Introduction

Alignement multiple = Alignement simultané de plusieurs séquences (Nt ou Prot)

Outil essentiel pour :

- Signatures protéiques
- Homologie avec une famille de protéines particulière
- Structure secondaire ou tertiaire des protéines
- Choix d'amorces pour PCR
- Étape pré-requise pour les analyses d'évolution moléculaire

Alignement Multiple : -> car alignement de 2 séquences n'est pas transitif

Programmation dynamique : Solution mathématique optimale -> alignement optimal

- Alignement de 3 séquences maximum
- jusqu'à 8 séquences protéiques d'environ 200aa (en diminuant la demande en mémoire)

Insuffisant

comparaison de séquences multiples

Pour algorithmes exactes beaucoup de mémoire et de temps de calcul requis.

Algorithme de Needleman-Wunsch
Algorithme de Smith-Waterman

2 Globines => 1 sec

3 Globines => 2 min

4 Globines => 5 hr

5 Globines => 3 semaines

6 Globines => 9 ans

7 Globines => 1000 ans

Heuristiques

Introduction

Méthodes approchées = Heuristiques

2 méthodes principales :

- détection de zones d'ancrage
- alignement progressif

Au cours de l'évolution : Accumulation non homogène de mutations le long d'une séquence (zones fonctionnelles plus contraintes)

Certaines positions de la protéine vont donc être conservées, mais cette conservation peut être diffuse (qq aa séparés par de grande zones non similaires)

But : détecter les zones conservées entre plusieurs séquences homologues

Alignement multiple : ClustalW

Thompson *et al.*, Nucleic Acids Res., 22, 4673-80 (1994)

<u>Plusieurs étapes :</u>

Alignement deux à deux de toutes les séquences

- soit algorithme de programmation dynamique (alignement global)
  (matrice de substitution, pondération affine des indels)
- soit méthode d'alignement rapide
  (score =$\sum$ des mots de longueur k identiques (k-tuples) – pénalité fixe pour chaque indel)
  - k = 1 ou 2 résidus pour des protéines
  - k = 2 à 4 résidus pour des séquences ADN

↓

Construction d'une matrice de distances entre les séquences, calculée à partir des scores des alignements obtenus

Exemple d'une matrice de distances

Extrait de Nucleic Acids Res., 22, 4673-80 (1994)

Hbb-Human	1	-					
Hbb_Horse	2	0.17	-				
Hba_Human	3	0.59	0.60	-			
Hba_Horse	4	0.59	0.59	0.13	-		
Myg_Phyca	5	0.77	0.77	0.75	0.75	-	
Glb5_Petma	6	0.81	0.82	0.73	0.74	0.80	-
Lgb2_Luplu	7	0.87	0.86	0.86	0.88	0.93	0.90 -
		1	2	3	4	5	6

Hbb_Human : Globine β humaine
Hbb_Horse : Globine β de cheval
Hba_Human : Globine α humaine
Hba_Horse : Globine α de cheval
Myg_Phyca : myoglobine de sperme de baleine
Glb5_Petma : cyanohémoglobine de lamproie
Lgb2_Luplu : Leghémoglobine de lupin

Alignement multiple : ClustalW

Thompson *et al.*, Nucleic Acids Res., 22, 4673-80 (1994)

Plusieurs étapes :

Alignement deux à deux de toutes les séquences
- soit algorithme de programmation dynamique (alignement global)
- soit méthode d'alignement rapide ($\sum$ des mots de longueur k identiques – pénalité indel

↓

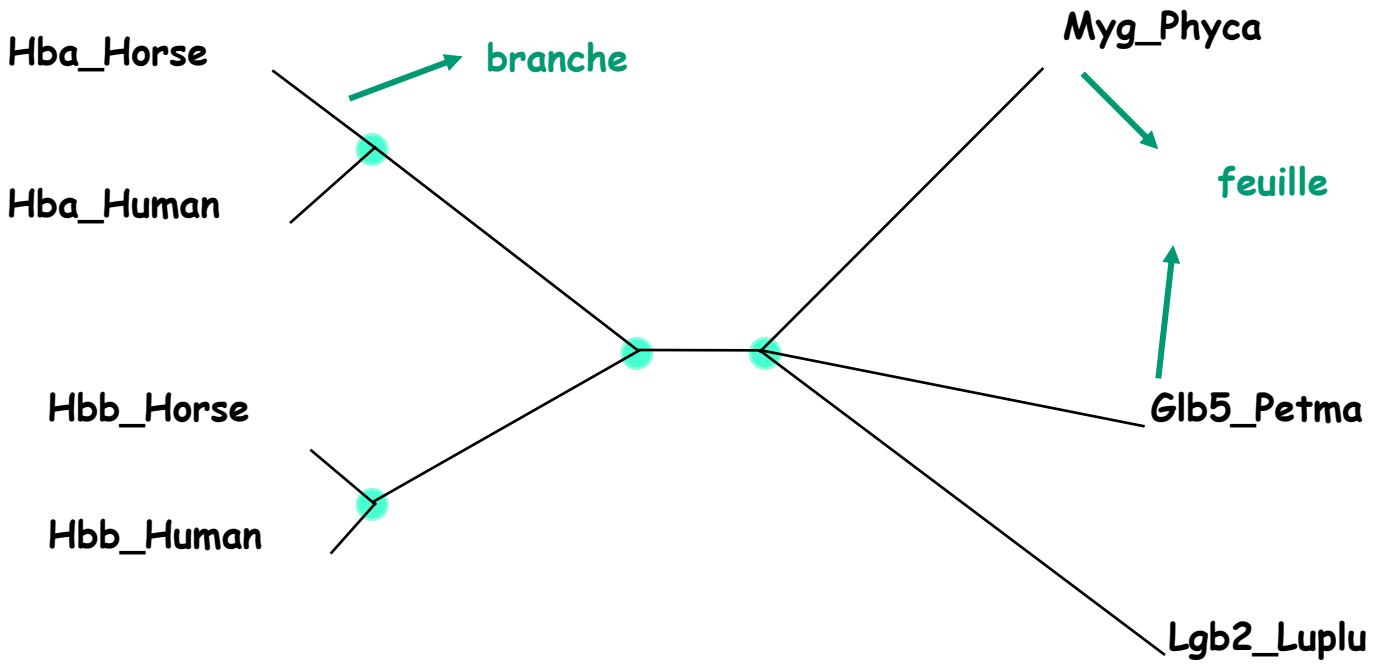
Construction d'une matrice de distances entre les séquences, calculée à partir des scores des alignements obtenus

↓

Construction d'un arbre de parenté entre ces séquences en utilisant la méthode des plus proches voisins (Neighbor Joining Method)

Arbre sans racine déduit de la matrice de distance

Extrait de Nucleic Acids Res., 22, 4673-80 (1994)



= nœud interne : ancêtre commun hypothétique

Alignement multiple : ClustalW

Thompson *et al.*, Nucleic Acids Res., 22, 4673-80 (1994)

Plusieurs étapes :

Alignement deux à deux de toutes les séquences
- soit algorithme de programmation dynamique (alignement global)
- soit méthode d'alignement rapide ($\sum$ des mots de longueur k identiques – pénalité indel

↓

Construction d'une matrice de distances entre les séquences, calculée à partir des scores des alignements obtenus

↓

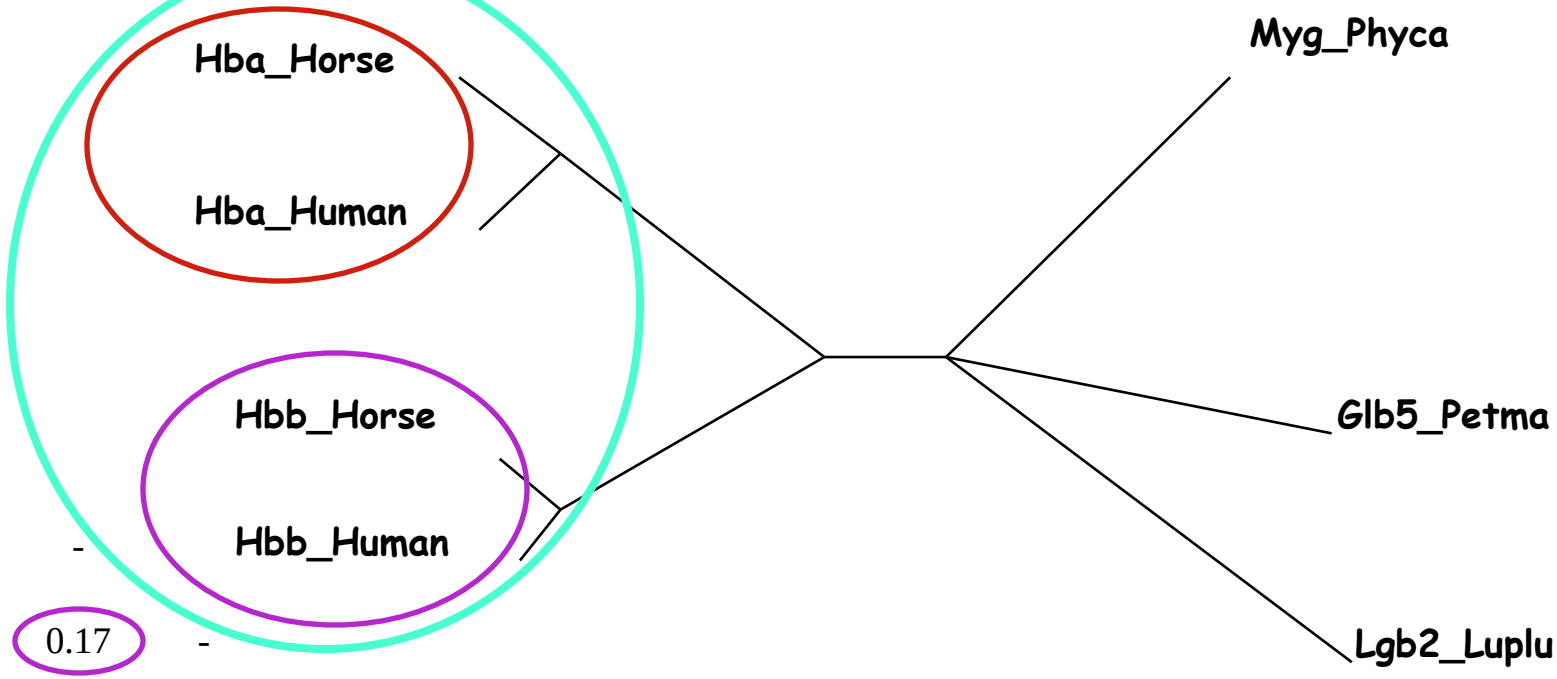
Construction d'un arbre de parenté entre ces séquences en utilisant la méthode des plus proches voisins (Neighbor Joining Method)

↓

Alignement multiple progressif : ajout des séquences en fonction de leurs distances dans l'arbre (distance ↗, on commence par aligner les deux plus proches)
$\Rightarrow$ Alignement par profil

Arbre sans racine déduit de la matrice de distance

Extrait de Nucleic Acids Res., 22, 4673-80 (1994)



Hbb-Human	1	-						
Hbb_Horse	2	0.17	-					
Hba_Human	3	0.59	0.60	-				
Hba_Horse	4	0.59	0.59	0.13	-			
Myg_Phyca	5	0.77	0.77	0.75	0.75	-		
Glb5_Petma	6	0.81	0.82	0.73	0.74	0.80	-	
Lgb2_Luplu	7	0.87	0.86	0.86	0.88	0.93	0.90	-
		1	2	3	4	5	6	

Alignement par profil

- Comment fonctionne cette méthode d'alignement ?

  Aligne les séquences sur toute leur longueur

  Un profil permet de prendre en compte l'ensemble des résidus qui sont rencontrés à chaque position d'un alignement.

- Définition d'un profil dans le cas de Clustal :

Si on considère N séquences alignées sur L positions

	Pos1	Pos2	Pos3	--------	PosL
Seq1	a1,1	a1,2	a1,3	--------	a1,L
Seq2	a2,1	a2,2	a2,3	--------	a2,L
Seq3	a3,1	a3,2	a3,3	--------	a3,L
-					
-					
-					
SeqN	aN,1	aN,2	aN,3	--------	aN,L

Si insertion d'un indel, remplacé par un caractère non utilisé dans la liste des aa (X ou -).

Alignement par profil: exemple

Soit la séquence: MGTKRST

- Peut être représentée sous forme d'un profil:

	Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5	Pos6	Pos7
A	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0
G	0	**1**	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	**1**	0	0	0
L	0	0	0	0	0	0	0
M	**1**	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	**1**	0	0
S	0	0	0	0	0	**1**	0
T	0	0	**1**	0	0	0	**1**
V	0	0	0	0	0	0	0
W	0	0	0	0	0	0	0
Y	0	0	0	0	0	0	0

=> type de profil utilisé pour l'alignement progressif

Alignement par profil: exemple

Soient 4 séquences: AVLKNP
AVLKQP
SILKQP
GVIKQP

- Pour chaque position, nombre de chaque ac. a. (ou bases):

	Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5	Pos6
A	2	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0
S	1	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	3	0
I	0	1	1	0	0	0
P	0	0	0	0	0	4
⋮						
indel	0	0	0	0	0	0

=> on utilise ces profils pour l'alignement progressif

Plusieurs problèmes pour cette approche

Le problème du minimum local

Lié à la nature progressive de la stratégie d'alignement

Pas de correction des erreurs faites dans les premiers alignements, pas de remise en cause des indels :

- Mauvaise structure de l'arbre initial, ordre de branchement incorrect (car arbre établi à partir d'une matrice de distances réalisée à partir d'alignements de séquences 2 à 2 moins fiable que les arbres provenant d'un alignement multiple)

- Même si topologie de l'arbre correcte : un certain pourcentage de résidus mal alignés à chaque étape

Plusieurs problèmes pour cette approche

Le problème du choix des paramètres

Choix de la matrice de substitution :
Une même matrice tout au cours de l'alignement

- fonctionne pour des séquences proches
- problème avec des séquences divergentes

Choix des pénalités de gaps :
Pénalité de gaps affine (2 valeurs : ouverture d'un nouveau gap et extension d'un gap)

Les indels ne sont pas localisés aléatoirement dans les séquences
Gaps plus fréquents entre les éléments de structure secondaire (hélice α et feuillet β) qu'à l'intérieur de ces structures.

Pas de pondérations des séquences

Engendre un biais si les distances évolutives entre séquences ne sont pas également représentées

Améliorations apportées à la dernière version de ClustalW

Le problème des paramètres

Matrices de substitution :
4 matrices différentes utilisées au cours de l'alignement multiple en fonction de la distance séparant les séquences à aligner
(les distances sont mesurées directement à partir de l'arbre initial)

2 séries de matrices proposées : PAM et BLOSUM
BLOSUM par défaut

% de similarités des séquences :

80%-100% :	PAM20	BLOSUM80
60%-80% :	PAM60	BLOSUM62
40%-60% :	PAM120	BLOSUM45 (30%-60%)
0 - 40% :	PAM350	BLOSUM30 (0 - 30%)

Améliorations apportées à la dernière version de ClustalW

Le problème des paramètres

Pondération des indels :

- Si un indel doit être inséré dans une région contenant déjà un indel, la pénalité d'ouverture est réduite en fonction du nombre de séquences possédant cet indel, et la pénalité d'extension est divisée par 2.

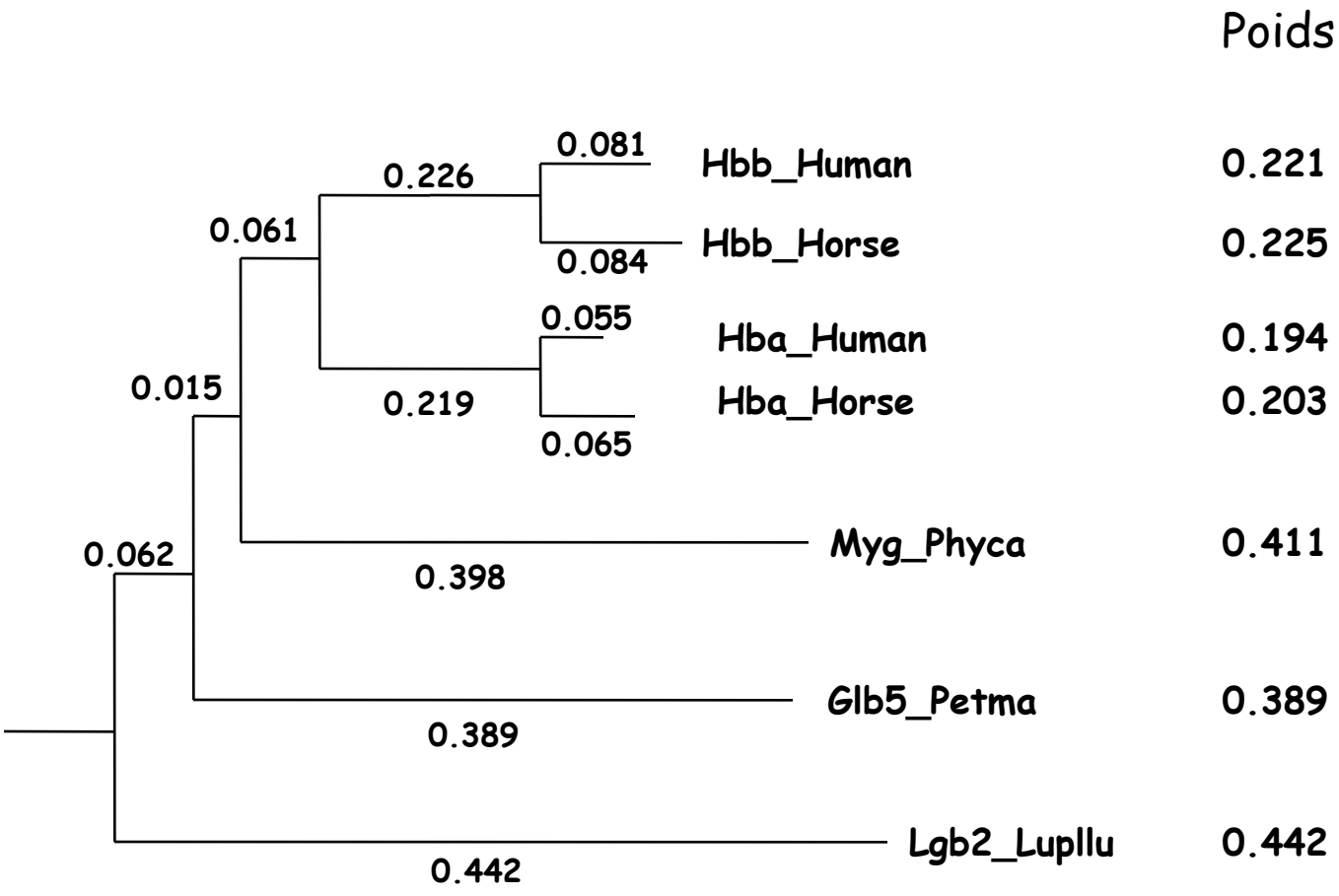
- Insertion d'un indel dans une région sans indel mais dont la distance à un indel déjà présent est < 8 alors la pénalité d'ouverture est augmentée

- Insertion d'un indel dans une suite de 5aa ou plus hydrophyles alors la pénalité d'ouverture est diminuée. Suite de 5aa ou plus (D,E,G,K,N,Q,P,R ou S) = boucle, random coil, donc région non impliquée dans un élément de structure secondaire

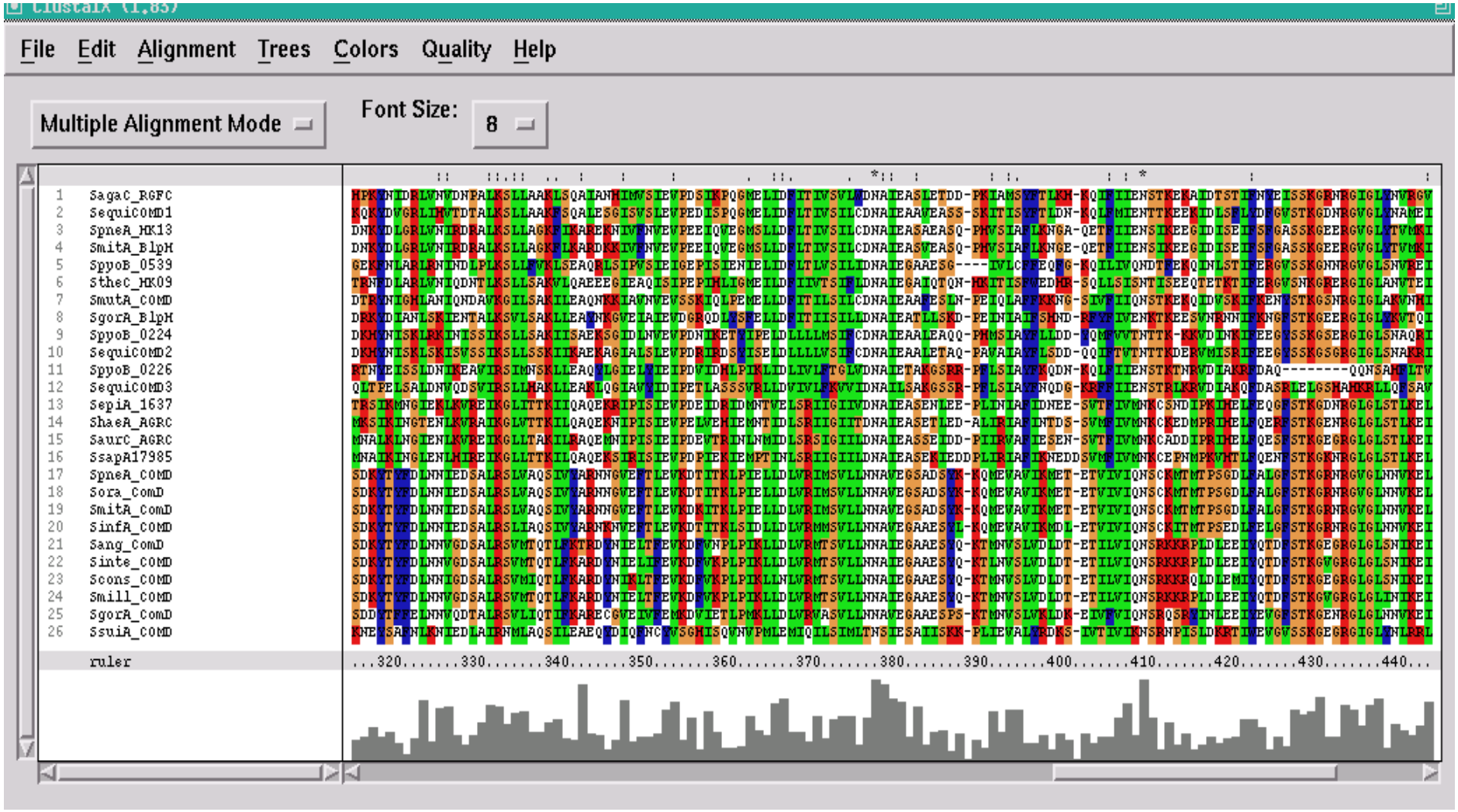
Améliorations apportées à la dernière version de ClustalW

Calcul du poids des séquences du premier exemple :

Extrait de Nucleic Acids Res., 22, 4673-80 (1994)



Exemple de l'alignement multiple des protéines homologues à ComD



Exemples de logiciels d'alignement multiple

- Clustal W : (Thompson, Higgins, Gibson, 1994) www.clustal.org
(progressive)

- T-Coffee : (Notredame, Higgins, Heringa, 2000) tcoffee.crg.cat
(consistency)

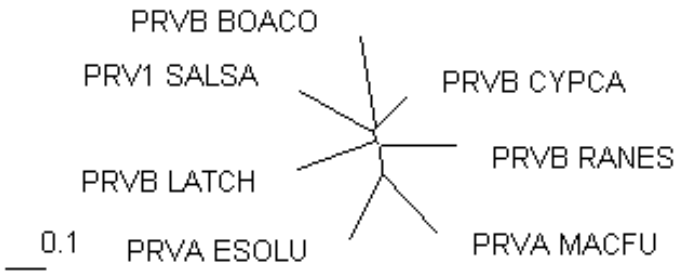
- Mafft : (Katoh ea, Miyata, 2002) mafft.cbrc.jp/alignment/server/
(progressive/consistency, iterative)

- Muscle : (Edgar, 2004) www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
(progressive, iterative)

- Expresso/3DCoffee (Poirot, Notredame, 2004) tcoffee.crg.cat
(structures)

Sélection de séquences

Séquences identiques ou trop proches n'ajoutent pas d'information.
Diversité : propice pour l'alignement



Attention aux séquences répétées

Utilisation de données expérimentales (Swiss-Prot, PDB..)

Analyse de séquences

Comparer les alignements obtenus avec différentes méthodes permet d'analyser les conservations et la variabilité.

Editeurs d'alignements

- Jalview, multiplatform (JAVA) (Dundee, UK)
  www.jalview.org
- Seaview, multiplatform (+ phylogenetic trees) (Lyon, Fr)
  pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html
- BioEdit, Windows (CA, USA)
  www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html