la ligne 82 à 86) ceux qui sont petits et inclus dans l'ORF à la position **i** du tableau trié (test de la ligne 83). Ces petits ORF inclus sont tout simplement supprimés (ligne 84). Dans un second temps, il convient de compacter le tableau obtenu et de mettre à jour le compteur **nb** (lignes 89 à 99). Enfin, il reste à réordonner les ORF par ordre d'apparition dans la séquence (lignes 100 et 101).

```
72: # Supprime les petits ORF inclus
dans de plus grands ORF. Les
73: # ORF à analyser sont fournis dans
le tableau tab1 et les ORF
74: # conservés sont fournis dans le
tableau tab2 qui est trié selon la
75: # fonction pos_cmp_fct.
76: function supprime_petits_ORF_
inclus(tab1, tab2) {
77:    delete tmp1
```

Fig. 3 : Visualisation des ORF valides de la séquence NC_045512.2 après filtrage.

```
78:   # Tri par longueurs décroissantes
79:   asort(tab1,tmp1,"length_cmp_fct")
80:   for (i = 1; i <= nb; ++i) {
81:     if (isarray(tmp1[i])) {
82:       for (j = i + 1; j <= nb; ++j) {
83:         if (isarray(tmp1[j]) &&
(taille(tmp1[j]) < SEUIL_TAILLE) &&
estInclus(tmp1[i], tmp1[j])) {
84:           delete tmp1[j]
85:         }
86:       }
87:     }
88:   }
89:   delete tmp2
90:   nb = 0
91:   for (e in tmp1) {
92:     if (isarray(tmp1[e])) {
93:       delete tmp2[e][0]
94:       tmp2[e]["id"] = tmp1[e]["id"]
95:       tmp2[e]["deb"] = tmp1[e]["deb"]
96:       tmp2[e]["fin"] = tmp1[e]["fin"]
97:       ++nb
98:     }
99:   }
100:   delete tab2
101:   asort(tmp2,tab2,"pos_cmp_fct")
102: }
```

Au final, il suffit d'appeler la fonction de filtrage à la fin du traitement de chaque fichier (lignes 137 et 138) avant de produire la sortie (en veillant bien à utiliser le tableau **RES** au lieu du tableau **ORF** dans les lignes 142 à 144).

```
135: # Traitement à effectuer à la fin du
fichier en cours.
136: ENDFILE {
137:   delete RES
138:   supprime_petits_ORF_inclus(ORF, RES)
139:   print "##gff-version 3"
```

```
140:   print "##sequence-region " name " 1 "
max_pos
141:   OFS = "\t"
142:   for (e in RES) {
143:     print name, PROGRAM_NAME, "ORF",
RES[e]["deb"], RES[e]["fin"], RES[e]["fin"]
- RES[e]["deb"] + 1, "+", ((RES[e]["deb"]
- 1) % 3), "ID=" name "_" RES[e]["id"]
";name=ORF_" RES[e]["id"]
144:   }
145: }
```

En appliquant ce script à la place du précédent, on obtient un nouveau fichier décrivant 36 ORF (il ne faut pas oublier de corriger l'estimation de la taille de la séquence) :

```
$ scripts/filtre_ORF.awk results/nc_045512.2_
ORF.csv | tee results/nc_045512.2_ORF_
filtered.gff
##gff-version 3
##sequence-region nc_045512.2 1 29841
nc_045512.2 filtre_ORF ORF 266 1348 313218 +1
ID=nc_045512.2_81;name=ORF_81
[sortie tronquée]
nc_045512.2 filtre_ORF ORF 29806 29844 39 +0
ID=nc_045512.2_191;name=ORF_191
$ sed -i 's,##sequence-region nc_045512.2 1
.*,##sequence-region nc_045512.2 1 29903,'
results/nc_045512.2_ORF_filtered.gff
$ head -n 2 results/nc_045512.2_ORF_filtered.
gff ##gff-version 3
##sequence-region nc_045512.2 1 29903
```

La visualisation graphique avec *annotation sketch* produit une cartographie plus lisible (cf. figure 3).

Maintenant que nous avons un nombre raisonnable de candidats (et surtout de candidats vraisemblables), nous allons pouvoir les analyser.

1.3 Récupération des séquences d'intérêt

Pour la récupération des séquences sélectionnées, il y a plusieurs solutions : ici, j'ai choisi d'utiliser **seqretsplit** sur le fichier contenant toutes les traductions des ORF d'intérêt, puis de ne conserver que les séquences correspondant aux identifiants voulus (un peu bourrin, mais efficace). Nous aurions tout aussi bien pu utiliser un programme du type **agrep**.

```
$ mkdir results/tmp
$ seqretsplit results/nc_045512.2_ORF.fasta -osdirectory2 results/
tmp/ -auto
$ ls -v results/tmp/
nc_045512.2_1.fasta   nc_045512.2_65.fasta   nc_045512.2_129.fasta
nc_045512.2_2.fasta   nc_045512.2_66.fasta   nc_045512.2_130.fasta
[sortie tronquée]
nc_045512.2_63.fasta  nc_045512.2_127.fasta  nc_045512.2_191.fasta
nc_045512.2_64.fasta  nc_045512.2_128.fasta
$ mkdir results/ORF
$ grep ID results/nc_045512.2_ORF_filtered.gff | sed 's,.*ID=\
(.*\);.*,\1,' | while read f; do mv results/tmp/$f.fasta results/
ORF/; done
$ rm -rf results/tmp/
$ ls -v results/ORF/
nc_045512.2_3.fasta   nc_045512.2_106.fasta  nc_045512.2_173.fasta
nc_045512.2_16.fasta  nc_045512.2_122.fasta  nc_045512.2_174.fasta
nc_045512.2_24.fasta  nc_045512.2_137.fasta  nc_045512.2_175.fasta
nc_045512.2_36.fasta  nc_045512.2_139.fasta  nc_045512.2_176.fasta
nc_045512.2_37.fasta  nc_045512.2_159.fasta  nc_045512.2_179.fasta
nc_045512.2_43.fasta  nc_045512.2_160.fasta  nc_045512.2_180.fasta
nc_045512.2_58.fasta  nc_045512.2_162.fasta  nc_045512.2_183.fasta
nc_045512.2_80.fasta  nc_045512.2_167.fasta  nc_045512.2_187.fasta
nc_045512.2_81.fasta  nc_045512.2_168.fasta  nc_045512.2_188.fasta
nc_045512.2_82.fasta  nc_045512.2_169.fasta  nc_045512.2_189.fasta
nc_045512.2_83.fasta  nc_045512.2_171.fasta  nc_045512.2_190.fasta
nc_045512.2_94.fasta  nc_045512.2_172.fasta  nc_045512.2_191.fasta
```

Nous sommes contents, nous avons isolé des régions d'intérêt, mais il reste à savoir en quoi elles sont intéressantes.

2. ÉTUDE APPROFONDIE DES RÉGIONS D'INTÉRÊT DE LA SÉQUENCE DE RÉFÉRENCE

Une manière assez simple de chercher si une séquence biologique est pertinente et sa fonctionnalité est de chercher s'il existe d'autres séquences proches et ce que l'on sait sur elles. Par analogie, il m'arrive parfois (trop souvent) d'avoir un doute sur l'orthographe ou le sens d'un mot, voire son existence. Dans ce cas, je me réfère systématiquement au dictionnaire de l'Académie française **[7]**. Cette démarche est tout à fait raisonnable et légitime dès lors que la base de données consultée est fiable, fournie et accessible.

Pour être plus précis, nous allons chercher parmi les séquences référencées dans la base de données celles qui pourraient potentiellement correspondre à ce que l'on appelle des gènes **orthologues** (cf. encadré).

En bioinformatique, il existe plusieurs bases de données, l'une des plus connues est celle hébergée par le NCBI **[8]** qui propose pour la consulter un outil ancestral, mais toujours efficace et surtout très reconnu, j'ai nommé **blast [9]**. Cet outil est tout à fait installable sur un système GNU/Linux, mais ce qui le rend véritablement intéressant est essentiellement la base de données qui est interrogée, donc nous utiliserons la version en ligne. Pour y accéder, une fois sur le site du NCBI, il faut cliquer sur le bouton ***Blast for proteins*** (cf. figure 4).

Commençons par analyser le premier ORF (et accessoirement le plus grand). Il faut donc téléverser le fichier **results/ORF/nc_045512.2_81.fasta**.

Concernant la base de données, nous allons sélectionner la base **UniProtKB/Swiss-Prot(swissprot)**, car cette base est constituée exclusivement de protéines annotées à la main (avec un processus de validation considéré par la communauté comme garantissant une très grande qualité/pertinence des annotations) et sans redondance (ce qui évite les biais d'interprétation liés aux comptages).

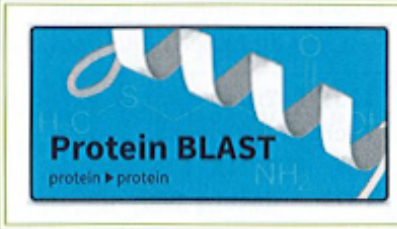

Fig. 4 : Bouton permettant d'accéder à l'outil Blast pour les protéines.

GÈNES ORTHOLOGUES

Vous avez certainement entendu dire de nombreuses fois que l'Homme descend du singe et que le singe descend du poisson (voire de l'arbre selon les personnes). Eh bien, rien de tout cela n'est vrai, sauf éventuellement les singes qui descendent des arbres.

Les grands singes et les hommes – au sens d'espèces – auraient un ancêtre commun qui aurait vécu il y a environ 30 millions d'années et l'ensemble des primates actuels – dont le savant homme (*homo sapiens*) fait partie – aurait un ancêtre commun qui aurait vécu il y a environ 60 millions d'années. Outre les nombreux conditionnels de cette phrase, ce qu'il faut retenir, c'est que la notion d'ancêtre commun est une hypothèse de travail qui permet de remonter à l'ancêtre ultime (LUCA de son petit nom pour *Last Universal Common Ancestor*) qui serait physiquement assez proche d'une amibe.

Acceptons cette hypothèse et engageons-nous en plein milieu d'une saga médiévale fantastique, occulte et complotiste. Le génome (comprendre ici l'ensemble des gènes) des organismes évolue au fil du temps. Certaines mutations sont délétères et les mutants ne survivent pas. D'autres mutations vont au contraire donner des capacités nouvelles à nos amies les amibes : comme avoir un nez permettant donc de porter des lunettes ou encore la possibilité de se reproduire à deux plutôt que tout seul. Mais là, je m'égare...

Dans l'idée des gènes orthologues, supposons que le génome d'une espèce E vivant à une époque lointaine possède un gène donné, alors plusieurs milliers d'années plus tard, les espèces descendantes de E peuvent avoir plus ou moins conservé ce gène. Les versions dérivées du gène ancestral sont appelées des gènes orthologues (tout ça pour ça !).

Bien évidemment, la séquence codant pour le gène peut avoir été altérée, mais la fonction du gène bien conservée, ou inversement la séquence peut avoir été très peu altérée, mais les modifications intervenues au fil du temps ont pu changer drastiquement son rôle fonctionnel. Comme dans tout problème difficile, on posera une seconde hypothèse de travail (donc fausse) pour le simplifier : les séquences nucléiques codant pour des gènes orthologues sont similaires (ce concept ne sera pas défini ici, car il faudrait au moins un chapitre entier juste pour conclure qu'il y a une infinité de définitions de la similarité et qu'aucune n'est pleinement satisfaisante ; ce faisant, je viens de vous faire gagner la lecture de plusieurs chapitres de thèses :-/).

Et pour celles et ceux qui souhaitent en savoir davantage, sachez qu'il existe d'autres modèles plus ou moins subtils d'évolution des espèces qui sont probablement tout aussi faux.

Donc en résumé, si une séquence est très similaire à la séquence d'un gène connu d'une espèce voisine (dans un modèle d'évolution crédible), il y a de fortes présomptions que la séquence code pour un gène orthologue à celui de l'espèce voisine, et donc il est vraisemblable que la fonction du gène soit conservée.

Il faut bien évidemment supprimer les éventuels résultats connus de *SARS-CoV-2* puisque l'idée est de découvrir le « nouveau » virus.

La capture de la page de soumission devrait ressembler à celle présentée en figure 5.

Si d'aventure nous souhaitons ne sélectionner que certains organismes (ou les exclure), il est possible de le faire également sur la page de résultats (zone de filtre sur la droite de l'écran, cf. figure 6 en page suivante), puis en appuyant sur **filter**.

Nous obtenons 100 séquences (limite par défaut), triées par défaut par *e-value* (c'est le nombre de séquences similaires que nous pouvons espérer obtenir par hasard, cf. figure 7, page 31).

Étonnamment, les plus proches séquences trouvées proviennent de virus de la famille des *coronavirus*, liés à un syndrome respiratoire aigu, infectant visiblement la chauve-souris (*bat* en anglais). Sélectionnons les séquences ayant une couverture de notre séquence (requête) de plus de 80 % (tri décroissant au niveau de la colonne ***query cover***). Nous obtenons 27 séquences que nous téléchargeons (menu déroulant ***download***) au format **GenBank** dans le fichier `results/ORF/nc_045512.2_81_related.gb`.

Nous effectuons un contrôle rapide pour voir à quoi cela correspond :

```
$ wc -l results/ORF/nc_045512.2_81_related.gb
27493 results/ORF/nc_045512.2_81_related.gb
$ cat results/ORF/nc_045512.2_81_related.gb
LOCUS       R1A_SARS                4382 aa
linear   VRL 07-APR-2021
DEFINITION  RecName: Full=Replicase polyprotein 1a;
Short=pp1a; AltName:
            Full=ORF1a polyprotein; Contains:
RecName: Full=Non-structural
            protein 1; Short=nsp1; AltName:
Full=Leader protein; Contains:
            RecName: Full=Non-structural protein 2;
Short=nsp2; AltName:
            Full=p65 homolog; Contains: RecName:
Full=Non-structural protein 3;
            Short=nsp3; AltName: Full=PL2-PRO;
AltName: Full=Papain-like
            proteinase; Short=PL-PRO;
Contains: RecName: Full=Non-structural
            protein 4; Short=nsp4; Contains:
RecName: Full=3C-like proteinase;
            Short=3CL-PRO; Short=3CLp;
AltName: Full=Main protease; Short=Mpro;

...
     6601 qdvifsqfds lrvssnqspq gnlgsnepgn
vggndalats tiftqsrvis sftcrtdmek
     6661 dfialdqdvf iqkygledya fehivygnfn
qkiigglhll iglyrrqqts nlviqefvsy
     6721 dssihsyfit deksggsksv ctvidilldd
fvalvkslnl ncvskvvnvn vdfkdfqfml
     6781 wcndekvmtf yprlqaasdw kpgysmpvly
kylnspmerv slwnygkpvt lptgcmmnva
     6841 kytqlcqyln tttlavpvnt rvlhlgagse
kgvapgsavl rqwlpagtil rqwlpagtil
     6901 vhndlypfvs dsvatyfgdc itlpfdcqwd
liisdmydll ldigvhvvrc syihchmird
     6961 klalggsvai kitefswnae lyklmgyfaf
wtvfctnana sssegfligi nylgkpkvei
     7021 dgnvmhaiic fgeipqfgtg vliacliwln
srlswlvmp
//
$ seqcount results/ORF/nc_045512.2_81_related.
gb -auto -stdout
27
```

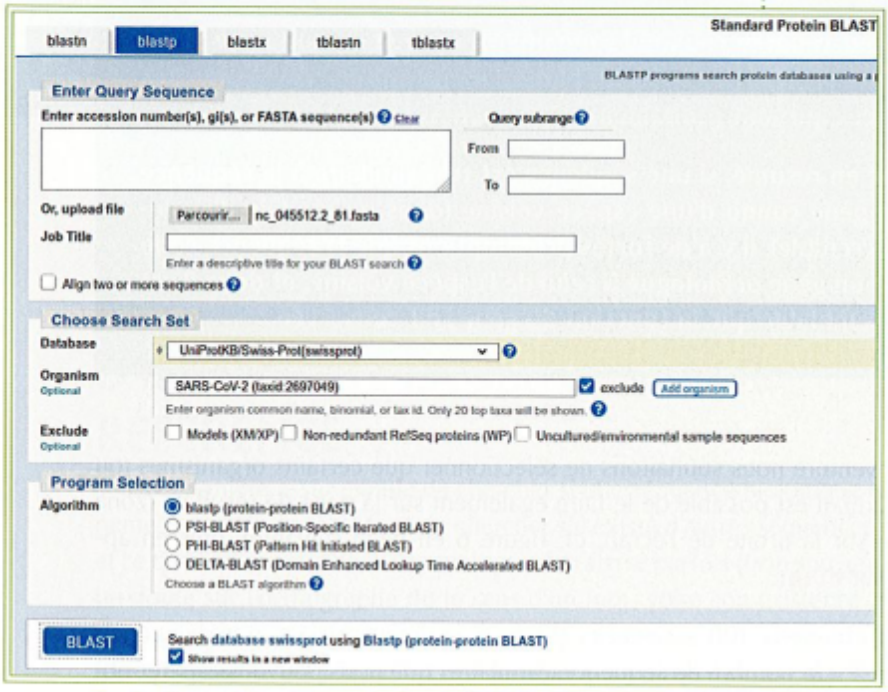

Fig. 5 : Formulaire de soumission de l'ORF n°81 sur le site de NCBI.

Cela semble cohérent.

En cliquant sur le lien ***graphic summary***, nous obtenons un résumé graphique (cf. figure 8, page 32) illustrant une synthèse des alignements et des annotations retrouvées dans tout ou partie des 27 séquences.

En cliquant sur l'image du haut, nous obtenons le détail des informations récupérées à partir des organismes proches (cf. figure 9, page 35).

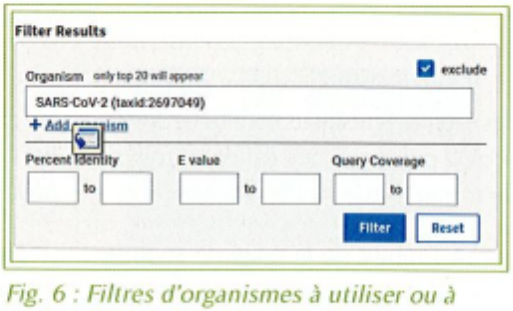

Fig. 6 : Filtres d'organismes à utiliser ou à exclure pour la recherche avec blast.

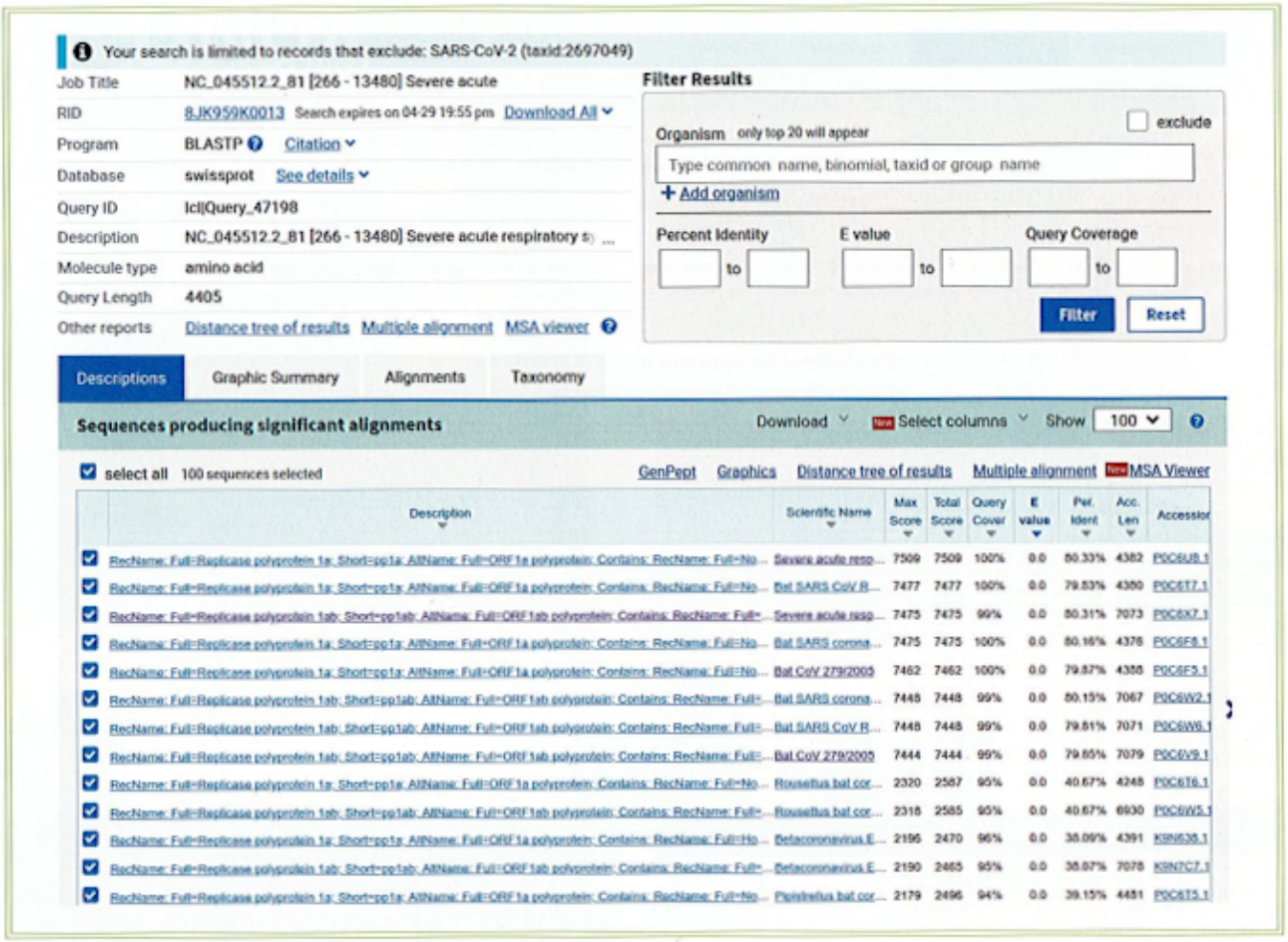

Fig. 7 : Liste des résultats de blast pour la recherche de similarité dans la base UniProtKB/Swiss-Prot pour l'ORF n°81.

Créons à partir du fichier que nous avons téléchargé un ensemble contenant les 27 séquences, auquel nous ajoutons la séquence qui nous a servi de requête (nous ne supprimons pas le répertoire `results/tmp` tout de suite, car nous en aurons besoin ultérieurement) :

```
$ mkdir results/tmp
$ seqretsplit results/ORF/nc_045512.2_81_related.gb -osdirectory2
results/tmp/ -auto
$ ls results/tmp/
r1ab_bc133.fasta  r1a_bc133.fasta  r1ab_cvben.fasta  r1a_cvben.fasta
r1ab_bc279.fasta  r1a_bc279.fasta  r1ab_cvblu.fasta  r1a_cvblu.fasta
r1ab_bchk3.fasta  r1a_bchk3.fasta  r1ab_cvbm.fasta   r1a_cvbm.fasta
r1ab_bchk4.fasta  r1a_bchk4.fasta  r1ab_cvbq.fasta   r1a_cvmjh.fasta
r1ab_bchk5.fasta  r1a_bchk5.fasta  r1ab_cvmjh.fasta  r1a_mers1.fasta
r1ab_bchk9.fasta  r1a_bchk9.fasta  r1ab_mers1.fasta  r1a_sars.fasta
r1ab_bcrp3.fasta  r1a_bcrp3.fasta  r1ab_sars.fasta
$ cat results/ORF/nc_045512.2_81.fasta results/tmp/*fasta > results/
ORF/nc_045512.2_81_related.fasta
$ seqcount results/ORF/nc_045512.2_81_related.fasta -auto -stdout
28
```

Cet ensemble va nous servir à procéder nous-mêmes à l'alignement multiple avec le programme **ClustalΩ**. Pour cela, nous avons au moins 2,5 solutions sous Debian/Ubuntu :

1. installer et utiliser le *package* **clustalo** ;
2. installer et utiliser le *package* **clustalw** ;

2.5. installer le *package* **clustalw** et utiliser le *wrapper* fourni avec EMBOSS.

Devinez quoi ? J'ai choisi de passer par le *wrapper* EMBOSS qui s'appelle **emma**. Donc, il faut installer `clustalw` :

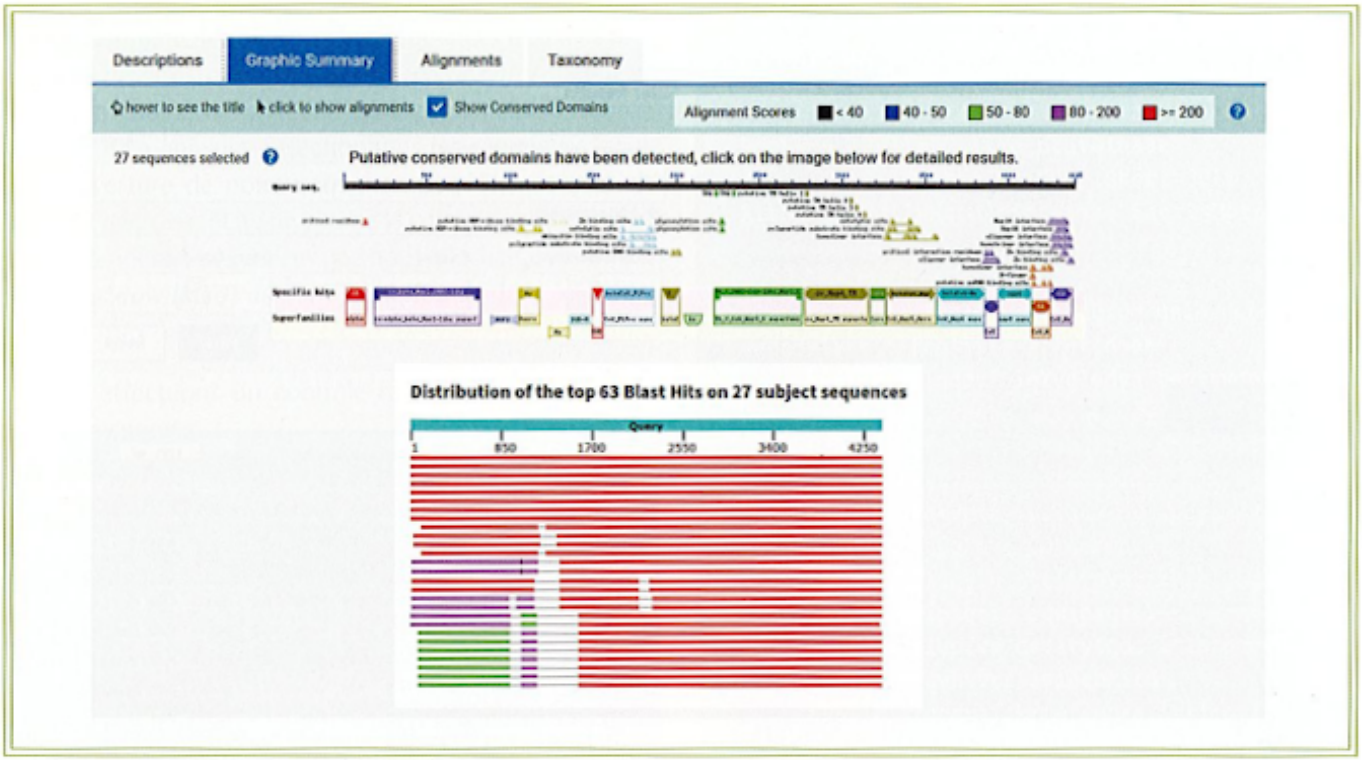

Fig. 8 : Synthèse graphique de l'alignement des 27 séquences retrouvées par blast et qui s'alignent sur 80 % ou plus de l'ORF n°81.

```
$ sudo apt install clustalw
```

Puis, il suffit de lancer l'alignement sur le fichier contenant les 28 séquences.

```
$ emma results/ORF/nc_045512.2_81_related.
 fasta -outseq results/ORF/nc_045512.2_81_
    related.emma -dendoutfile results/ORF/
 nc_045512.2_81_related.dnd -osformat2 msf
                                    -auto



 CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments


Sequence type explicitly set to Protein
Sequence format is Pearson
Sequence 1: NC_045512.2_81  4405 aa
Sequence 2: R1AB_BC133      7126 aa
[sortie tronquée]
Sequence 28: R1A_SARS       4382 aa
Start of Pairwise alignments
Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score:  31
Sequences (1:3) Aligned. Score:  80
[sortie tronquée]
Sequences (26:28) Aligned. Score:  28
Sequences (27:28) Aligned. Score:  32
Guide tree file created:   [00010536C]

There are 27 groups
Start of Multiple Alignment

Aligning...
Group 1: Sequences:   2      Score:72062
Group 2: Sequences:   3      Score:72651
[sortie tronquée]
Group 26: Sequences:   9      Score:70556
Group 27: Sequences:  28      Score:26996
Alignment Score 5008075

GCG-Alignment file created
[00010536B]
```

Le programme ClustalΩ construit au passage un dendrogramme (arbre de proximité/de guidage) au format **newick** (également appelé *New Hampshire format*). Il existe plusieurs outils permettant de visualiser cet arbre (`figtree`, `treeviewx`, `njplot`, etc.).

```
$ sudo apt install treeviewx # njplot
figtree
```

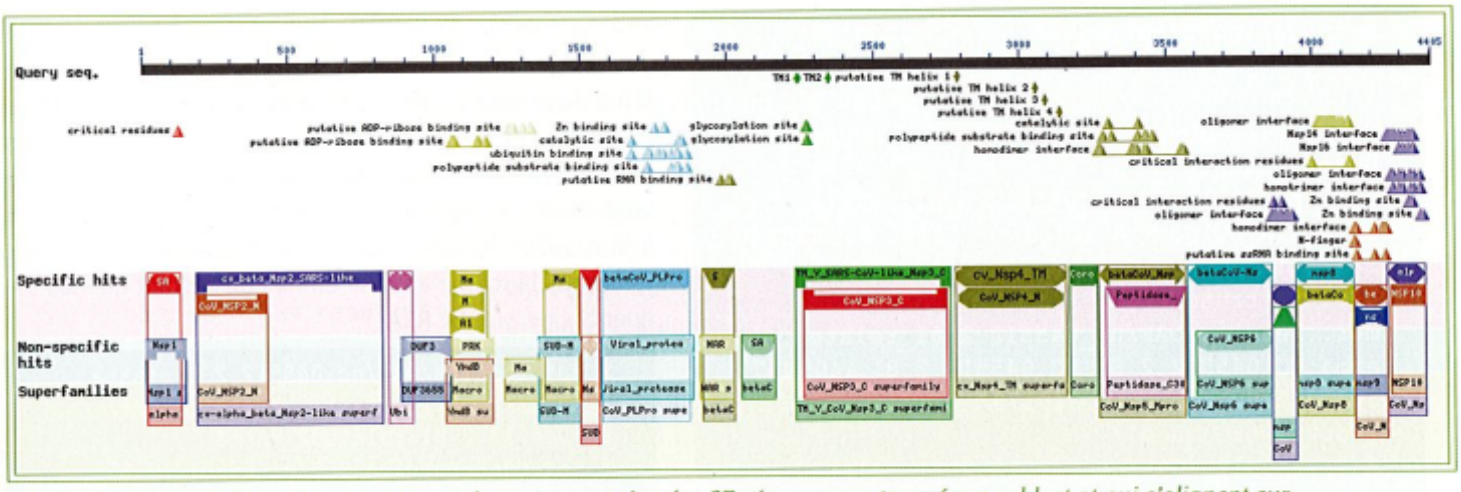

Fig. 9 : Détail des informations provenant de tout ou parties des 27 séquences retrouvées par blast et qui s'alignent sur 80 % ou plus de l'ORF n°81.

Dans un premier temps, je vous propose de tester **treeviewx**. C'est un outil qui nécessite de passer par une interface graphique. Il suffit de charger le fichier (pensez à changer le filtre de noms de fichiers par défaut en choisissant le format ***CLUSTALX guide tree (*.dnd)***). Le programme permet d'exporter l'arbre affiché au format **svg**, ce que j'ai fait. J'ai ensuite converti l'image au format **PNG** grâce à l'outil **convert** (fourni avec le *package* **imagemagick**). Le résultat est l'image de la figure 10.

```
$ tv # lance l'interface graphique de
treeviewx
$ convert results/ORF/nc_045512.2_81_
related.dnd.svg images/nc_045512.2_81_
related.png
```

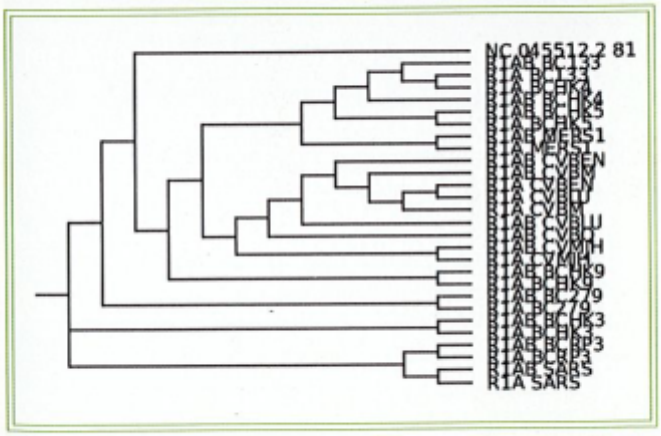

Fig. 10 : Arbre de guidage produit par treeviewx et calculé par ClustalΩ lors de l'alignement de la séquence d'acides aminés de l'ORF n°81 avec les 27 séquences récupérées avec blast.

Je vous propose également d'utiliser **njplot**. Si son interface graphique très rétro (**Tcl/Tk**) est assez peu engageante, le paquet fournit également deux programmes assez sympathiques: **newicktotxt** et **newicktops**. Ces deux outils prennent le nom du fichier *newick* en paramètre et produisent respectivement un fichier ASCII ou **Postscript** représentant l'arbre. Le nom du fichier est construit à partir de la base du fichier newick avec l'extension **.txt** ou **.ps** (attention la base s'arrête au premier **.** rencontré et non au dernier).

```
$ newicktotxt results/ORF/nc_045512.2_81_
related.dnd
$ mv results/ORF/nc_045512.txt results/ORF/
nc_045512.2_81_related.txt
$ newicktops results/ORF/nc_045512.2_81_
related.dnd
$ convert results/ORF/nc_045512.ps results/
ORF/nc_045512.2_81_related.png
$ rm -f results/ORF/nc_045512.ps
```

L'arbre affiché par **njplot** n'est pas rigoureusement identique à celui proposé par **treeviewx** (je ne suis pas spécialiste et je ne tenterai donc pas de l'expliquer). Celui produit par **njplot** me semblant *a priori* plus cohérent, et l'outil permettant de faire de la ligne de commande, c'est celui qui je conserve au final (l'image est disponible sur le dépôt **Git**).

EMBOSS propose également des outils permettant de travailler sur les alignements de séquences ; il est par exemple possible de récupérer des informations sur l'alignement ou bien de produire des images permettant d'avoir une vue globale du résultat (l'image est également accessible sur le dépôt Git) :

```
$ infoalign results/ORF/nc_045512.2_81_
related.emma -auto -stdout
# USA                Name          SeqLen AlignLen
Gaps GapLen Ident Similar Differ % Change Weight
Description
msf::results/ORF/nc_045512.2_81_related.
emma:R1A_BC133 R1A_BC133      4441 458135140
1882469209058.917267 4.200000
[sortie tronquée]
msf::results/ORF/nc_045512.2_81_related.
emma:NC_045512.2_81 NC_045512.2_81 44054577
501721861521202359.340179 7.400000
[sortie tronquée]
msf::results/ORF/nc_045512.2_81_related.
emma:R1A_CVMJH R1A_CVMJH      4474 457833104
1514521243966.928787 6.900000
$ plotcon results/ORF/nc_045512.2_81_
related.emma -graph png -goutfile results/
ORF/nc_045512.2_81_related_plotcon -auto
Created results/ORF/nc_045512.2_81_related_
plotcon.1.png
```

En regardant de plus près le fichier d'alignement (**results/ORF/nc_045512.2_81_related.emma**), nous nous apercevons qu'aux environs de la position 5 580, les séquences dont le nom commence par **R1AB_** continuent l'alignement tandis que les séquences commençant par **R1A_** et la séquence requête s'arrêtent. Ceci explique l'aspect de l'image obtenue avec **plotcon** (**results/ORF/nc_045512.2_81_related_plotcon.1.png**). Lorsque nous regardons l'arbre de guidage (cf. figure 10), nous nous apercevons également que les séquences préfixées par **R1AB_** sont très proches (voire appariées) à la séquence dont le nom est identique au préfixe **R1A_** près.

Regardons de plus près à quoi correspondent ces séquences et récupérons pour cela les annotations disponibles pour ces séquences :

```
$ seqretsplit -feature results/ORF/
nc_045512.2_81_related.gb -osdirectory
results/tmp/ -osformat2 gff -auto
-stdout
```

Les séquences ayant le préfixe **R1AB_** correspondent toutes à une protéine appelée *Replicase polyprotein 1ab*, tandis que celles ayant le préfixe **R1A_** correspondent toutes à une protéine appelée *Replicase polyprotein 1a*. La littérature ne semble pas proposer de protéine *Replicase polyprotein 1b*, mais **[10]** explique que lorsque la séquence **R1A_** est suivie d'un ORF valide, le produit de cet ORF peut se combiner visiblement avec la chaîne de la protéine *Replicase polyprotein 1a* pour former la protéine *Replicase polyprotein 1ab* (je passe les détails techniques qui n'ont pas d'intérêt ici). Ceci explique que **blast** ait renvoyé les deux séquences, car sur la partie correspondant à la requête, le score calculé est globalement le même. Refaisons la même analyse en ne considérant que les séquences de préfixe **R1A_** :

```
$ cat results/ORF/nc_045512.2_81.fasta
results/tmp/r1a_*fasta > results/ORF/
nc_045512.2_81_related2.fasta
$ seqcount results/ORF/nc_045512.2_81_
related2.fasta -auto -stdout
14
$ rm -rf results/tmp/
$ emma results/ORF/nc_045512.2_81_related2.
fasta -outseq results/ORF/nc_045512.2_81_
related2.emma -dendoutfile results/ORF/
nc_045512.2_81_related2.dnd -osformat2 msf
-auto



 CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments


Sequence type explicitly set to Protein
Sequence format is Pearson
Sequence 1: NC_045512.2_81  4405 aa
[sortie tronquée]
...

Group 13: Sequences:  14      Score:24085
Alignment Score 887805

GCG-Alignment file created      [00011855B]

$ newicktotxt results/ORF/nc_045512.2_81_
related2.dnd
$ mv results/ORF/nc_045512.txt results/ORF/
nc_045512.2_81_related2.txt
$ newicktops results/ORF/nc_045512.2_81_
related2.dnd
$ convert results/ORF/nc_045512.ps results/
ORF/nc_045512.2_81_related2.png
$ rm -f results/ORF/nc_045512.ps
$ plotcon results/ORF/nc_045512.2_81_
related2.emma -graph png -goutfile results/
ORF/nc_045512.2_81_related2_plotcon -auto
Created results/ORF/nc_045512.2_81_
related2_plotcon.1.png
```

Les images produites (disponible sur le dépôt Git) confortent dans l'idée que cet ORF que nous étudions code pour la protéine *Replicase polyprotein 1a* (pour information, c'est une sorte de super protéine qui permet aux virus qui en disposent de se répliquer).

Sur la base du fichier **results/nc_045512.2_ORF_filtered.gff**, créons le fichier **results/nc_045512.2.gff** que nous allons étoffer (pour chaque ligne modifiée ou ajoutée, nous utiliserons **perso** comme information de la seconde colonne). Nous ajoutons quelques informations triviales (pour des biologistes et celles et ceux qui ont lu le petit détour vers la biologie de **[1]** ;-)) :

- bien que l'entête du fichier contienne la méta-information de la position de début et de fin de la séquence, il est d'usage d'ajouter une annotation reprenant cette information en indiquant dans la dernière colonne à quoi correspond la séquence complète ;
- il est également d'usage d'indiquer les parties précédant et suivant la traduction de la séquence d'ARN. Avant le début de la première séquence codante, la région s'appelle 5'-UTR et après la dernière séquence codante, la région s'appelle 3'-UTR. L'abréviation UTR provient de l'anglais *untranslated region* et le 5' (resp. 3') correspond au sens de lecture (gauche vers droite, resp. droite vers gauche) de la séquence nucléique (le numéro fait référence au numéro de l'atome de carbone utilisé lors de la synthèse des acides nucléiques) ;
- nous pouvons également ajouter l'information sur la queue poly-A.

Ce premier ORF que nous venons d'analyser semble bien être une séquence codante, aussi nous changeons son type de **ORF** à **CDS** (*Coding Data Sequence*) et supprimons également le score (qui était égal à la longueur de l'ORF, donc qui n'est pas véritablement un score). Nous ajoutons également dans la dernière colonne les informations que nous avons retrouvées plus ou moins à l'identique dans les 14 autres séquences, à savoir que **locus_tag=1a**, que **product=Replicase polyprotein 1a** et que **note=pp1a%3B ORF1a polyprotein** (je vous l'accorde, reproduire sans tout comprendre est assez discutable, mais pour tout comprendre, il faudrait faire un trop gros détour vers la biologie). En général, l'annotation d'une CDS est associée à l'annotation d'un gène. Cela passe par l'ajout du nom du gène (information sémantique), mais pour les outils d'affichage, il faut expliciter le lien de parenté avec l'annotation de gène. Ici, je triche un peu (parce que la littérature que je ne citerai pas est vraiment concordante) et j'ajoute **gene=ORF1a**. Nous pouvons ajouter également l'annotation du gène en dupliquant l'annotation de la CDS, et en changeant l'identifiant (j'ai juste remplacé le suffixe **_81** par **_pp1a**, et le nom du gène **ORF1a** par **pp1a**). Ceci nous permet d'ajouter le lien formel de parenté entre la CDS et le gène en ajoutant l'information **Parent=nc_045512.2_pp1a** dans l'annotation de la CDS, ce qui donne un fichier d'annotation (**results/nc_045512.2.gff**) déjà plus précis :

```
##gff-version 3
##sequence-region nc_045512.2 1 29903
nc_045512.2 perso region 1 29903 . + . ID=nc_045512.2;dbxref
=taxon:2697049;name=Severe acute respiratory syndrome
coronavirus 2;Alias=SARS-CoV-2;note=Wuhan-Hu-1 (Wuhan
seafood market pneumonia virus);mol_type=genomic
RNA;country=China;date=2019-12
nc_045512.2 perso five_prime_UTR 1 265 . + . ID=region 5' UTR
nc_045512.2 perso CDS 266 13483 . + 1 ID=nc_045512.2_81;na
me=ORF_81;gene=ORF1a;parent=nc_045512.2_pp1a;locus_
tag=1a;product=Replicase polyprotein 1a;note=pp1a%3B ORF1a
polyprotein
nc_045512.2 perso gene 266 13483 . + . ID=nc_045512.2_
pp1a;name=pp1a;gene=pp1a;locus_tag=1a;product=Replicase
polyprotein 1a;note=pp1a%3B ORF1a polyprotein
nc_045512.2 filtre_ORF ORF 7268 8115 6+2
ID=nc_045512.2_3;name=ORF_3

...

nc_045512.2 filtre_ORF ORF 29806 29844 39+0
ID=nc_045512.2_191;name=ORF_191
nc_045512.2 perso three_prime_UTR 29845 29903 . + . ID=region 3'
UTR
nc_045512.2 perso polyA_sequence 29871 29903 . + . ID=poly-A tail
```

Il reste à faire la même chose pour les 35 ORF restants... dans le prochain et dernier article de cette initiation.

CONCLUSION

Nous venons de voir comment les outils et les bases de données issus de la bioinformatique permettent de transférer de la connaissance sur de nouveaux organismes. Cela est clairement lié à l'idéologie du logiciel libre (*open source*) de l'ouverture des données (*open data*) qui est présente depuis de nombreuses années (au moins 30 ans) au sein de la communauté bioinformatique. En cela, cette science se rapproche plus de l'informatique que de la biologie, qui est encore très marquée par l'idée de breveter à tout va. Pourtant, une large majorité des biologistes estiment que la bioinformatique n'est qu'un prolongement de la biologie. Je suis certain de ne pas être un biologiste et pourtant je suis bioinformaticien. Je reste persuadé que lorsqu'un sujet d'étude ne trouve pas sa place dans un microcosme établi, c'est que le sujet ne présente aucun intérêt ou bien au contraire qu'il mérite une place à part entière. De même qu'il y a un demi-siècle, l'informatique a été admise comme une science à part entière et non plus considérée comme une extension des mathématiques, de même que la biochimie n'est ni de la biologie ni de la chimie (et donc pas de la bio-chimie), la bioinformatique n'est ni de l'informatique ni de la biologie (et donc pas de la bio-informatique). Cela n'en fait pas pour autant une science rivale, mais au contraire une science complémentaire, dont les fruits contribuent à l'essor de ses pairs. ■

POUR ALLER PLUS LOIN

Si vous souhaitez découvrir les problématiques spécifiques à la bioinformatique, je vous invite à découvrir et explorer le site https://rosalind.info/, que j'ai découvert très récemment. J'en profite pour remercier M. Favreau, lecteur de GLMF pour son retour sur le premier article de la série et pour m'avoir indiqué cette ressource.

RÉFÉRENCES

[1] A. MANCHERON, *« Voyage initiatique vers la bioinformatique : les premiers pas »*, *GNU/Linux Magazine France n°251*, Septembre 2021 : https://connect.ed-diamond.com/gnu-linux-magazine/glmf-251/voyage-initiatique-vers-la-bioinformatique-les-premiers-pas

[2] P. RICE, I. LONGDEN et A. BLEASBY, *« EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite »*, Trends in Genetics n°16(6), 2000, p 276 à 277.

[3] Site officiel de la suite EMBOSS : http://emboss.sourceforge.net/

[4] Site officiel de la *Sequence Ontology* (SO) : http://www.sequenceontology.org/

[5] RFC de la syntaxe générique des *Uniform Resource Identifier* (URI) : http://www.rfc.fr/rfc/fr/rfc3986.pdf

[6] Site officiel de la suite GenomeTools : http://genometools.org/

[7] Dictionnaire en ligne de l'Académie française (9e édition) : https://academie.atilf.fr/9/

[8] Site du *National Center for Biotechnology Information* (centre national américain) : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

[9] S. F. ALTSCHUL, W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS et D. J. LIPMAN, *« Basic Local Alignment Search Tool »*, Journal of molecular biology, n°215(3), 1990, p 403 à 410.

[10] J. ZIEBUHR, *« The Coronavirus Replicase, Coronavirus Replication and Reverse Genetics »*, Current Topics in Microbiology and Immunology, n°287, 2005.