Alignement multiple de séquences biologiques

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

Introduction

Pour algorithmes exacts 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

But : détecter les régions conservées entre plusieurs séquences homologues

Interprétation: Ces régions conservées sont supposées correspondre à des zones où s'exerce une pression de sélection pour maintenir la fonction de la macromolécule (ex: site catalytique d'une enzyme)

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)
  (matrice de substitution, pondération affine des indels)
- soit méthode d'alignement rapide
  (score = ∑ 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

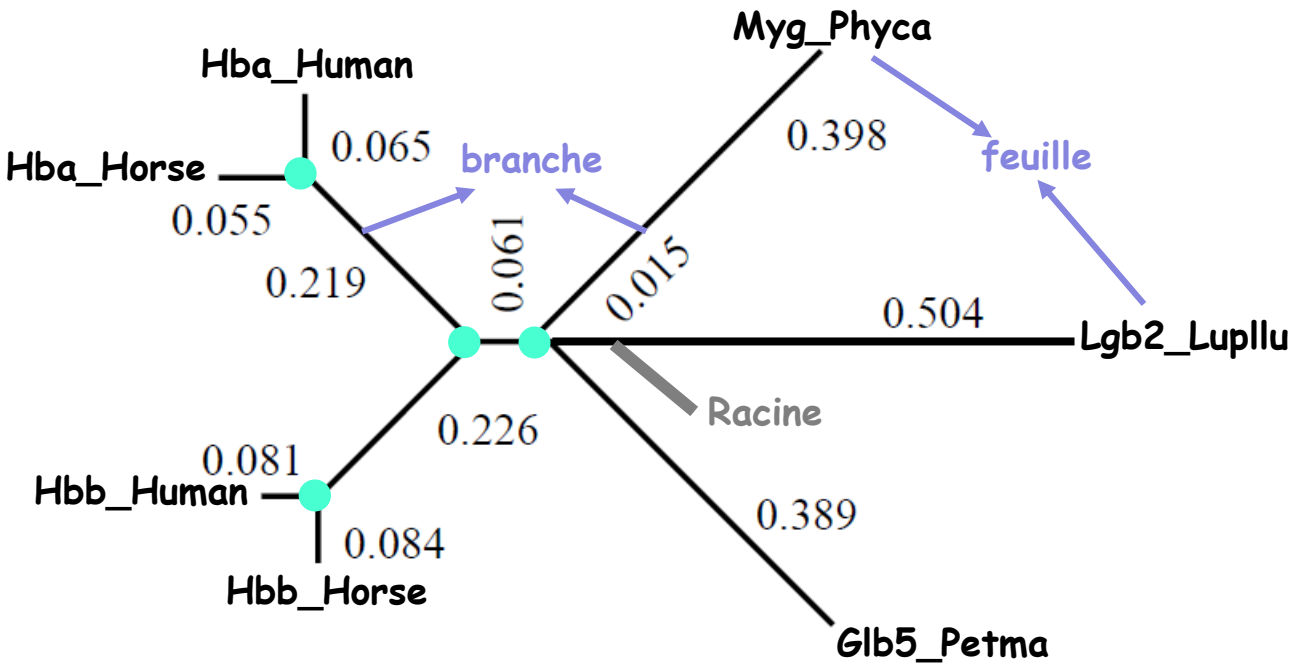
↓

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)

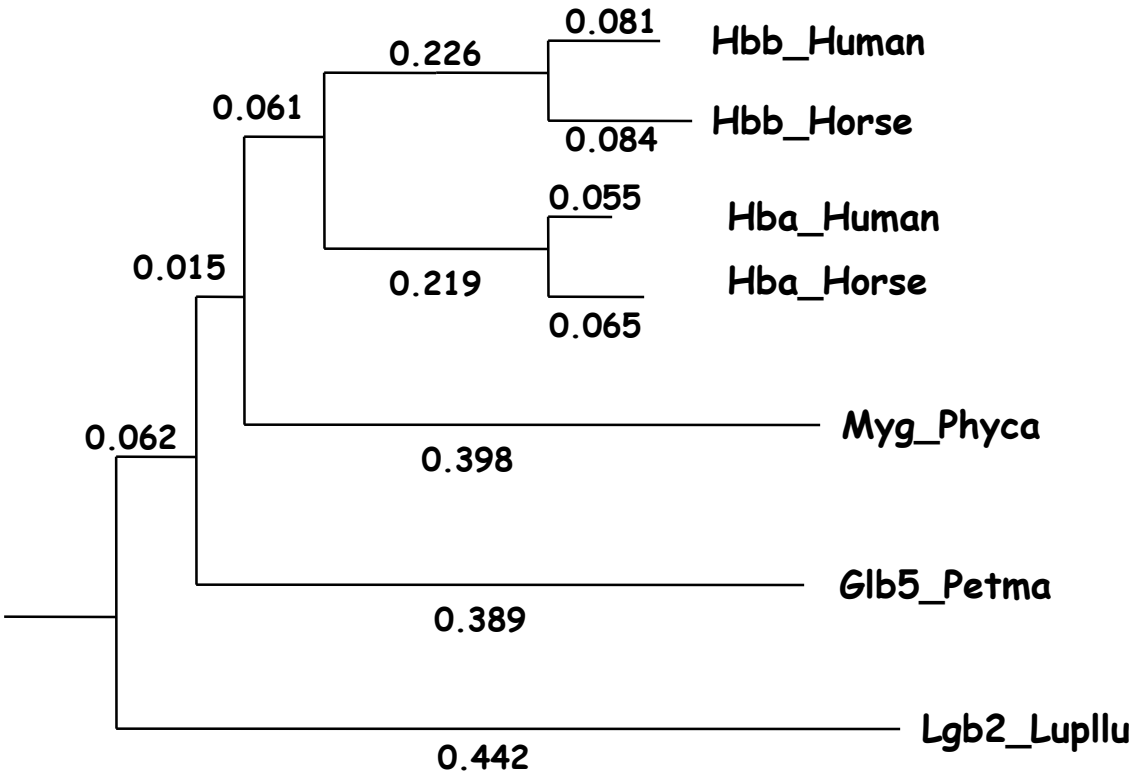
Arbre sans racine déduit de la matrice de distance



● = nœud interne : ancêtre commun hypothétique

Positionnement de la racine : barycentre → point pour lequel la longueur moyenne des branches est égale pour le sous-arbre droit et le sous-arbre gauche

Arbre enraciné déduit



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

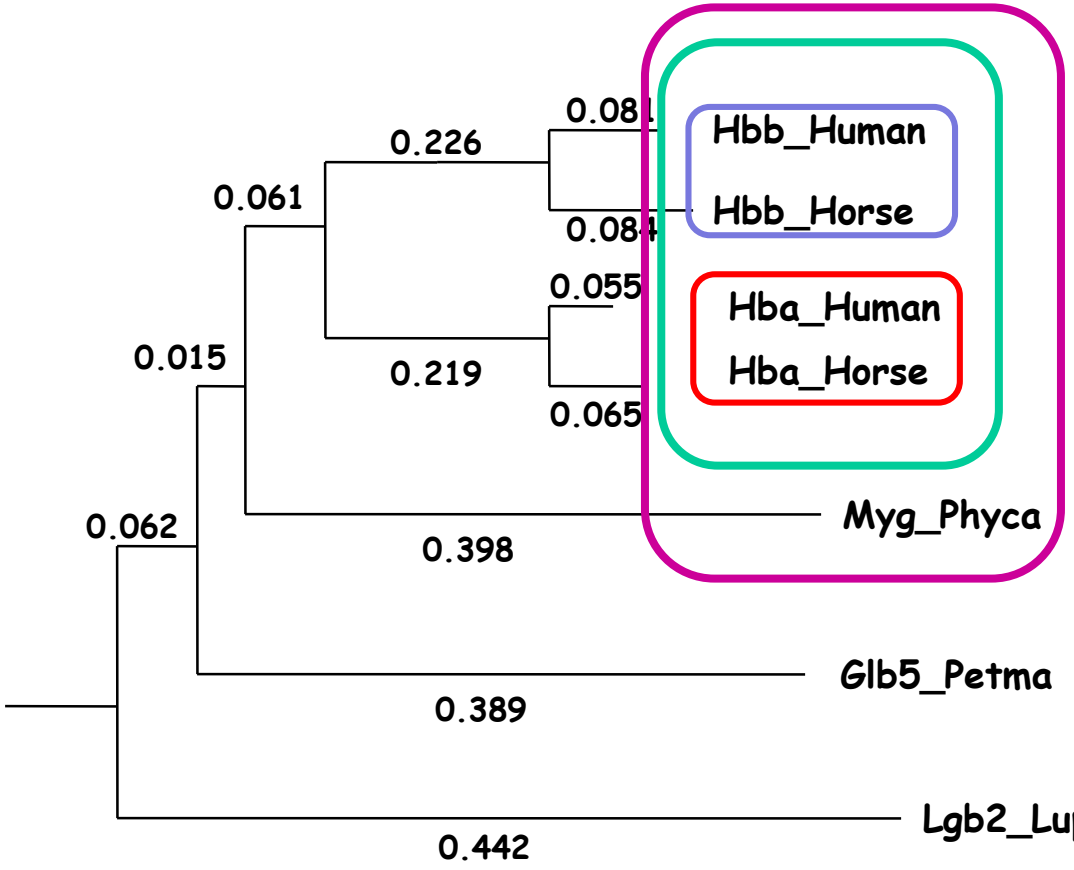
↓

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

Alignement progressif



Alignement de 2 séquences

Alignement de 2 alignements

Alignement de 2 séquences

Alignement de 1 séquence avec un alignement

Alignement par profil

Plusieurs problèmes de 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 de cette approche

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

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 :

→ Dépend de la longueur de la branche et du nombre de séquences partageant cette branche : longueur branche/nombre feuilles partageant cette branche

→ Poids d'une séquence j = Σ de la longueur des branches pondérées de la racine à la feuille

$$W_{seqj} = \sum_{i=1}^{n} \frac{l_i}{o_i}$$

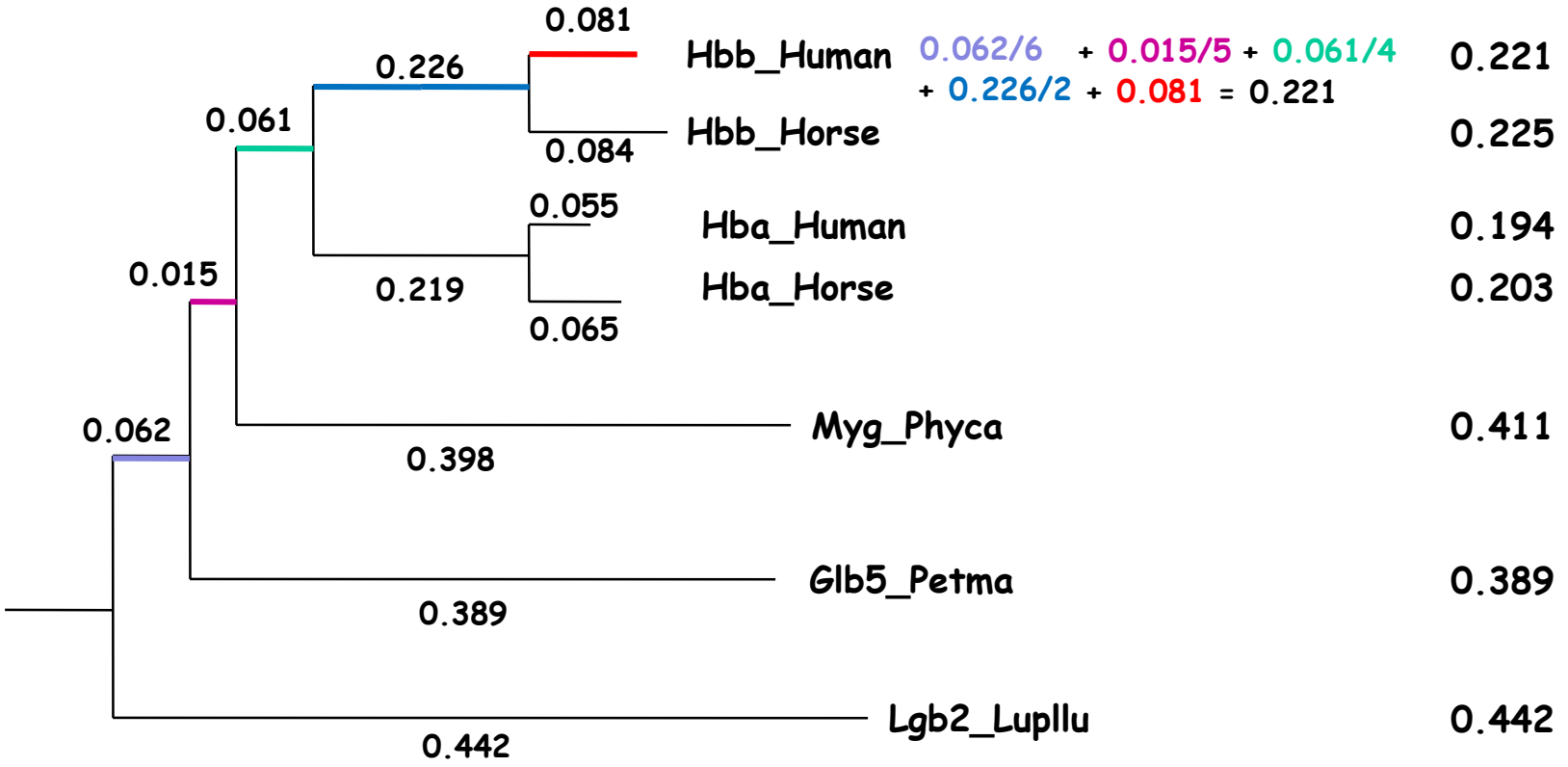
l_i ⟶ Longueur de la branche

o_i ⟶ Nombre de séquences partageant la branche

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)



Alignement progressif

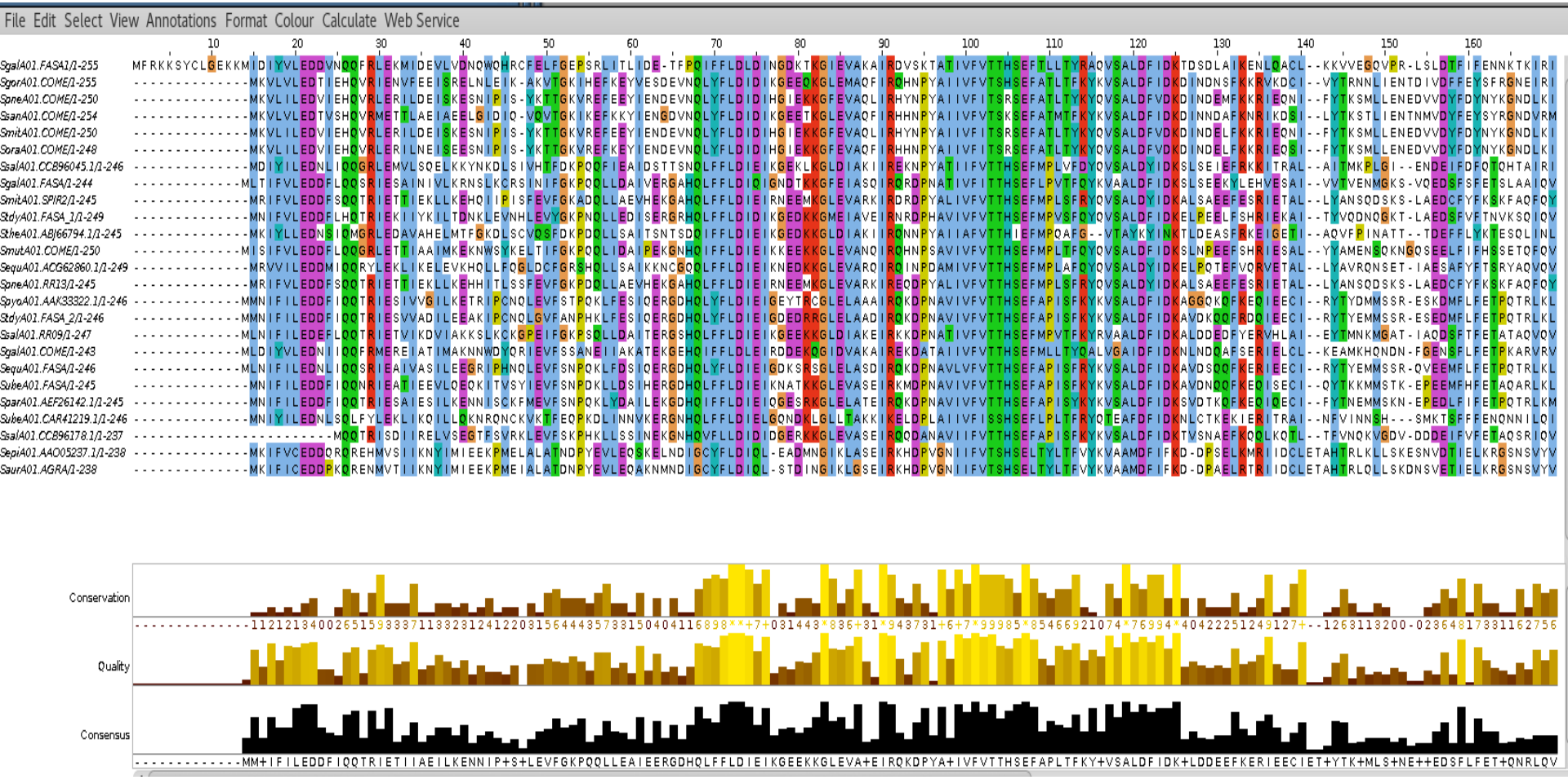
On cherche à aligner un groupe de 4 séquences (déjà alignées) avec un second groupe de 2 séquences (déjà alignées). Le calcul est donné pour l'alignement de la position encadrée.

```
                    Calcul du score:
1 PEEKSAVTAL        M(T,V) x w1 x w5 +
2 GEEKAAVLAL        M(T,I) x w1 x w6 +
3 PADKTNVKAA        M(L,V) x w2 x w5 +
4 AADKTNVKAA        M(L,I) x w2 x w6 +
                    M(K,V) x w3 x w5 +
5 EGEWQLVLHV        M(K,I) x w3 x w6 +
6 AAEKTKIRSA        M(K,V) x w4 x w5 +
                    M(K,I) x w4 x w6 / 8  → Nombre total de comparaisons
```

On effectue toutes les comparaisons 2 à 2 qui sont pondérées par le poids de chacune des 2 séquences (w1 et w5 par exemple) et par la valeur dans la matrice substitution de la mutation d'un acide aminé en l'autre (M(T,V) par exemple). Le total est ensuite divisé par le nombre de comparaison.
Le calcul décrit ci-dessus donnera le score de l'alignement

```
T
L
K
K
V
I
```

Exemple de l'alignement multiple des protéines homologues à ComE de *S. pneumoniae*

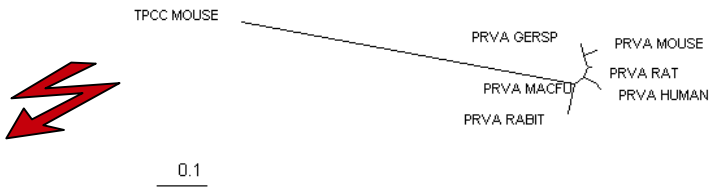


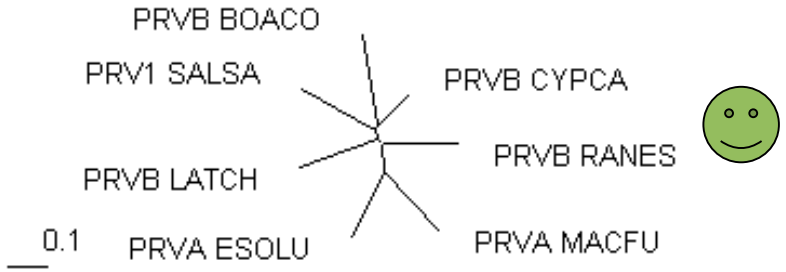
logiciels d'alignement multiple

• Clustal W : (progressive)	(Thompson, Higgins, Gibson, 1994)	www.clustal.org
•Clustal O :	(Sievers *et al.*, 2011)	www.clustal.org/omega/
• T-Coffee : (consistency)	(Notredame, Higgins, Heringa, 2000)	tcoffee.crg.cat
• Mafft : (progressive/consistency, iterative)	(Katoh *et al.*, 2002)	mafft.cbrc.jp/alignment/server/
• Muscle : (progressive, iterative)	(Edgar, 2004)	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
• Expresso/3DCoffee (structures)	(Poirot, Notredame, 2004)	tcoffee.crg.cat

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