

Recherche de similarités au moyen de BLAST

Guy Perrière

Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive

UMR CNRS 5558

Université Claude Bernard – Lyon 1

<http://pbil.univ-lyon1.fr/members/perriere/cours/M1/>

Objectifs poursuivis

- Comparaison de séquences biologiques :
 - Identification d'homologues.
 - Recherche de contraintes fonctionnelles.
 - Prédiction de structure (ARN, protéine).
 - Prédiction de fonction.
 - Reconstitution des relations évolutives entre séquences (phylogénie).
 - Assemblage de lectures (séquençage).

Homologie ou similarité ?

- La phylogénie moléculaire se base sur l'utilisation de gènes homologues :
 - Deux séquences sont dites homologues si elles possèdent un ancêtre commun.
 - L'existence d'un ancêtre commun est inférée à partir de la similarité.
 - Seuil pour les protéines :
 - 30 % d'identité sur une longueur de 100 AA \Rightarrow homologie entre les séquences.

Similarité sans homologie

- La similarité n'est pas toujours due à de l'homologie :
 - Convergence ou simple hasard pour de courtes séquences (quelques résidus).
 - Existence de régions de faible complexité (*e.g.*, cas de la fibroïne – AAF76983.1) :
 - Présentes dans 40 % des protéines.
 - Peuvent représenter jusqu'à 15 % du total des résidus (Ala, Gly, Pro, Ser, Glu et Gln).

Homologie sans similarité

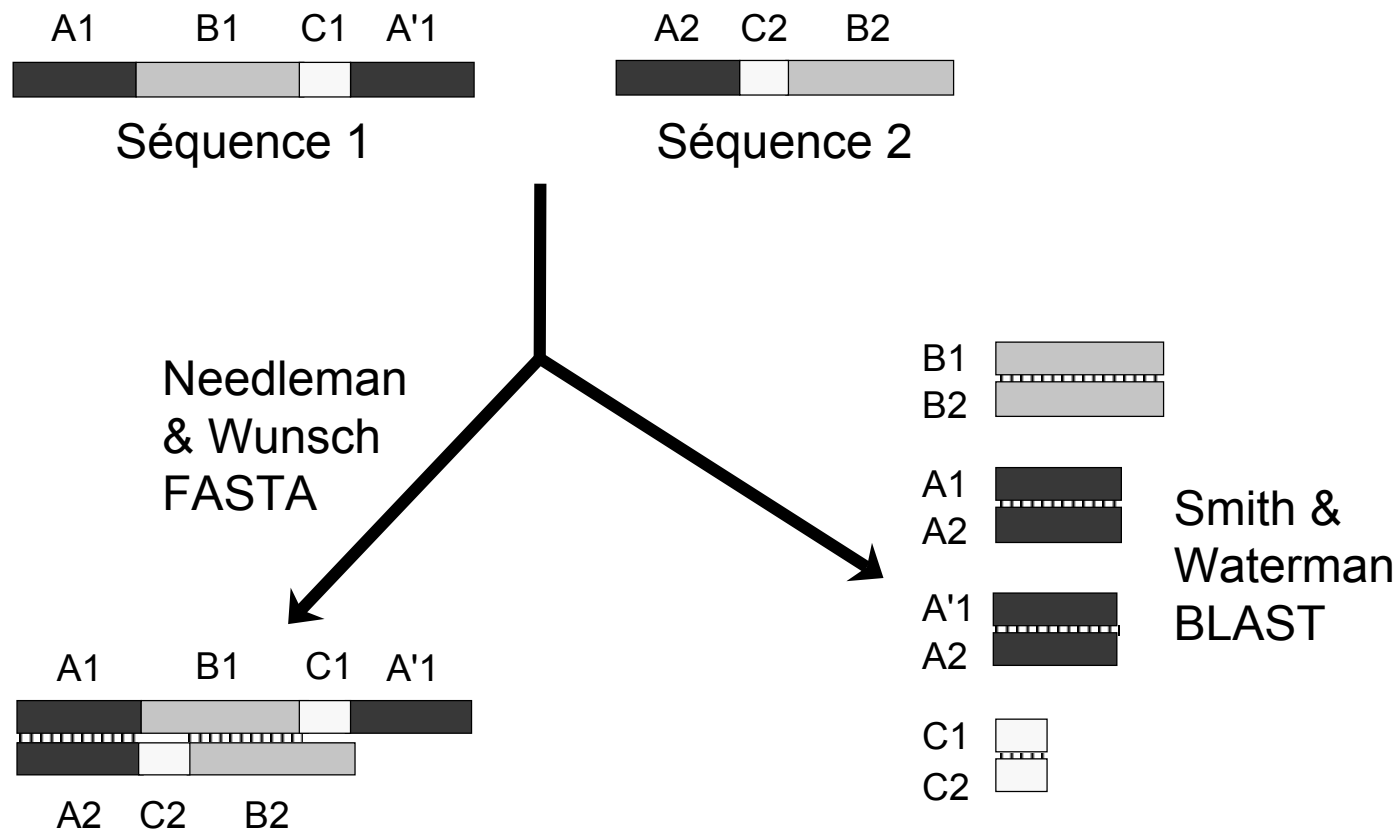
- Deux séquences peuvent être homologues sans que leur similarité soit forte :

```
ACP_KLEAE  ---MEMKIDALAGTLESSDVMVRIGPAAQPGIQLEIDSIVKQEFGAAIQQVVRETLAQLG
ACP_ECOLI  STIEERVKKIIGEQLGVKQEEVTDN--ASFVEDLGADSLDTVELVMALEEEFDTEIPDEE
           *   :   :   *   :   *   *   :*  **:   *   *:::   :   :::

ACP_KLEAE  VKECDNVQLARVQAAALRWQQ
ACP_ECOLI  AEKITTVQAAIDYINGHQA--
           ::   ** *   :   :
```

La similarité entre ces protéines est faible mais les données fonctionnelles et biochimiques montrent qu'elles sont homologues.

Alignement global et local



Représentation

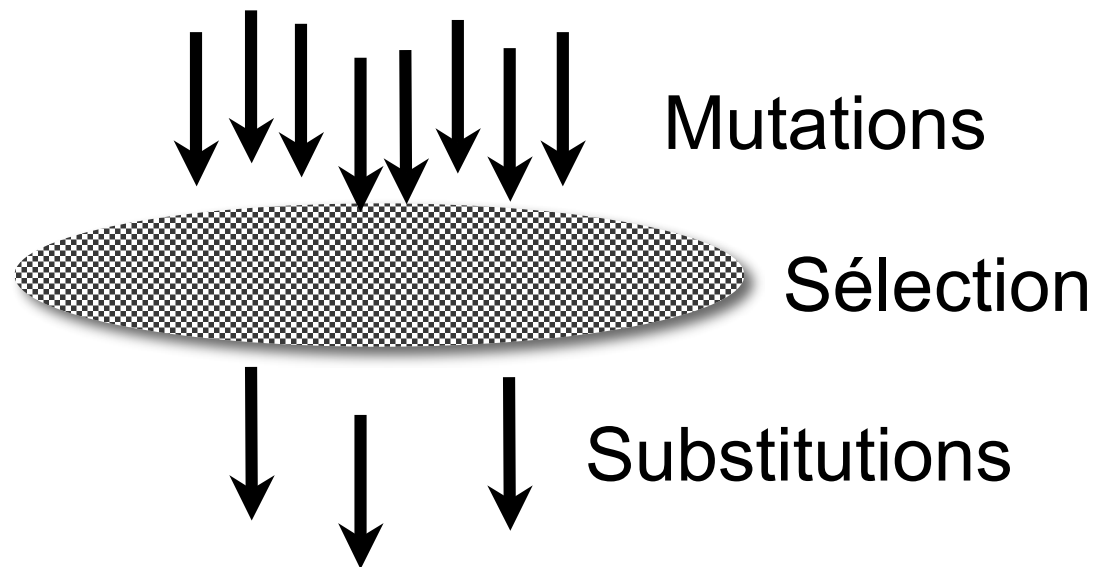
- Les résidus (nucléotides, acides aminés) sont superposés de façon à maximiser les identités entre les séquences :

G	T	T	A	A	G	G	C	G	-	G	G	A	A	A
G	T	T	-	-	-	G	C	G	A	G	G	A	C	A
*	*	*				*	*	*		*	*	*		*

- Il existe deux sortes de différences :
 - Substitutions (*mismatches*).
 - Insertions et délétions (*indels* ou *gaps*).

Mutations et substitutions

- Les différences observées dans un alignement correspondent aux substitutions :
 - Mutations ayant passé le filtre de la sélection :
 - Mutations neutres (*i.e.*, sans effet sur le phénotype) ou avantageuses du point de vue sélectif.



Quel est le bon alignement ?

G T T A C G A
G T T - G G A
* * * * *

ou

G T T A C - G A
G T T - - G G A
* * * * *

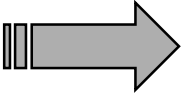
G T T A C G A
G T T G - G A
* * * * *

- Pour le biologiste, le bon alignement est celui qui représente le scénario évolutif le plus probable.
- Autres choix possibles (*e.g.*, assemblage de lectures).

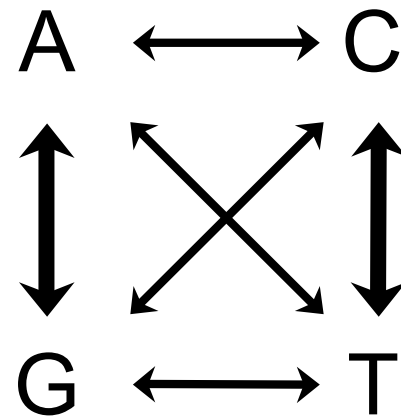
Fonction de score de similarité

G	T	T	A	A	G	G	C	G	-	G	G	A	A	A
G	T	T	-	-	-	G	C	G	A	G	G	A	C	A
*	*	*				*	*	*		*	*	*		*

$$\text{Score} = \sum \text{identités} - \sum \text{différences}$$

Identité	= +1	}		Score = 10 - 4 = 6
Substitution	= 0			
Gap	= -1			

Modèle d'évolution



$\mathbb{P}(\text{transition}) > \mathbb{P}(\text{transversion})$

G	T	T	A	C	G	A		G	T	T	A	C	G	A
G	T	T	G	-	G	A	>	G	T	T	-	G	G	A
*	*	*	:		*	*		*	*	*			*	*

Matrice de substitution

A	1			
C	0	1		
G	0,5	0	1	
T	0	0,5	0	1
	A	C	G	T

$$s(A, A) = 1.0$$

$$s(A, G) = 0.5$$

$$s(A, -) = -1$$

G	T	T	A	C	G	A
G	T	T	-	G	G	A
1	1	1	-1	0	1	1

Score = 4

<

G	T	T	A	C	G	A
G	T	T	G	-	G	A
1	1	1	.5	-1	1	1

Score = 4,5

Le cas des acides aminés

- Plus difficile à modéliser que celui des séquences nucléotidiques :
 - Un acide aminé peut être remplacé par un autre de différentes façons (code génétique) :
 - La probabilité des substitutions au niveau nucléotidique diffère suivant les codons :
$$\mathbb{P}(\text{AAU}_{\text{Asn}} \rightarrow \text{GAU}_{\text{Asp}}) > \mathbb{P}(\text{AAU}_{\text{Asn}} \rightarrow \text{CAU}_{\text{His}})$$
 - Certaines substitutions peuvent avoir plus ou moins d'effet sur la fonction des protéines.
 - Utilisation de nombreux critères :
 - Code génétique, propriétés physico-chimiques, hypothèses sur les processus évolutifs.

Premiers modèles utilisés

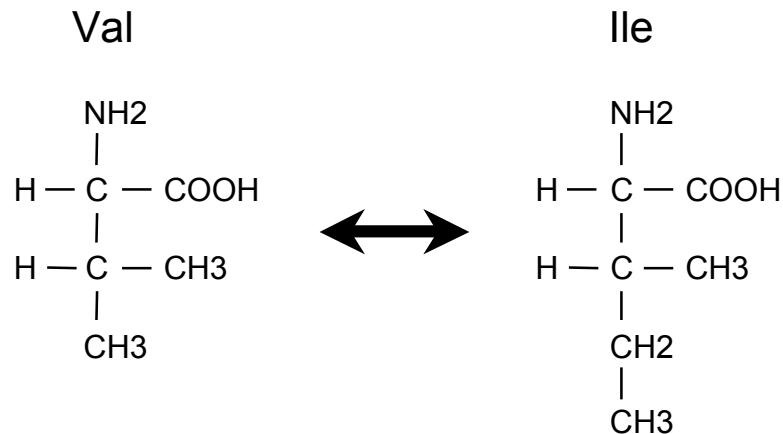
- Code génétique (Fitch, 1966) :

Asp (GAC, GAU) → Tyr (UAC, UAU) 1 mutation
Asp (GAC, GAU) → Cys (UGC, UGU) 2 mutations
Asp (GAC, GAU) → Trp (UGG) 3 mutations

- Propriétés physico-chimiques des acides aminés :

- Acidité, polarité, hydrophobicité, etc.

Substitutions
conservatrices



Modèles empiriques

- Matrices fondées sur des alignements de domaines conservés :
 - BLOSUM (Henikoff et Henikoff, 1992).
- Matrices fondées sur des arbres construits par maximum de parcimonie :
 - PAM (Dayhoff *et al.*, 1978).
 - JTT (Jones *et al.*, 1992).
- Matrices fondées sur des arbres construits par maximum de vraisemblance :
 - WAG (Whelan et Goldman, 2001).
 - LG (Le et Gascuel, 2008)

Matrices BLOSUM

- BLOSUM (*Blocks Substitution Matrices*) :
 - Utilisation de ~2000 domaines conservés provenant de ~500 familles de protéines.
 - Alignement de ces domaines :
 - Utilisation de la matrice identité pour effectuer l'alignement.
 - Alignements sans *gaps*.
 - Ensemble de matrices créées à partir de domaines comprenant des séquences \pm divergentes :
 - Toutes les paires ayant servi à construire une matrice BLOSUM k ont une identité \geq à k %.
 - Matrices bien adaptées pour des protéines distantes du point de vue évolutif.

Matrice BLOSUM62

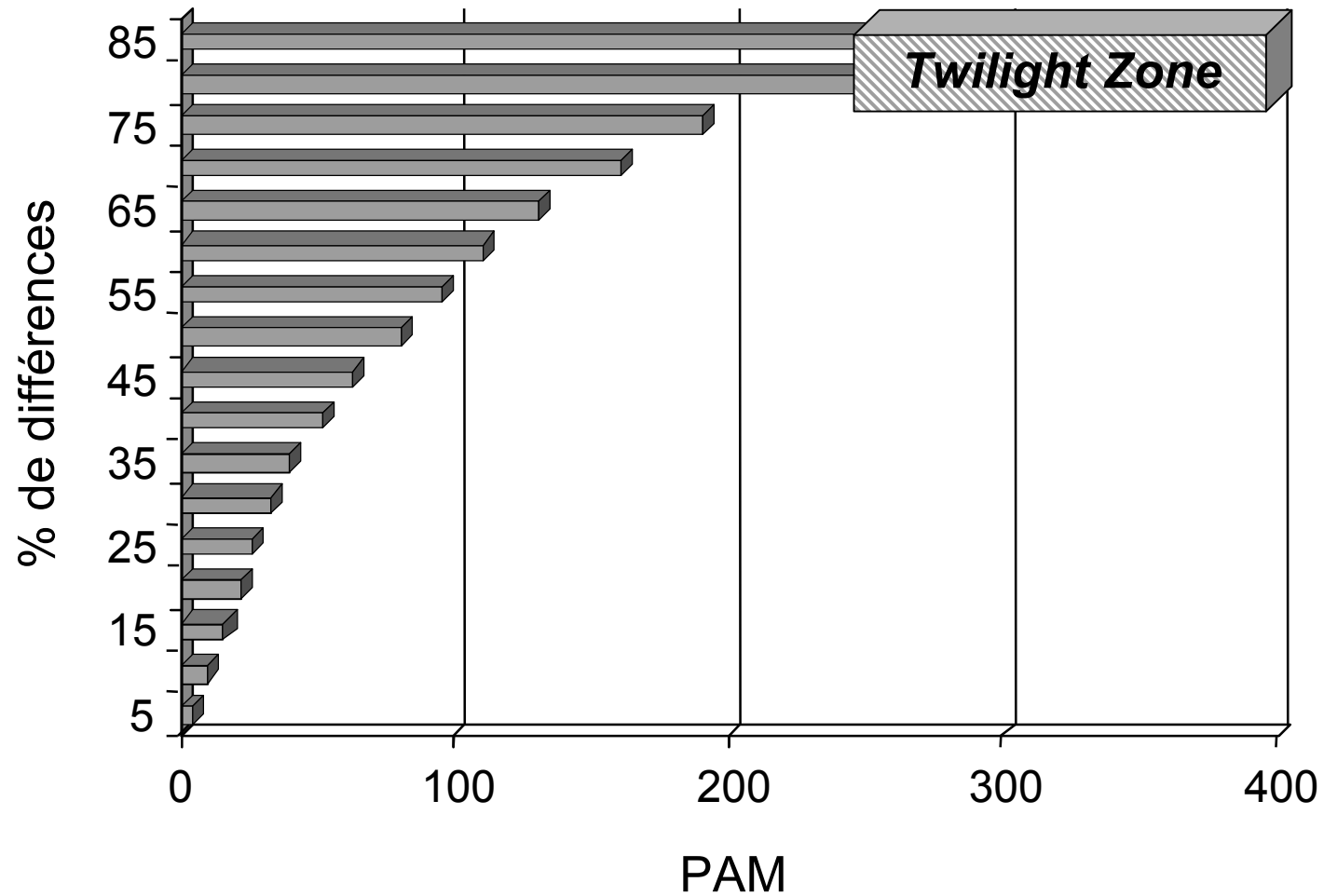
C	9																			C	sulphydryle
S	-1	4																		S	
T	-1	1	5																	T	
P	-3	-1	-1	7																P	petit hydrophile
A	0	1	0	-1	4															A	
G	-3	0	-2	-2	0	6														G	
N	-3	1	0	-2	-2	0	6													N	
D	-3	0	-1	-1	-2	-1	1	6												D	acide, acide-amide
E	-4	0	-1	-1	-1	-2	0	2	5											E	et hydrophile
Q	-3	0	-1	-1	-1	-2	0	0	2	5										Q	
H	-3	-1	-2	-2	-2	-2	1	-1	0	0	8									H	
R	-3	-1	-1	-2	-1	-2	0	-2	0	1	0	5								R	basique
K	-3	0	-1	-1	-1	-2	0	-1	1	1	-1	2	5							K	
M	-1	-1	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	0	-2	-1	-1	5						M	
I	-1	-2	-1	-3	-1	-4	-3	-3	-3	-3	-3	-3	1	4						I	petit hydrophobe
L	-1	-2	-1	-3	-1	-4	-3	-4	-3	-2	-3	-2	2	2	4					L	
V	-1	-2	0	-2	0	-3	-3	-3	-2	-2	-3	-3	-2	1	3	1	4			V	
F	-2	-2	-2	-4	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-1	-3	-3	0	0	0	-1	6		F	
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-3	-2	-3	-2	-1	2	-2	-2	-1	-1	-1	-1	3	7	Y	aromatique
W	-2	-3	-2	-4	-3	-2	-4	-4	-3	-2	-2	-3	-3	-1	-3	-2	-3	1	2	11	W
	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	

Les critères évolutifs recourent les critères physico-chimiques

Matrices PAM et JTT

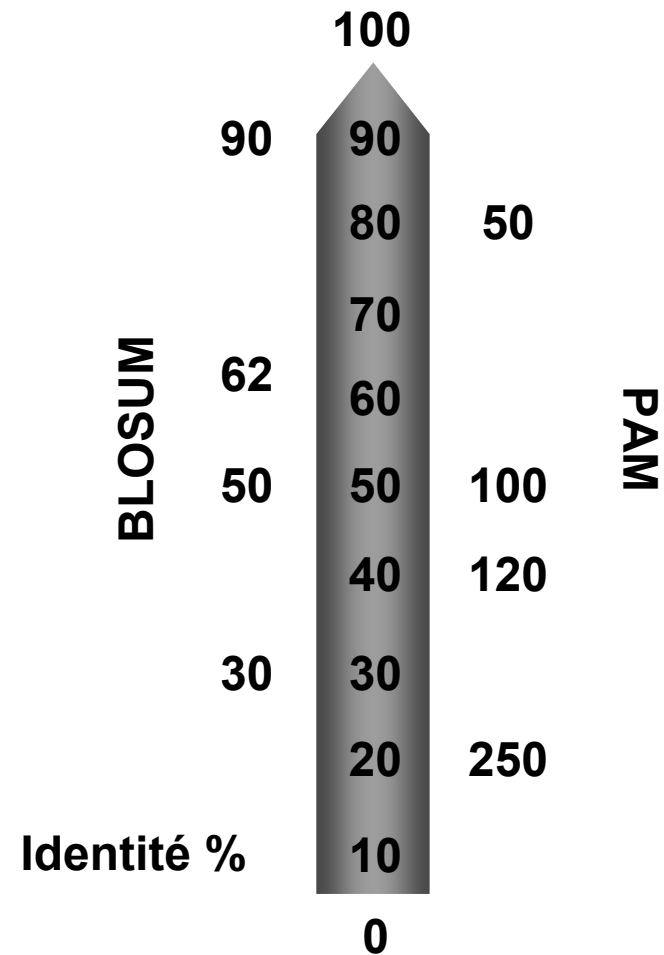
- Alignements globaux :
 - Utilisation de la matrice identité.
 - Pas de prise en compte des *gaps* dans les alignements.
- PAM (*Point Accepted Mutation*) :
 - 71 familles de gènes correspondant à 1300 séquences pour un total de 1572 substitutions.
- JTT (*Jones, Taylor and Thornton*) :
 - 16 300 protéines pour un total de 59 190 substitutions.

Seuil pour les matrices PAM

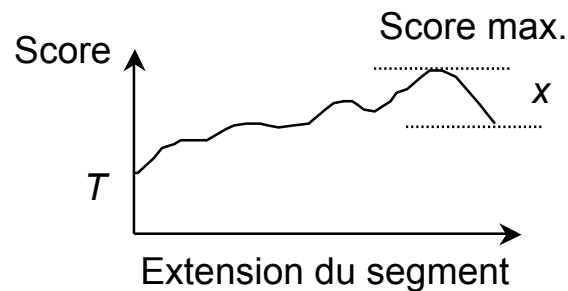
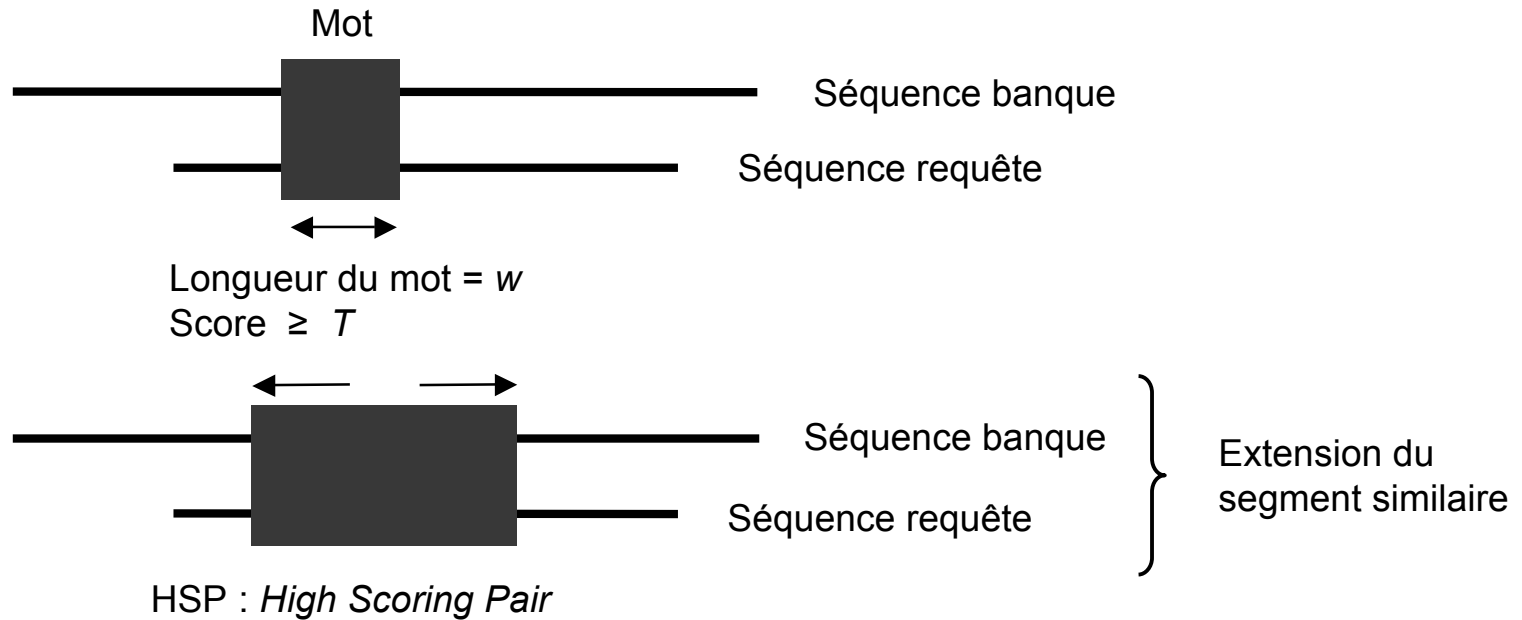


Choix d'une matrice

- Pas de matrice idéale.
- Meilleurs résultats avec les matrices construites avec un plus grand nombre de séquences.
- Structure des protéines (globulaires ou membranaires).
- Degré de similarité des séquences.
- Il est recommandé d'expérimenter !



BLAST : principe général

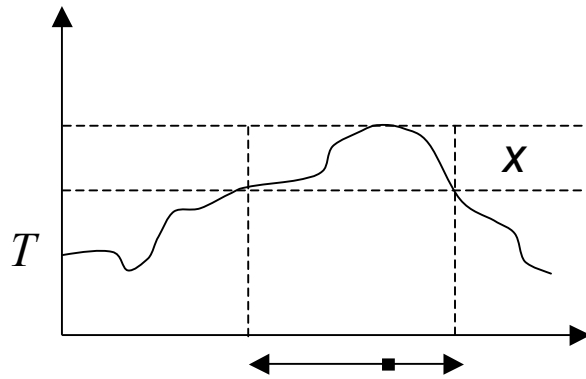


Extension stoppée quand :

- la fin d'une des deux séquences est atteinte
- score ≤ 0
- score $\leq \text{score_max} - x$

Exemple

S L A A L L N K C K T P Q G Q R L V N Q W



Liste
de mots
voisins

P	Q	G	18
P	E	G	15
P	R	G	14
P	K	G	14
P	N	G	13
P	D	G	13
P	H	G	13
P	M	G	13
P	S	G	13
P	Q	A	12
P	Q	N	12
...			

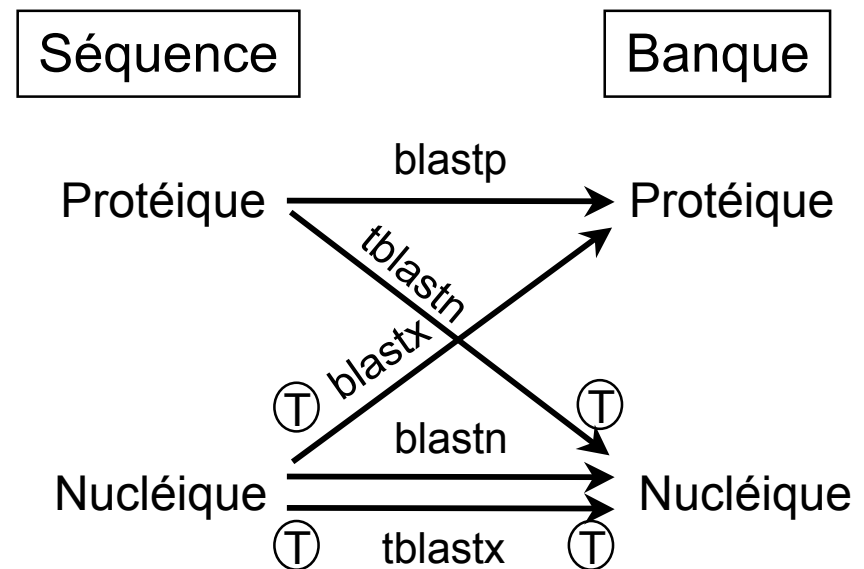
$$\begin{cases} s(P, P) = 7 \\ s(Q, R) = 1 \\ s(G, G) = 6 \end{cases}$$

Score seuil $T = 13$

Query : 325 S L A A L L N K C K T P Q G Q R L V N Q W 345
 + L A + + L + T P G R + + + W
 Sbjct : 290 T L A S V L D C T V T P M G S R M L K R W 310

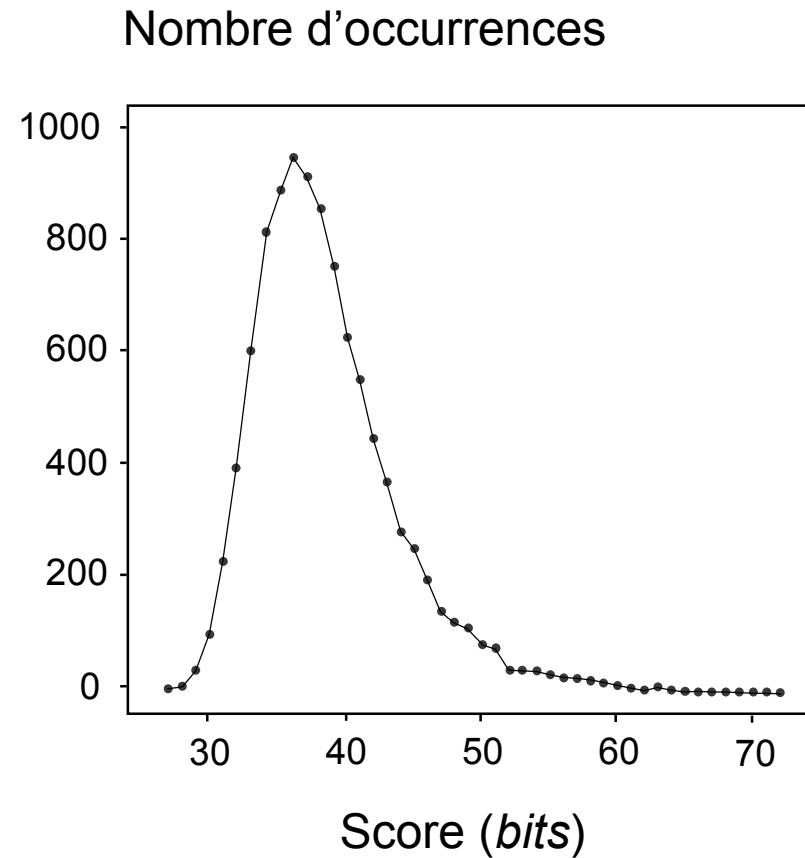
Versions de BLAST

- `blastp` : protéine *vs.* protéine.
- `blastn` : utile pour le non-codant.
- `blastx` : séquences codantes non identifiées.
- `tblastn` : homologues dans un génome non complètement annoté.



Évaluation statistique

- Similarités détectées :
 - Relations significatives.
 - Similarités dues au hasard.
- Fonction de score :
 - Mesure sous la forme :
 - D'une espérance mathématique (*E-value*).
 - Valeur en *bits*.
 - Basée sur une distribution calculée à partir séquences non homologues.
 - Les scores dépendent de la taille de la banque.



E-value, bits et similarité

- Soit E , l'espérance mathématique d'avoir une similarité \geq au score S observé :

$$E = Kmn e^{-\lambda S}$$

Avec m et n les tailles *effectives* de la séquence requête et de la banque, et K et λ deux paramètres dérivés de la distribution précédente.

- Le score en *bits* S' est donné par :

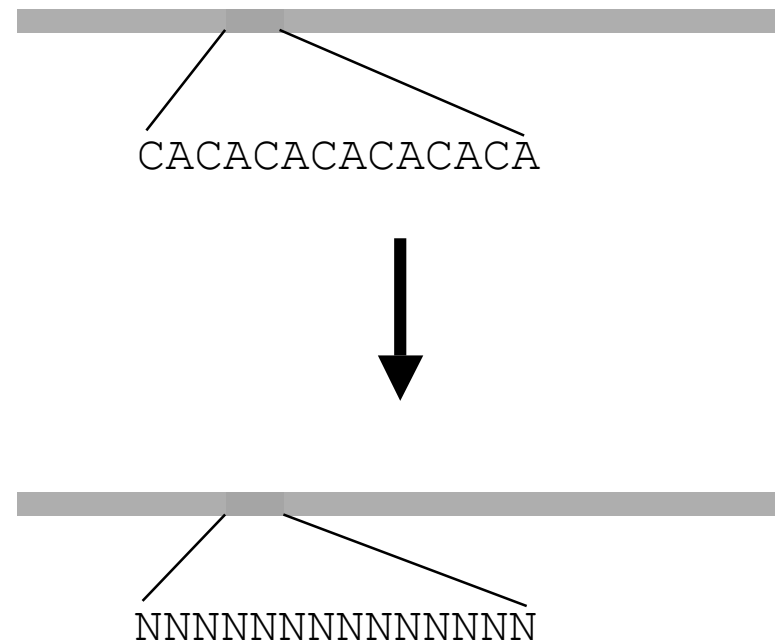
$$S' = [\lambda S - \ln(K)] / \ln(2)$$

- La relation entre E et S' est donc donnée par :

$$E = mn 2^{-S'}$$

Séquences abondantes

- Immunoglobulines :
 - > 42 000 séquences dans GenBank.
- Séquences répétées :
 - 10^6 Alu et 10^5 L1 dans le génome humain.
- Programmes de masquage :
 - DUST, SEG, Repeat Masker.



Serveurs BLAST

- Il existe un grand nombre de serveurs permettant d'effectuer des recherches BLAST mais...
 - Toutes les options ne sont pas toujours accessibles.
 - Peu sont exhaustifs du point de vue des banques.
 - Tous ne permettent pas d'accéder à des banques mises à jour quotidiennement.
 - Les possibilités de filtrage pré- ou post-recherche sont rares et limitées.
 - Généralement pas de liens directs avec d'autres applications (*e.g.*, alignements multiples).

BLAST au NCBI

- Répond à (presque) toutes les questions précédentes.
- Est particulièrement rapide.
- Bénéficie d'une interface graphique de visualisation des résultats.
- Mais...
 - Est de ce fait très sollicité !
 - Toujours pas de tuyauterie vers l'étape suivante (construction d'un alignement multiple).

BLAST au NCBI (1)

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface with the following sections and annotations:

- Enter Query Sequence:** A text area containing a FASTA sequence for Interleukin-1. An arrow points to this area with the label "Séquence requête".
- Job Title:** A text field containing "Interleukin-1".
- Choose Search Set:** A dropdown menu showing "Non-redundant protein sequences (nr)". An arrow points to this dropdown with the label "Choix de la base de données".
- Program Selection:** Radio buttons for "blastp (protein-protein BLAST)", "PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)", and "PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)". An arrow points to the "blastp" option with the label "Choix de l'algorithme".
- BLAST:** A button labeled "BLAST" and a checkbox for "Show results in a new window". An arrow points to the "BLAST" button with the label "Paramètres".
- Algorithm parameters:** A link at the bottom left to view parameters.
- Note:** A note at the bottom right stating "Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow".

Séquence requête

Choix de la base de données

Choix de l'algorithme

Paramètres

BLAST au NCBI (2)

Algorithm parameters Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

General Parameters

Max target sequences Select the maximum number of aligned sequences to display

Short queries Automatically adjust parameters for short input sequences

Expect threshold

Word size

Scoring Parameters

Matrix

Gap Costs

Compositional adjustments

Filters and Masking

Filter Low complexity regions

Mask Mask for lookup table only
 Mask lower case letters

BLAST Search database nr using Blastp (protein-protein BLAST)
 Show results in a new window

Nb. maximum de séquences à visualiser

E-value limite

Taille du mot

Choix de la matrice

Pénalités des *gaps*

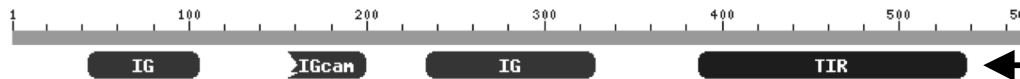
Filtrage (séquences de faible complexité)

BLAST au NCBI (3)

Job Title: Interleukin-1

[▼ Show Conserved Domains](#)

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.



Domaines
conservés

BLASTP 2.2.16 (Mar-25-2007)

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Reference:

Schäffer, Alejandro A., L. Aravind, Thomas L. Madden, Sergei Shavirin, John L. Spouge, Yuri I. Wolf, Eugene V. Koonin, and Stephen F. Altschul (2001), "Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements", *Nucleic Acids Res.* 29:2994-3005.

RID: 6P3FH4UM012

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
5,035,465 sequences; 1,742,204,576 total letters

Banque de
données

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#) [Taxonomy reports](#)

Résultats
par taxon

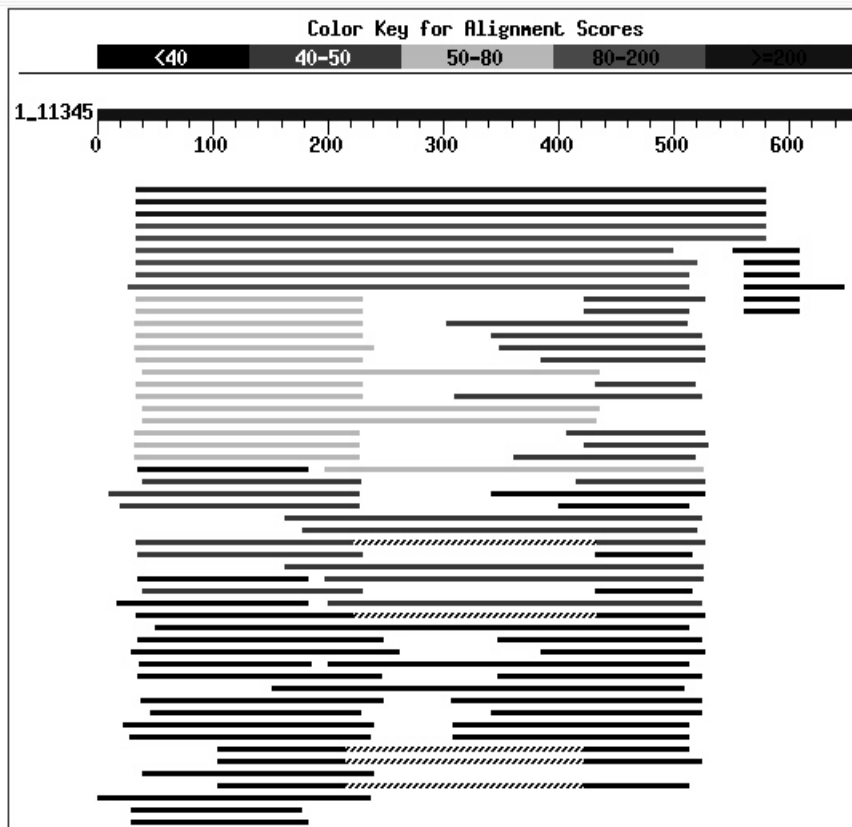
Query= Interleukin-1
Length=569

BLAST au NCBI (4)

Distribution of 134 Blast Hits on the Query Sequence

Nombres de *hits*

Mouse-over to show defline and scores. Click to show alignments



Répartition des *hits*
en fonction du score

BLAST au NCBI (5)

[Distance tree of results](#) [NEW](#) [Related Structures](#)

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
ref NP_000868.1 interleukin 1 receptor, type I precursor [Ho...	1189	0.0
gb AAH67508.1 Interleukin 1 receptor, type I [Homo sapiens]	1185	0.0
gb AAH67507.1 Interleukin 1 receptor, type I [Homo sapiens]	1181	0.0
ref XP_001107510.1 PREDICTED: interleukin 1 receptor, type I [M	1147	0.0
ref XP_001162875.1 PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [P	1144	0.0
gb AAR88996.1 interleukin-1 receptor type I precursor [Macaca f	1130	0.0
ref XP_538449.2 PREDICTED: similar to Interleukin-1 receptor...	932	0.0
ref NP_001075263.1 interleukin 1 receptor, type I [Equus cab...	923	0.0
emb CAH90532.1 hypothetical protein [Pongo pygmaeus]	908	0.0
ref XP_593695.3 PREDICTED: hypothetical protein [Bos taurus]	852	0.0
ref NP_032388.1 interleukin 1 receptor, type I [Mus musculus...	837	0.0
dbj BAC33372.1 unnamed protein product [Mus musculus]	837	0.0
dbj BAC35666.1 unnamed protein product [Mus musculus]	835	0.0
ref NP_037255.2 interleukin 1 receptor, type I [Rattus norve...	825	0.0
dbj BAF34664.1 interleukin 1 bete receptor type 1 long trans...	825	0.0
sp Q02955 IL1R1_RAT Interleukin-1 receptor type I precursor (...	825	0.0
dbj BAF34665.1 interleukin 1 beta receptor type 1 short tran...	825	0.0
ref XP_001162910.1 PREDICTED: hypothetical protein isoform 2...	799	0.0
dbj BAF34663.1 interleukin 1 beta receptor type 1 soluble fo...	747	0.0
pdb 1IRA Y Chain Y, Complex Of The Interleukin-1 Receptor Wit...	675	0.0
pdb 1ITB B Chain B, Type-1 Interleukin-1 Receptor Complexed W...	666	0.0
pdb 1GOY R Chain R, Il-1 Receptor Type 1 Complexed With Antag...	661	0.0
emb CAH93030.1 hypothetical protein [Pongo pygmaeus]	620	6e-176
ref XP_001371210.1 PREDICTED: similar to interleukin-1 recep...	562	2e-158
ref NP_990816.1 interleukin 1 receptor, type I [Gallus gallu...	442	4e-122
gb AAA50243.1 soluble IL-1 receptor type I	410	1e-112
ref NP_573456.1 interleukin 1 receptor-like 2 [Mus musculus]...	395	3e-108
gb EDL14573.1 interleukin 1 receptor-like 2, isoform CRA_a [Mus	395	3e-108

Séquences
similaires

BLAST au NCBI (6)

Alignments

Get selected sequences | Select all | Deselect all | Distance tree of results

>| gb|AAH67508.1| **UG** Interleukin 1 receptor, type I [Homo sapiens]
Length=569

Score = 1185 bits (1065), Expect = 0.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 567/569 (99%), Positives = 567/569 (99%), Gaps = 0/569 (0%)

Query	1	MKVLLRLICFIALLISSLEADKCKEREKIIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGTTITWYKD	60
		MKVLLRLICFIALLISSLEADKCKEREKIIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGTTITWYKD	
Sbjct	1	MKVLLRLICFIALLISSLEADKCKEREKIIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGTTITWYKD	60
Query	61	DSKTPVSTEQASRIHQHKEKLFVPAKVEDSGHYICVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNL	120
		DSKTPVSTEQASRIHQHKEKLFVPAKVEDSGHYICVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNL	
Sbjct	61	DSKTPVSTEQASRIHQHKEKLFVPAKVEDSGHYICVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNL	120
Query	121	CYNAQAIFKQKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWKDCKPLLLDNIHFSGVKDR	180
		CYNAQAIFKQ LPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWKDCKPLLLDNIHFSGVKDR	
Sbjct	121	CYNAQAIFKQKLPVAGDGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWKDCKPLLLDNIHFSGVKDR	180
Query	181	LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLGKQYPI TRVIEFITLEENKPTRPVIIVSPANETMEVDL	240
		LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLGKQYPI TRVIEFITLEENKPTRPVIIVSPANETMEVDL	
Sbjct	181	LIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLGKQYPI TRVIEFITLEENKPTRPVIIVSPANETMEVDL	240
Query	241	GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVI DEDDPVLGEDIYSVENPANKRRSTLITVNLISE	300
		GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVI DEDDPVLGEDIYSVENPANKRRSTLITVNLISE	
Sbjct	241	GSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVI DEDDPVLGEDIYSVENPANKRRSTLITVNLISE	300
Query	301	IESRFYKHPFTCFAKNTHGIDAAYIQLIYPVTNFQKHMIGICVTLTVIIVCSVFIYKIFK	360
		IESRFYKHPFTCFAKNTHGIDAAYIQLIYPVTNFQKHMIGICVTLTVIIVCSVFIYKIFK	
Sbjct	301	IESRFYKHPFTCFAKNTHGIDAAYIQLIYPVTNFQKHMIGICVTLTVIIVCSVFIYKIFK	360
Query	361	IDIVLWYRDSCYDFLPIKASDGKTYDAYILYPKTVGEGSTSDCDIFVFKVLPVLEKQCG	420
		IDIVLWYRDSCYDFLPIKASDGKTYDAYILYPKTVGEGSTSDCDIFVFKVLPVLEKQCG	
Sbjct	361	IDIVLWYRDSCYDFLPIKASDGKTYDAYILYPKTVGEGSTSDCDIFVFKVLPVLEKQCG	420

Récupération
des séquences

Liens vers des
banques NCBI

Quelle approche adopter ?

- Choix d'un algorithme.
- Choix de la matrice de substitution.
- Pondération des *gaps*.
- Stratégie de recherche (nucléique ou protéique).
- Traitement du bruit de fond.
- Banque sur laquelle effectuer la recherche.
- Répétition de la recherche.

Du bon usage de BLAST

- L'annotation par similarité peut conduire à certains abus...

```
MZEORFG      ILNSPDRACNLAKQAFDEAISELDSLGEESYKDSTLIMQLLXDNLTTLWTSDTNEDGGDE
BOV1433P     IQNAPEQACLLAKQAFDDAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSQQDEEAGE
* * * : . ** ***** : ** * * . * * : ***** ***** * * * * * *
```

Score = 87.4 bits (213), Expect = 1e-17
Identities = 41/59 (69%), Positives = 50/59 (84%)

```
LOCUS      BOV1433P      1696 bp      mRNA      MAM      26-APR-1993
DEFINITION Bovine brain-specific 14-3-3 protein eta chain mRNA, complete
            cds.
```

```
LOCUS      MZEORFG      187 bp      mRNA      PLN      31-MAY-1994
DEFINITION Zea mays putative brain specific 14-3-3 protein, tau protein
            homolog mRNA, partial cds.
```

Exercice d'application

- Récupérer la séquence P04118 au format Fasta sur le serveur du NCBI.
- Déterminer quels sont les homologues de cette séquence au moyen de BLAST :
 - Utilisation de la banque RefSeq.
 - Paramètre *Max target sequences* à 1000.
- Sachant que la colipase est d'origine pancréatique, que pensez-vous des résultats obtenus.