Formats de fichiers utilisés dans le NGS

FASTA

Type de fichier
Séquence

Signification du nom
Format utilisé par l'outil FastA (fast alignment)

Qui le génère
Presque tous

Qui le lit
Presque tous, vous

Exemple

```
>sequence1
CGATGTACGCTAGAT
```

Explications
Chaque séquence commence par un chevron (>), suivi du nom de la séquence. Bien que cela ne soit pas obligatoire, il est recommandé que le nom de la séquence soit unique dans le fichier. La séquence elle-même suit.

FASTQ

Type de fichier
Séquence de lecture

Signification du nom
Comme FASTA, mais avec la qualité (Q)

Qui le génère
Le séquenceur

Qui le lit
Les outils de mapping, les visualisateurs, vous

Exemple

```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT
+
!''*((((***+))%%%++)(%%%%).1***-+*''))**55CCF>>>>>>CCCCCCC65
```

Explications

Chaque séquence est codée sur 4 ligne :

1. un @, suivi du nom de la séquence ;
2. la séquence elle-même suit ;
3. un + (avec éventuellement le nom de la séquence, encore une fois) ;
4. la qualité de la séquence.

La qualité de la séquence suit un codage particulier, où chaque caractère représente un nombre. En général, l'association est la suivante:

!	"	#	$	%	&	'	(	)	*	+	,	-	.	/	0	1	2	3	4
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

5	6	7	8	9	:	;	<	=	>	?	@	A	B	C	D	E	F	G	H
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39

I
40

Chaque nombre représente la probabilité *p* de se tromper sur la lecture d'une base. Le code représente la valeur $-10 \log_{10}(p)$. Par exemple, le caractère C code le nombre 34. Il représente donc une probabilité d'erreur d'environ 4.10^{-4}. Les codes les plus à droite représentent donc les meilleures qualités.

Attention : pour des données relativement anciennes, il existe d'autres codages de la qualité (i.e. d'autres associations entre les caractères et les nombres).

Pour en savoir plus

- Page Wikipedia du format : http://en.wikipedia.org/wiki/FASTQ_format
- Référence : http://maq.sourceforge.net/fastq.shtml
- Article NAR présentant le format : http://nar.oxfordjournals.org/content/38/6/1767.full

BED

Type de fichier
Annotation

Signification du nom
Browser Extensible Format

Qui le génère
Les outils d'annotation, TopHat

Qui le lit
Les visualisateurs, vous

Remarque
Le format BED est un format multi-forme, qui peut être utilisé dans beaucoup de contextes.

Exemple 1 (simple)

```
chr1   100   200    peak_1    123
```

Explications
Chaque ligne est une annotation. Les informations sont tabulées, i.e. chaque ligne contient un nombre fixe de colonnes (ici, 5), séparées par des tabulations.
Le format BED est utilisée pour beaucoup de types d'annotations, comme les régions MACS :

1. (`chr1`) le nombre du chromosome (ou du scaffold)
2. (`100`) position extrémale en 5'
3. (`2099`) position extrémale en 3'
4. (`peak_1`) nom systématique de la jonction
5. (`123`) score de la région

Dans d'autres contexte, on peut ne trouver que les 3 ou 4 premiers champs.

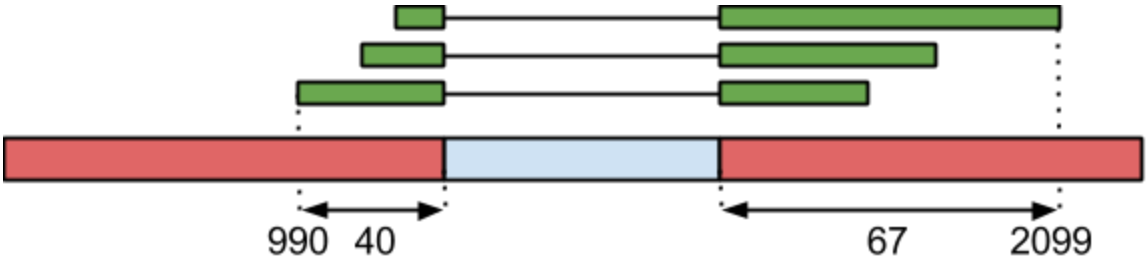
Exemple 2 (jonctions entre exons)

```
chr1   990   2099   JUNC00001560   3   +   990   2099   255,0,0   2   40,67   0,1042
```

Explications
Ici, le format contient 12 colonnes:

6. (`chr1`) le nombre du chromosome (ou du scaffold)
7. (`990`) position extrémale en 5' des lectures chevauchant la jonction
8. (`2099`) position extrémale en 3' des lectures chevauchant la jonction
9. (`JUNC00001560`) nom systématique de la jonction

10. (3) nombre de lectures couvrant la jonction
11. (+) brin
12. (990) même chose que la colonne 2
13. (2099) même chose que la colonne 3
14. (255,0,0) pas important
15. (2) pas important
16. (40,67) taille maximum des lectures couvrant l'exon à gauche et à droite de l'intron.
17. (0,1042) pas important



Pour en savoir plus

- Documentation : http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQformat.html#format1

GTF

Type de fichier

Annotation

Signification du nom

Gene Transfer Format

Qui le génère

Les outils d'annotation

Qui le lit

Les browsers, TopHat

Exemple

```
chr20   example   exon   100   200   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t1";
chr20   example   exon   300   400   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t1";
chr20   example   exon   500   600   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t1";
chr20   example   exon   100   450   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t2";
```

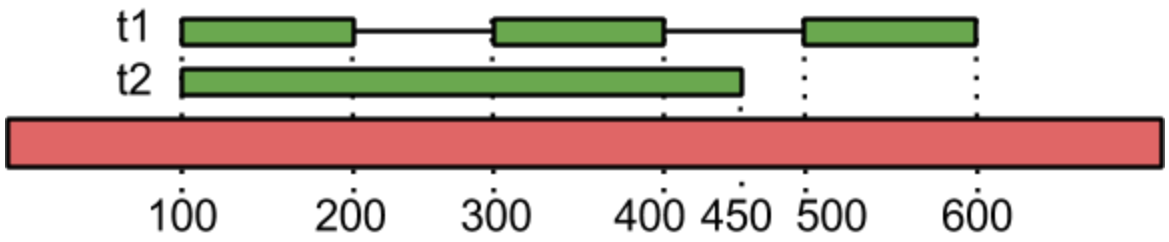
Explications

C'est un autre format tabulé à 9 champs. Chaque exon est noté sur une ligne :

1. (chr20) le chromosome

2. (`example`) la source de l'annotation, habituellement l'outil qui a généré l'annotation
3. (`exon`) le type d'annotation ; nous avons ici des exons, mais cela pourrait des CDS (si l'on s'intéressait aux protéines traduites)
4. (`100`) le début de l'annotation
5. (`200`) la fin de l'annotation
6. (`.`) pas important
7. (+) le brin
8. (`.`) pas important
9. (`gene_id "g1"; transcript_id "t1";`) les attributs, ou champs. C'est un fourre-tout. On peut y trouver le nom usuel du gène.

Le champ 9 indique à quel transcrit et quel gène appartient chaque exon.



Pour en savoir plus

- Documentation : http://mblab.wustl.edu/GTF22.html
- Le format GTF est adapté du format GFF, moins contraint. Documentation du format GFF : http://www.sequenceontology.org/gff3.shtml

---

GFF

Type de fichier

Annotation

Signification du nom

Gene Feature Format

Qui le génère

Les outils d'annotation

Qui le lit

Les browsers

Exemple

```
chr20   example   exon   100   200   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t1";
chr20   example   exon   300   400   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t1";
chr20   example   exon   500   600   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t1";
```

```
chr20   example   exon   100   450   .   +   .   gene_id "g1"; transcript_id "t2";
```

Explications

C'est un autre format tabulé à 9 champs. Chaque exon est noté sur une ligne :

10. (`chr20`) le chromosome
11. (`example`) la source de l'annotation, habituellement l'outil qui a généré l'annotation
12. (`exon`) le type d'annotation ; nous avons ici des exons, mais cela pourrait des CDS (si l'on s'intéressait aux protéines traduites)
13. (`100`) le début de l'annotation
14. (`200`) la fin de l'annotation
15. (`.`) pas important
16. (+) le brin
17. (`.`) pas important
18. (`gene_id "g1"; transcript_id "t1";`) les attributs, ou champs. C'est un fourre-tout. On peut y trouver le nom usuel du gène.

Le champ 9 indique

SAM

Type de fichier

Mapping

Signification du nom

Sequence Alignment/Map

Qui le génère

Les outils de mapping

Qui le lit

Vous, samtools

Exemple

```
@SQ SN:chr1 LN:45
r001  99   chr1  7  30  8M2I4M1D3M =  37 39  TTAGATAAAGGATACTG *
r002  0    chr1  9  30  3S6M1P1I4M *  0  0   AAAAGATAAGGATA    *
r003  0    chr1  9  30  5S6M       *  0  0   GCCTAAGCTAA       * SA:Z:ref,29,-,6H5M,17,0;
r004  0    chr1  16 30  6M14N5M    *  0  0   ATAGCTTCAGC       *
r003  2064 chr1  29 17  6H5M       *  0  0   TAGGC            * SA:Z:ref,9,+,5S6M,30,1;
r001  147  chr1  37 30  9M         =  7  -39 CAGCGGCAT         * NM:i:1
```

Explications

Le format SAM se décompose en deux parties : l'en-tête et le corps.

L'en-tête donne des informations sur le génome ou le sur le mapping. Les lignes d'en-tête commencent toutes par un `@`, suivi de deux lettres. La ligne `@SQ SN:chr1 LN:45` se lit :

- `@`: nous sommes dans un en-tête
- `SQ` : qui a trait à une séquence de référence (les chromomes)
- `SN:chr1` : le nom d'une séquence est chr1
- `LN:45` : sa taille est de 45 pb

Il existe beaucoup de type d'en-tête différents, que nous ne verrons pas.
Le corps est un format tabulé :

1. (`r001`) le nom d'une lecture
2. (`99`) informations binaires sur la lecture. Un unique chiffre enregistre les informations suivantes : fragment mappé ou non, fragment d'un paired-end (ou d'un single-end), premier de la paire, etc. Pour savoir ce que signifie un nombre, il suffit d'aller sur le site http://broadinstitute.github.io/picard/explain-flags.html.
3. (`chr1`) la séquence sur lequel est mappée la lecture; on utilise * si la lecture n'est pas mappée
4. (`7`) position la plus 5' de la lecture
5. (`30`) qualité du mapping, soit $-10 \log_{10}(p)$, où p est la probabilité, estimée par l'outil de mapping, que la lecture soit mappée à la mauvaise place
6. (`8M2I4M1D3M`) format CIGAR de la lecture (cf *infra*)
7. (`=`) séquence sur lequel est mappé l'autre fragment, en cas de paired-end ; on utilise = si le chromosome est le même, et * si la lecture est single-end
8. (`37`) en cas de paired-end, osition la plus 5' de l'autre fragment ; on utilise `0` si l'on est en single-end, si l'autre fragment ne mappe pas, etc.
9. (`39`) en cas de paired-end, taille de la lecture, soit la différence entre la position la plus 5' du fragment 5' et la position la plus 3' du fragment 3'
10. (`TTAGATAAAGGATACTG`) séquence du fragment
11. (`*`) qualité du fragment (similaire au FASTQ) ; on utilise * si on ne souhaite pas renseigner ce champ
12. (`SA:Z:ref,29,-,6H5M,17,0;`) autres informations (cf *infra*)

Voici l'alignement des lectures correspondant au fichier SAM.

```
Coor              11111  11111222222222233333333333444444
         12345678901234  56789012345678901234567890123456
chr1     AGCATGTTAGATAA**GATAGCTGTGCTAGTAGGCAGTCAGCGCCAT

+r001/1        TTAGATAAAGGATA*CTG
+r002         aaaAGATAA*GGATA
+r003       gcctaAGCTAA
+r004                      ATAGCT..............TCAGC
-r003                          ttagctTAGGC
-r001/2                                        CAGCGGCAT
```

Le format CIGAR (Compact Idiosyncratic Gapped Alignment Report).

Il détaille l'alignement d'une lecture sur une séquence de référence. L'alignement est lu de gauche à droite, et retranscrit de manière systématique par une suite de paires (nombre, lettre). Par exemple, le cigar `5M1I5M` se décomposen en :

- `5M` : 5 matches entre le fragment et la séquence
- `1I` : une insertion dans le fragment
- `5M` : 5 autres matches.

Soit, par exemple :

```
read: ACGTAGATCGA
chr1: ACGTA-ATCGA
```

Les lettres possibles sont :

- `M` : un match (**attention**, ce peut-être un SNP, mais pas un indel)
- `I` : insertion par rapport à la référence
- `D` : délétion
- `N` : intron

Il existe d'autres lettres, que nous ne détaillerons pas ici.

Autres informations du champ 12 :

Il s'agit d'un champ fourre-tout où chaque outil de mapping des informations qu'il juge bon d'ajouter. Ces informations ont un formation particulier, du type : `TA:l:valeur`, où:

- `TA` est une paire de lettre décrivant le champ
- `l` une autre lettre (pas important)
- `valeur` la valeur du champ.

Voici quelques champs qui peuvent être intéressants :

- `NM` : nombre de mismatches (en comptant les indels) dans l'alignement
- `AS` : score d'alignement
- `XN`: nombre de bases ambigües
- `XM` : nombre de mismatches (sans compter les indels)
- `XO` : nombre d'ouvertures de gaps
- `X0` : nombre de matches optimaux
- `X1` : nombre de matches sous-optimaux
- `MD` : description des mismatches
- `RG` : description de l'expérience
- `YT` : description du mapping
    - `UU` signifie "single-end"
    - `CP`, la paire s'aligne correctement
    - `DP`, les deux fragments ne sont pas mappés correctement (en cas d'inversion ou de fusion de gènes)
    - `UP`, seul un fragment mappe
- `SA` : autre mapping possible

Il existe beaucoup d'autres tags possibles, qui dépendent des outils de mappings.

Pour en savoir plus

- Documentation officielle du format: http://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf
- Article Bioinformatics présentant le format : http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/25/16/2078.long
- Le format SAM n'est pas destiné à être lu par des programmes. Le format BAM (ci-après) est fait pour cela.

BAM

Type de fichier

Mapping

Signification du nom

Binary sAM

Qui le génère

Les outils de mapping, les samtools

Qui le lit

Les visualisateurs, les outils de traitement de lectures

Explications

Il s'agit simplement du format SAM, binaire (plus facilement lisible pour une machine), et compressé.

BAI

Type de fichier

Index

Signification du nom

BAm Index

Qui le génère

Les samtools

Qui le lit

Les visualisateurs

Explications

Il s'agit d'un fichier binaire qui indexe un fichier BAM. On peut le voir comme une "table des matières", qui servirait aux outils de visualisation afin d'accélérer l'affichage des données contenues dans un fichier BAM (habituellement très gros).

WIG

Type de fichier

Annotation continue sur un génome (comme le GC% ou la densité de lectures)

Signification du nom

De "wiggle", qui désigne une course

Qui le génère

Les outils de peak-calling, entre autres

Qui le lit

Les visualisateurs

Remarque

Le format WIG est un format multi-forme. Les différents exemples suivants donneront une densité de lectures sur le génome.

Exemple 1 (variable)

```
variableStep chrom=chr2
301 3
302 2
304 2
305 3
```

Explications

La première ligne (l'en-tête) décrit le format. `variableStep` indique que l'annotation sera donnée explicitement pour chaque position du génome. `chrom` indique le chromosome.
Les lignes suivantes indiquent :

1. (301) la position sur le chromosome
2. (3) la valeur, ici 3 lectures couvrent la position

Si une position n'apparaît pas (dans l'exemple, la position 303), la valeur par défaut est zéro.
L'en-tête est répété pour chaque chromosome.

Exemple 2 (variable et span)

```
variableStep chrom=chr2 span=5
301 2
306 2.5
```

Explications

Dans l'en-tête, le mot-clef `span` indique que l'information est donnée (moyennée) pour *n* nucléotides (ici, 5).

Exemple 3 (fixed)

```
fixedStep chrom=chr3 start=401 step=100
11
22
33
```

Explications

L'en-tête indique que toutes les valeurs sont maintenant données par pas fixés (ici, `100`), commençant à la position donnée par `start` (ici, `401`). La valeur `11` correspond donc à un nombre moyen entre les positions 401 et 500, etc.
Si le pas (`step`) n'est pas mentionné, il est par défaut de `1`.

Pour en savoir plus

Plusieurs sites décrivent en détail ce format.

- http://genome.ucsc.edu/goldenpath/help/wiggle.html
- http://www.ensembl.org/info/website/upload/wig.html
- https://wiki.nci.nih.gov/display/TCGA/Wiggle+Format+Specification

---

BedGraph

Type de fichier

Annotation continue sur un génome

Signification du nom

Vient du format BED, destiné à être utilisé en visualisation ("graph")

Qui le génère

Les outils de peak-calling, entre autres

Qui le lit

Les visualisateurs

Exemple

```
track type=bedGraph name="BedGraph Format"
chr19 49302000 49302300 -1.0
chr19 49302300 49302600 -0.75
chr19 49302600 49302900 -0.50
chr19 49302900 49303200 -0.25
```

Explications

La première ligne (l'en-tête) décrit le format, et le champ "`type=bedGraph`" est obligatoire. Il existe beaucoup d'autres champs possibles, destinés à l'affichage de l'annotation, non décrits ici.

Les lignes suivantes suivent le format BED :

1. (chr19) le chromosome
2. (`49302000`) la position de début
3. (`49302300`) la position de fin
4. (-1.0) la valeur sur l'intervalle

Pour en savoir plus

- http://genome.ucsc.edu/goldenpath/help/bedgraph.html

BigWig

Type de fichier

Annotation continue sur un génome

Signification du nom

Big Wig

Qui le génère

Les outils de peak-calling, ou le programme wigtobigwig, bedGraphToBigWig

Qui le lit

Les visualisateurs

Explications

Il s'agit d'un fichier binaire qui compresse et indexe un fichier WIG ou BedGraph. Il est donc plus adapté pour des gros fichiers.

Pileup

Type de fichier

Variation de séquence

Signification du nom

“Pile up” signifie “entassement”

Qui le génère

Les outils de base-calling

Qui le lit

Les visualisateurs, les outils de génotypage, vous

Exemple

```
seq1  272  T  24  ,.$....,,.,.,...,,,,..^+. <<<+;<<<<<<<<<<=<;<;7<&
seq1  273  T  23  ,.....,,.,.,...,,,,,..A    <<<;<<<<<<<<3<=<<<;<<+
seq1  274  T  23  ,.$....,,.,.,...,,,,...    7<7;<;<<<<<<<<<=<;<;<<6
seq1  275  A  23  ,$....,,.,.,...,,,,...^l.  <+;9*<<<<<<<<<=<<:;<<<<
seq1  276  G  22  ...T,,.,.,.,...,,,,....     33;+<<7=7<<7<&<<1;<<6<
seq1  277  T  22  ....,,,.,.C.,,,,,,.G.      +7<;<<<<<<<&<=<<:;<<&<
seq1  278  G  23  ....,,.,.,.,...,,,,....^k.  %38*<<;<7<<7<=<<<;<<<<<
seq1  279  C  23  A..T,,.,.,.,...,,,,.....    ;75&<<<<<<<<<=<<<9<<:<<<
```

Explications

Chaque ligne contient 5 ou 6 champs:

1. (`seq1`) la référence ou le chromosome
2. (`272`) la position sur le chromosome
3. (`T`) le nucléotide correspondant à cette position sur le génome de référence
4. (`24`) le nombre de lectures à cette position
5. (`,.$....,,.,.,...,,,,..^+.`) un code correspondant au nucléotide des lectures correspondant à cette position (détaillé ci-après)
6. (optionnel `<<<+;<<<<<<<<<<=<;<;7<&`) la qualité des bases des lectures à cette position (même format que le FASTQ)

Principaux codes :

- `.` (point) : la lecture est sur le brin plus, en accord avec la référence
- `,` (virgule) : la lecture est sur le brin moins, en accord avec la référence
- `ACGTN` : la lecture est sur le brin plus, en désaccord avec la référence, et contient le nucléotide indiqué
- `acgtn` : la lecture est sur le brin moins, en désaccord avec la référence, et contient le nucléotide indiqué

- `+nseq` (exemple `+2AG`) : indique une insertion de *n* nucléotides, correspondant à la séquence `seq` (dans l'exemple, insertion de `AG`).
- `-nseq` (exemple `-2AG`) : indique une suppression de *n* nucléotides, correspondant à la séquence `seq` (dans l'exemple, suppression de `AG`).
- `$` le charactère suivant correspond à la fin de la lecture
- `^n` le charactère suivant correspond au début de la lecture ; le nombre *n* indique la qualité du mapping de la lecture (pas de la base)

Pour en savoir plus

- Page Wikipédia: https://en.wikipedia.org/wiki/Pileup_format

---

VCF

Type de fichier

Variation de séquence

Signification du nom

Variant Call Format

Qui le génère

Les outils de base-calling

Qui le lit

Les visualisateurs, les outils de génotypage, vous

Exemple

```
##fileformat=VCFv4.0
##INFO=<ID=NS,Number=1,Type=Integer,Description="Number of Samples With Data">
##INFO=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Total Depth">
##INFO=<ID=AF,Number=.,Type=Float,Description="Allele Frequency">
##FILTER=<ID=q10,Description="Quality below 10">
##FILTER=<ID=s50,Description="Less than 50% of samples have data">
##FORMAT=<ID=GQ,Number=1,Type=Integer,Description="Genotype Quality">
##FORMAT=<ID=GT,Number=1,Type=String,Description="Genotype">
##FORMAT=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Read Depth">
##FORMAT=<ID=HQ,Number=2,Type=Integer,Description="Haplotype Quality">
#CHROM POS ID  REF ALT  QUAL FILTER INFO                      FORMAT      Sample1        Sample2
2      10  id1 G   A    29   .      NS=2;DP=13;AF=0.5         GT:GQ:DP:HQ 0|0:48:1:52,51
1|0:48:8:51,51
2      20   .  T   A    3    q10    NS=2;DP=12;AF=0.017       GT:GQ:DP:HQ 0|0:46:3:58,50
0|1:3:5:65,3
2      30  id3 A   G,T  67   PASS   NS=2;DP=10;AF=0.333,0.667 GT:GQ:DP:HQ 1|2:21:6:23,27
2|1:2:0:18,2
```

Explications

Ce fichier donne des informations sur les variants trouvés dans un génome. Les lignes d'en-tête sont précédées de ##, notamment :

- `##INFO` : Il décrit les informations que l'on collecte pour chaque variant. L'ensemble des informations possible varie avec l'outil utilisé, et ne sera pas décrit ici. Le format est le suivant.
    - `ID` (`NS`) : L'identifiant que l'on retrouvera dans le fichier.
    - `Number` (`1`) : Le nombre de fois que l'on verra l'identifiant pour chaque variant (le point signifie "un nombre arbitraire").
    - `Type` (`Integer`) : Le type d'information, comme un entier, un mot, etc.
    - `Description` (`Number of Samples with Data`) : Une description de l'information.
- `##FILTER` : L'ensemble des étapes de filtrage utilisées pour générer ce fichier.
    - `ID` (`q10`) : Identifiant du filtrage.
    - `Description` (`Quality below 10`) : Description du filtrage.
- `##FORMAT` : Données du génotypage trouvées pour chaque variant.
    - ID (GQ) : Identifiant du génotypage.
    - Number (1) : Le nombre de fois que l'on verra cette donnée pour chaque variant.
    - Type (Integer) : Le type d'information, comme un entier, un mot, etc.
    - `Description` (`Genotype Quality`) : Une description du génotypage.

Chaque ligne contient au moins 10 champs. Les champs 10 et plus décrivent les génotypages dans les différents échantillons.

1. (`2`) le chromosome
2. (`10`) la position sur le chromosome
3. (`id1`) l'identifiant du variant
4. (`G`) variant sur la référence
5. (`A`) variant sur les lectures
6. (`29`) score de qualité sur le variant (score Phred)
7. (`.`) filtres passés : `PASS` si tous les filtres sont passés ; un point si aucun n'est passé ; sinon on énumère la liste des filtres qui sont passés (tels que définis par les en-tête `##FILTER`), séparés par un point-virgule.
8. (`NS=2;DP=13;AF=0.5`) Informations sur le variant, qui utilise la nomenclature définie dans les en-tête `##INFO`. Ici, il s'agit qu'un variant que l'on observe dans les 2 échantillons, avec une profondeur de 13 lectures, et une fréquence de 50%.
9. (`GT:GQ:DP:HQ`) Format des données de génotypages pour chaque échantillon, séparés par des "deux-points".
10. (`0|0:48:1:52,51`) Données de génotypage pour l'échantillon 1. Ici, nous avons le génotypage (GG), qualité du génotypage (score Phred), profondeur de séquençage (une lecture), qualité des haplotypes (un score Phred par haplotype).
11. et suivant Données de génotypage pour l'échantillon *n*.

Pour en savoir plus

- Définition du format: https://samtools.github.io/hts-specs/VCFv4.2.pdf