# Support de cours
# Introduction à la phylogénie

# Introduction

**Phylogénie** : reconstruire l'histoire évolutive des espèces. Trouver des liens de parenté.

**Evolution moléculaire** : étude de la modification du génotype causée par les mutations et qui peuvent parfois être visibles au niveau du phénotype.

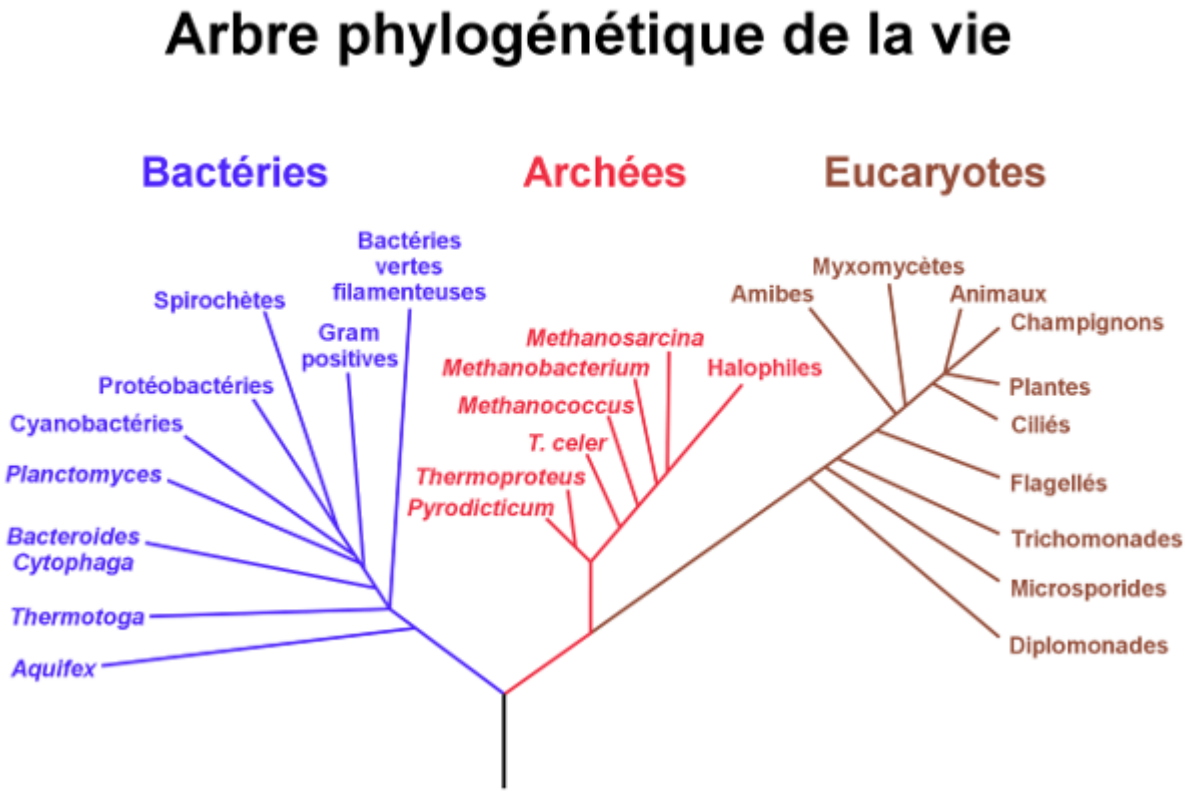
Reconstruction d'arbres phylogénétiques en comparant l'information génétique présente dans le génome des êtres vivants.

Discipline relativement récente : années 1960 avec l'apparition des premières séquences.

Apport important pour la reconstruction de l'arbre du vivant car avant utilisation de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, au pouvoir de résolution plus faible notamment pour les micro-organismes.

# Introduction

Découverte du troisième domaine du vivant par Carl Woese en 1977 par l'analyse phylogénétique des séquences d'ARNr 16S.




*Extrait de L'évolution du vivant expliquée à ma boulangère (2009) Virginie Nepoux (http://www.ilv-bibliotheca.net/librairie/levolution_du_vivant_expliquee_a_ma_boulangere.html).*

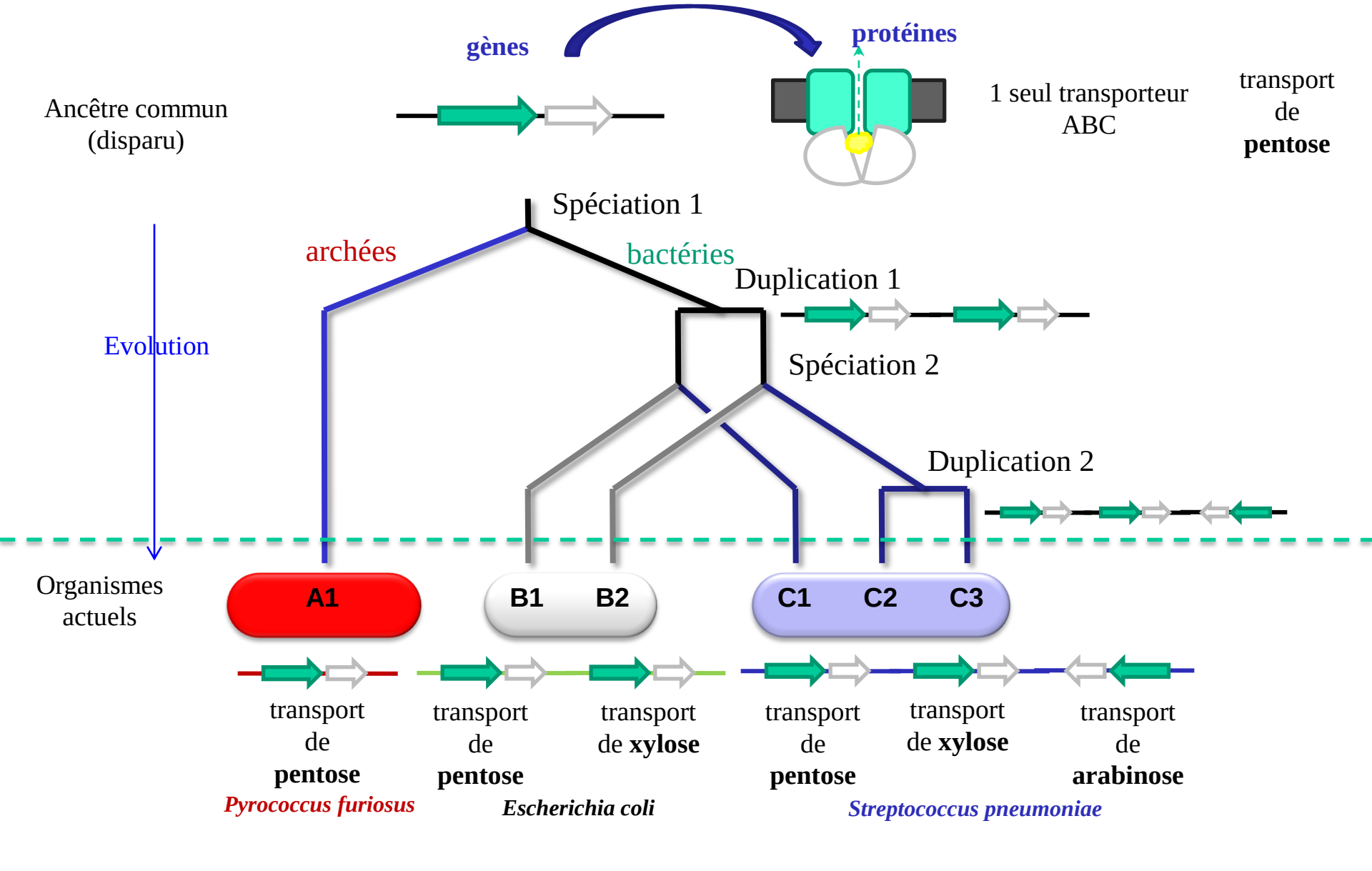
# Introduction

Aujourd'hui l'évolution moléculaire utilisée non seulement par les spécialistes de la phylogénie mais aussi par de nombreux biologistes désirant mieux analyser leurs séquences, comprendre l'évolution de leur fonction, analyser l'histoire des duplications etc….

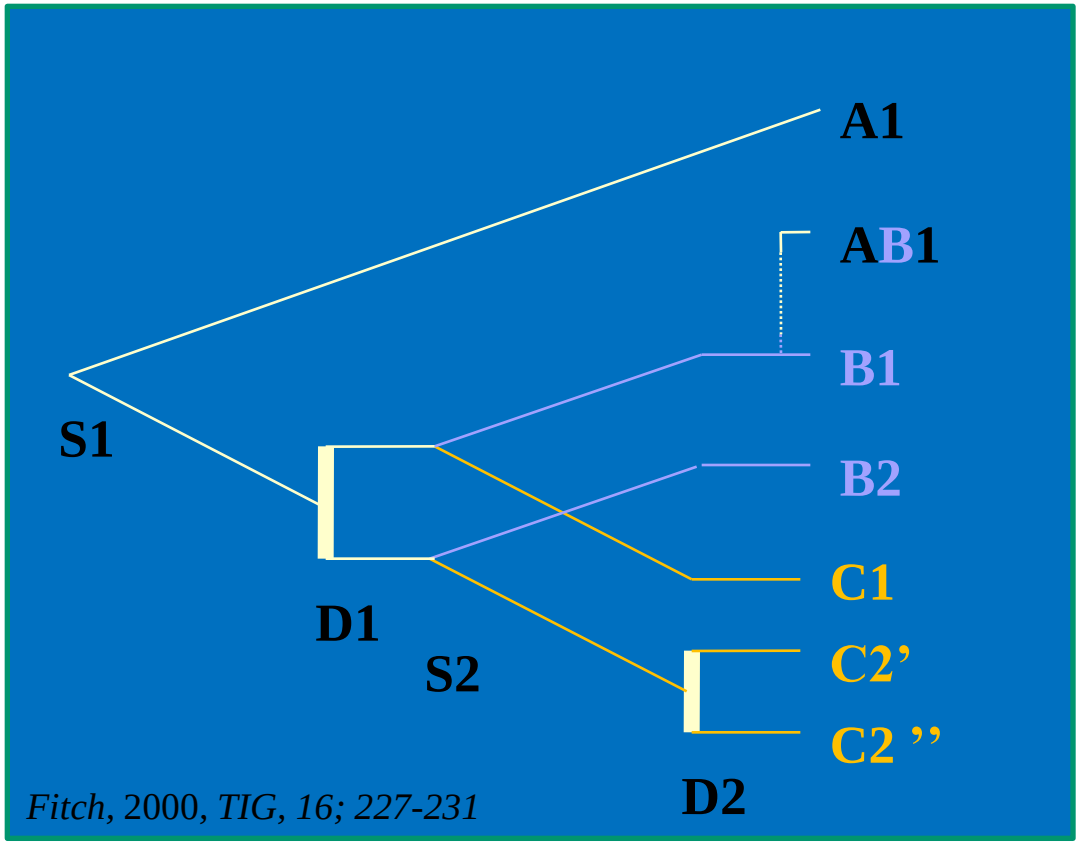
Pour cela il faut entre autre connaître :

- les différents modèles évolutifs qui ont été proposés
- les différentes méthodes de reconstruction d'arbres qui ont été développées
- apprendre à analyser les arbres obtenus

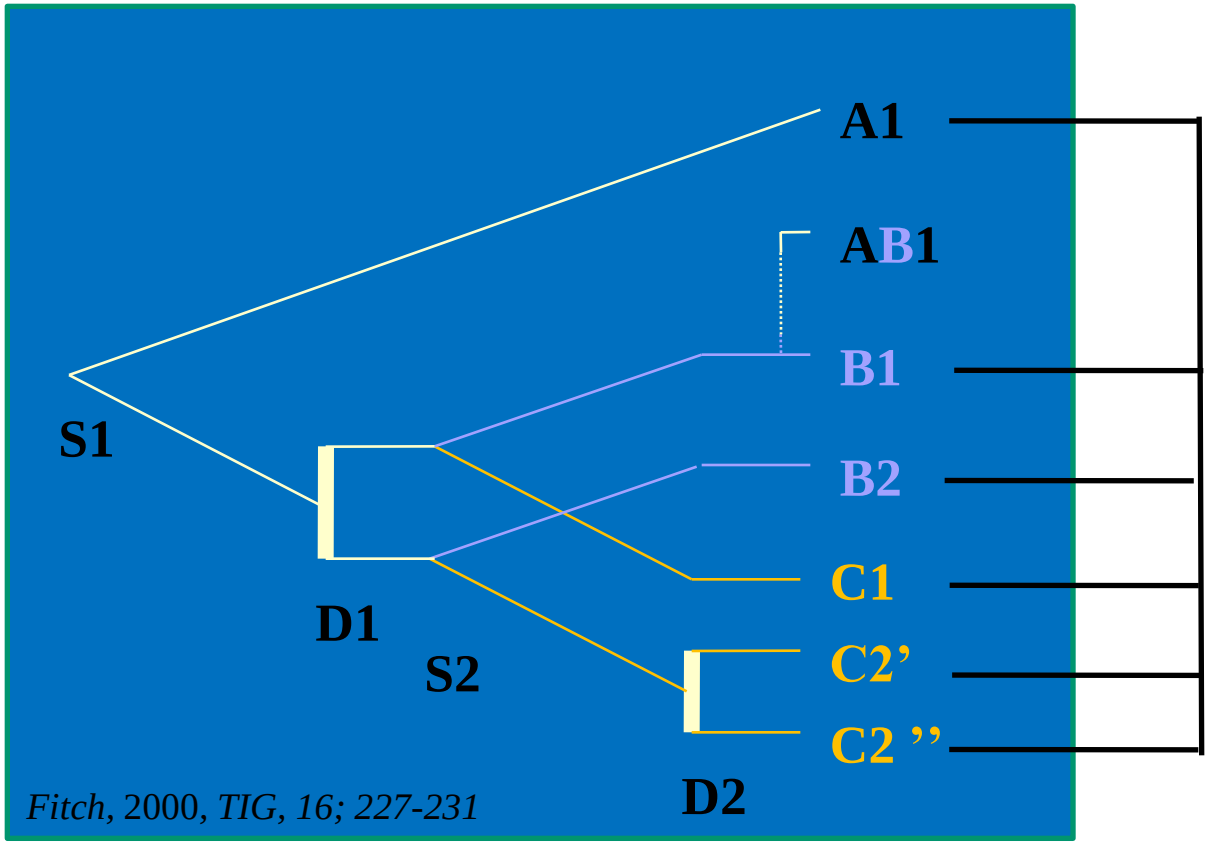
# Illustration



# Notions de base, définitions

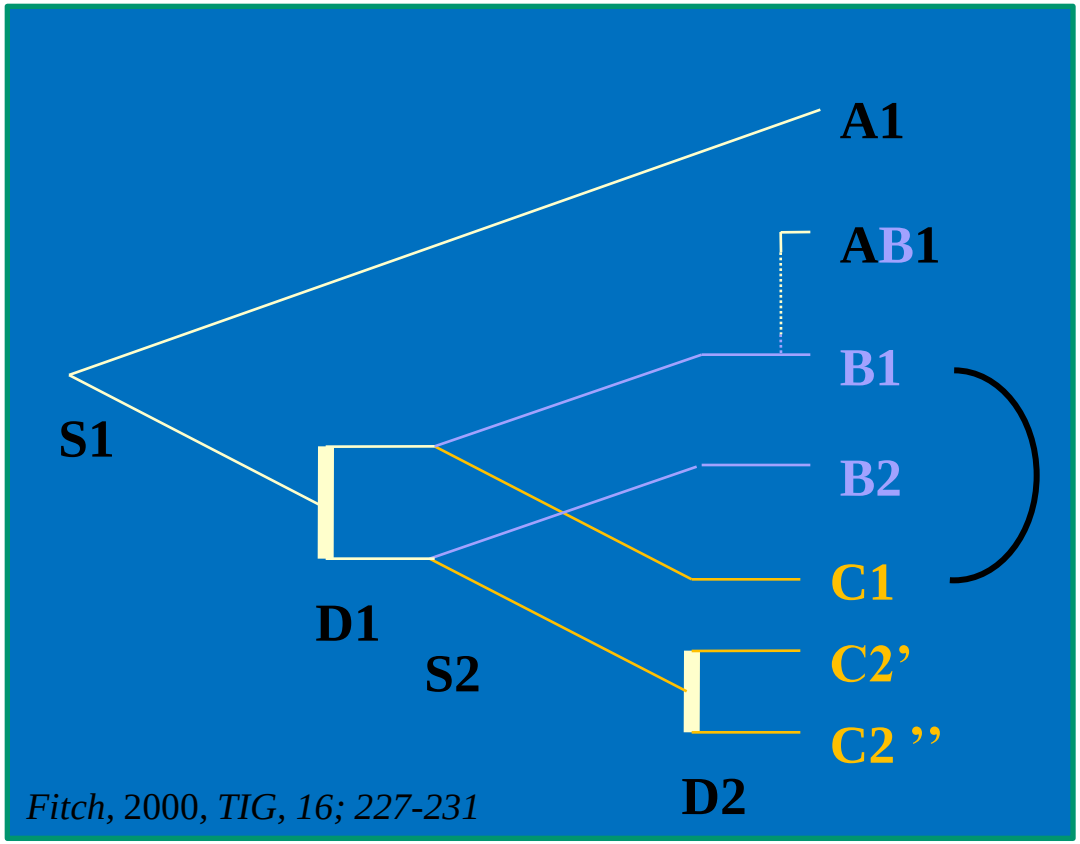


# Notions de base, définitions



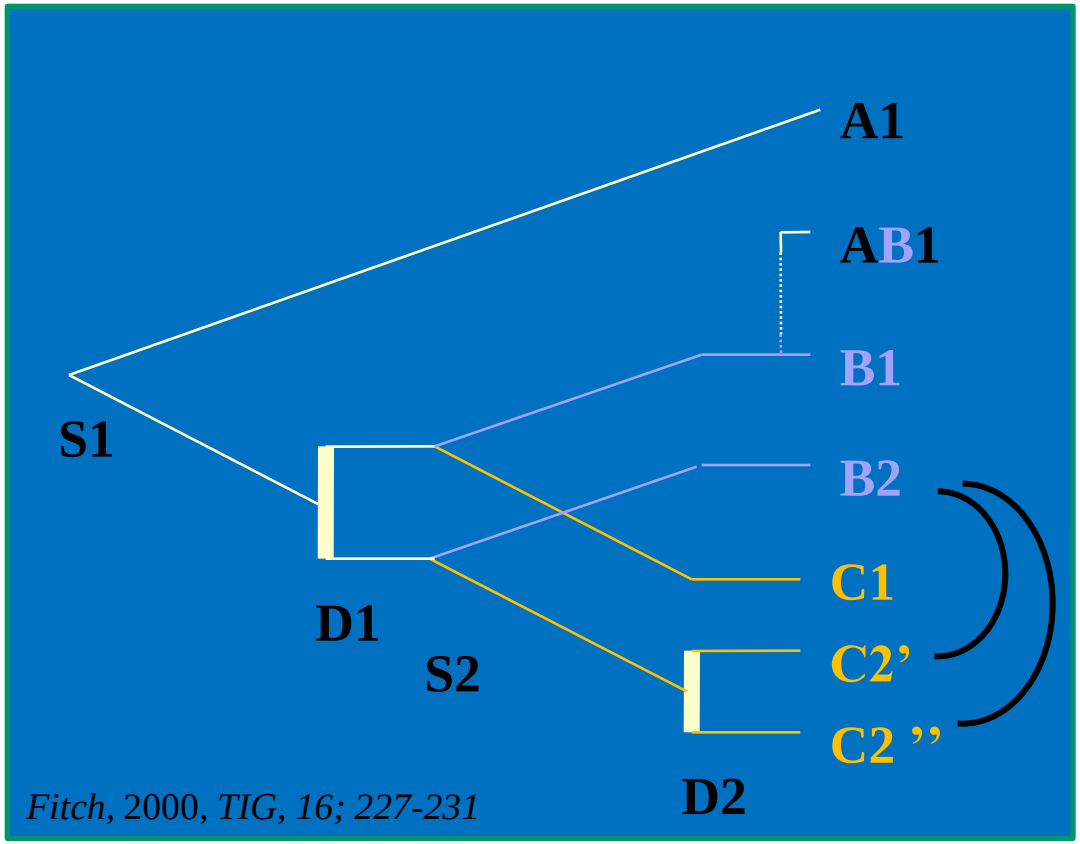

Orthologues à A1

# Notions de base, définitions



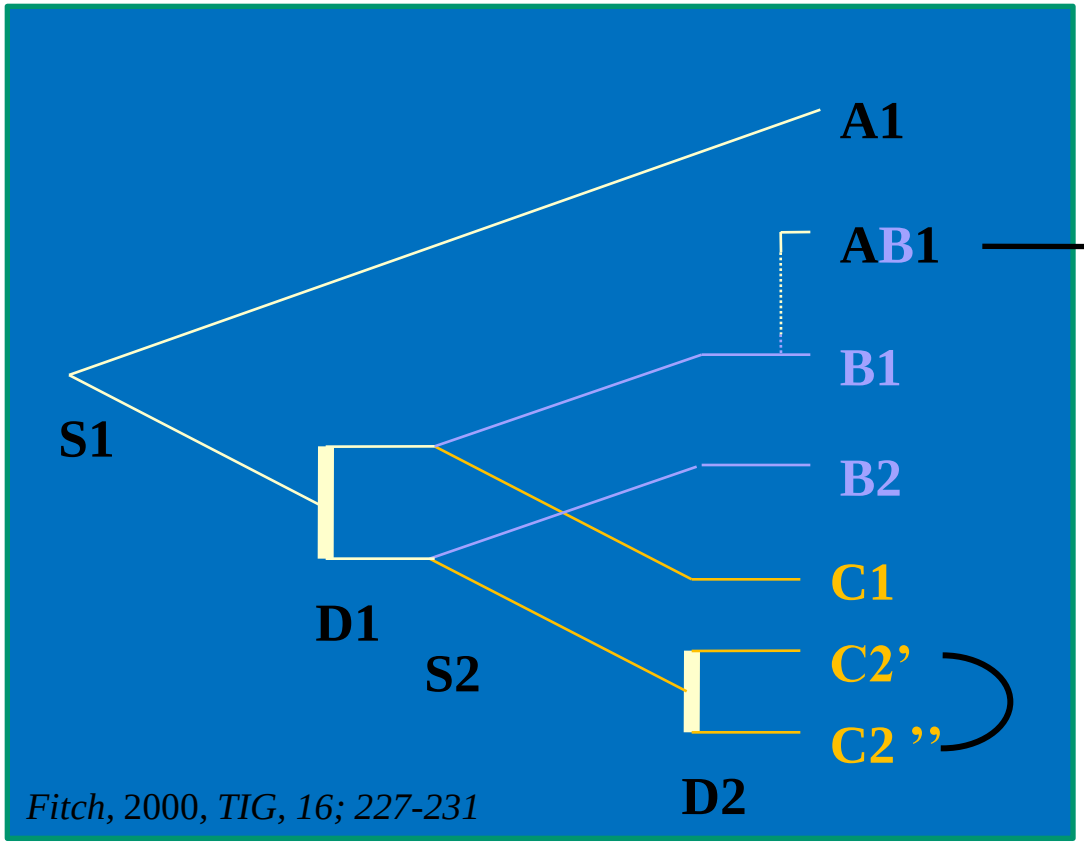

Orthologues

# Notions de base, définitions




Orthologues

# Notions de base, définitions




transfert horizontal

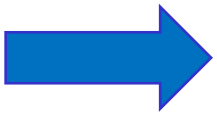
paralogues

# Notions de base, définitions

## Pourquoi la comparaison de séquences :

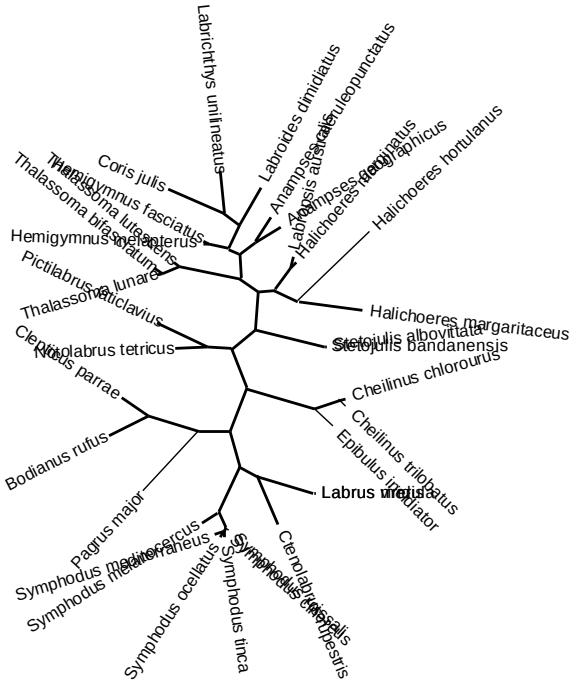
**Hypothèse 1**: si deux ou plusieurs séquences possèdent des résidus conservés (bases ou acides aminés), cela signifie qu'elles ont une histoire évolutive commune. Elles ont évoluées à partir d'une séquence ancêtre commune.

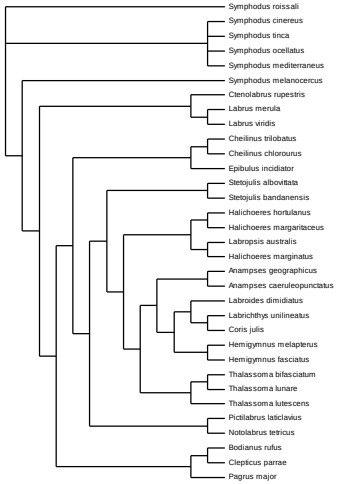
Le pourcentage de similarité entre deux séquences est considéré comme reflétant la distance évolutive existant entre ces deux séquences. Les différences observées sont dues à l'accumulation de mutations au cours du temps. Les mutations prises en compte sont les substitutions et les insertions/délétions (indels).

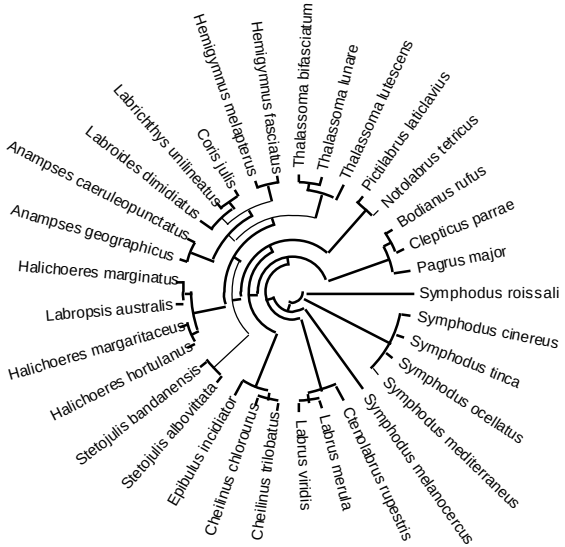


Alignement multiple

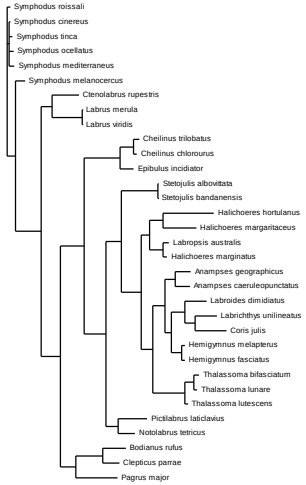
# Notions de base : arbres phylogénétiques



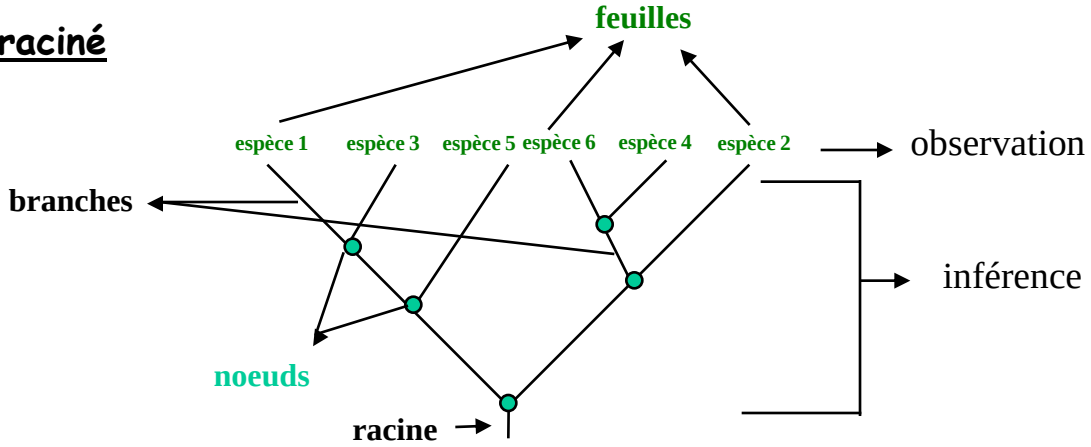







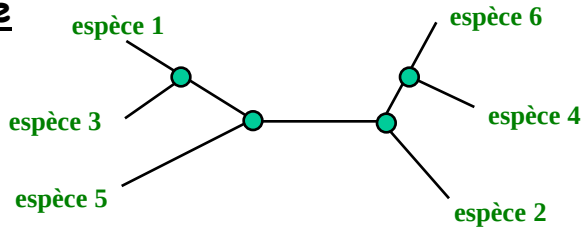
# Notions de base : arbres phylogénétiques

**Arbre enraciné**




• Les sommets externes sont appelés **feuilles**. C'est la seule partie basée sur l'observation.
• Les sommets internes sont appelés **nœuds**. Ils représentent l'ancêtre commun hypothétique dans le sens où leur existence n'est pas fondée sur l'observation mais sur le processus de reconstruction.
• La relation entre deux nœuds est appelée **branche**. Les branches peuvent être valuées, c'est à dire que l'on peut leur associer une mesure (ex: une distance, une quantité d'évolution, un nombre de mutations) qui dépend de la méthode de reconstruction utilisée. Elles donnent une estimation de la divergence entre les nœuds.
• La **racine** définie l'origine commune des espèces traitées. Les liens entre nœuds et feuilles sont orientés, on part de la racine et on remonte aux feuilles.

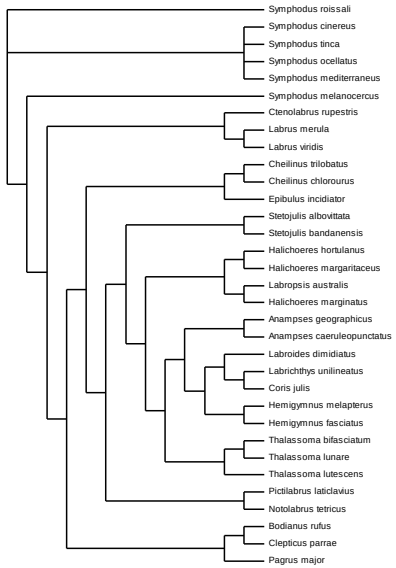
**Arbre sans racine**



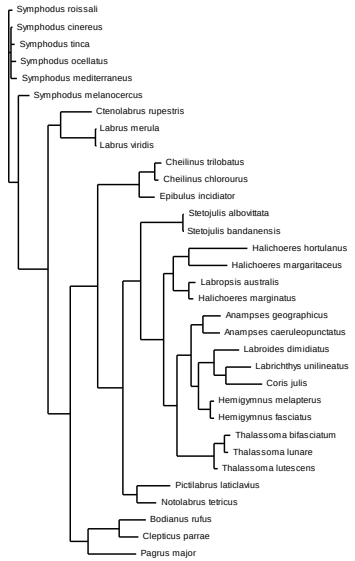

Dans un arbre sans racine, les liens entre nœuds ne sont pas orientés et un seul et unique chemin permet de passer d'un sommet à l'autre.

# Notions de base : arbres phylogénétiques


Cladogramme : pas de longueurs de branches (feuilles sous un même nœud appelée clade)




**Arbre ultramétrique**



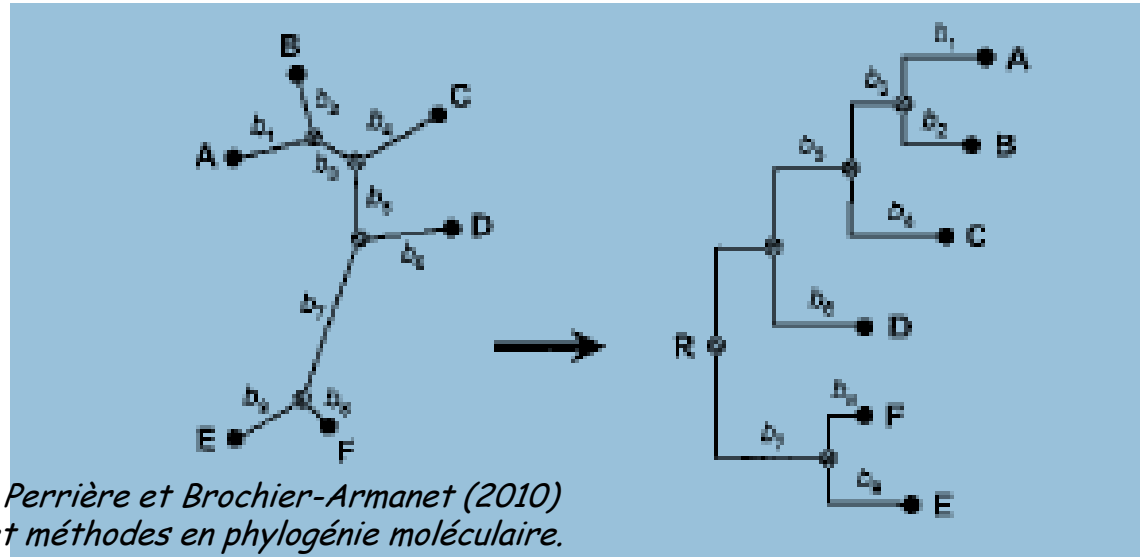

**Arbre additif**

Phylogramme : longueurs de branches

# Notions de base : arbres racinés et non racinés

La plupart des méthodes produisent des arbres non racinés car elles détectent des différences entre séquences mais n'ont aucun moyen d'orienter temporellement ces différences.

- enraciner un arbre :
  - Racinemenent au barycentre : ne nécessite pas de connaissances *à priori* . Positionne la racine au milieu du chemin séparant les deux groupes de feuilles les plus éloignés. La racine est donc le point de l'arbre équidistant de toutes les feuilles. Fait l'hypothèse de l'horloge moléculaire : on suppose que toutes les séquences ont évolué à la même vitesse depuis leur divergence de leur ancêtre commun. Attention, ici on fait une hypothèse très lourde qui est rarement vérifiée par les données.



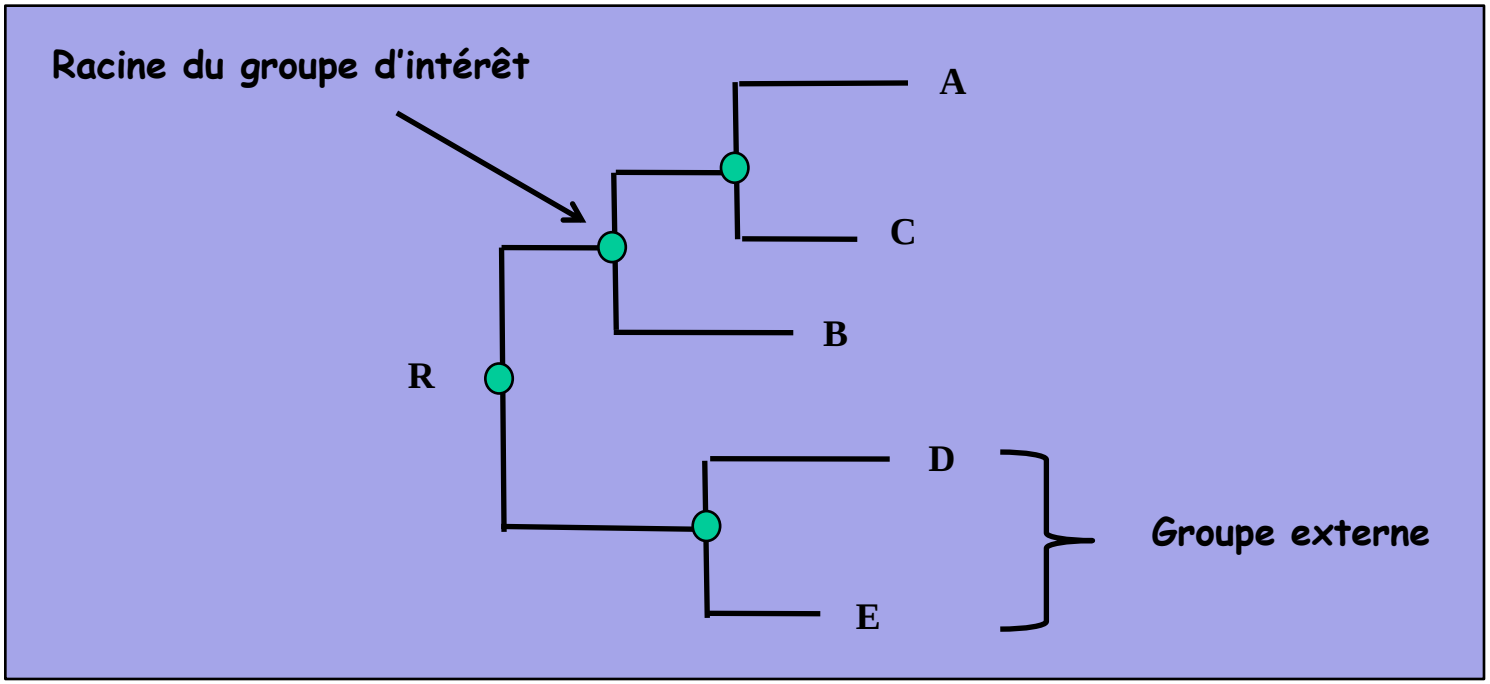

*Extrait de Perrière et Brochier-Armanet (2010)*
*Concepts et méthodes en phylogénie moléculaire.*

# Notions de base : arbres racinés et non racinés

- enraciner un arbre :

  - La méthode du groupe externe : inclure un groupe de séquences connues *a priori* comme externes au groupe d'intérêt; la racine est alors sur la branche qui relie le groupe externe aux autres séquences. Séquences connues comme ayant a priori divergé avant le groupe d'intérêt.

  Problème : choix du groupe externe, qui doit être le plus proche possible du groupe d'intérêt.



# Reconstruction phylogénétique : deux écoles

A partir de l'observation des états des caractères, il va falloir reconstruire l'arbre et interpréter les ressemblances.

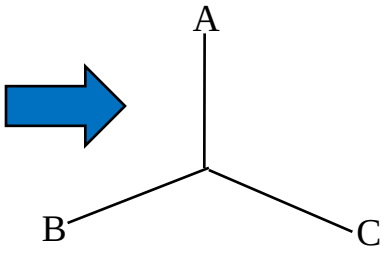
Deux écoles :

- les phénéticiens adeptes de la « taxonomie numérique ». Les liens entre les taxons ne peuvent être fondés que sur la base d'une similitude globale exprimée à partir de matrices de calcul de distances. Dans le cas des séquences, à partir d'un alignement multiple, on calculera les distances entre les séquences prises deux à deux en prenant en compte toutes les positions alignées sans indels.
  L'analyse phénétique se fonde sur l'analyse du plus grand nombre de caractères.
- Les cladistes préfèrent élaborer des phylogénies à partir d'un ensemble préalablement choisi de caractères.

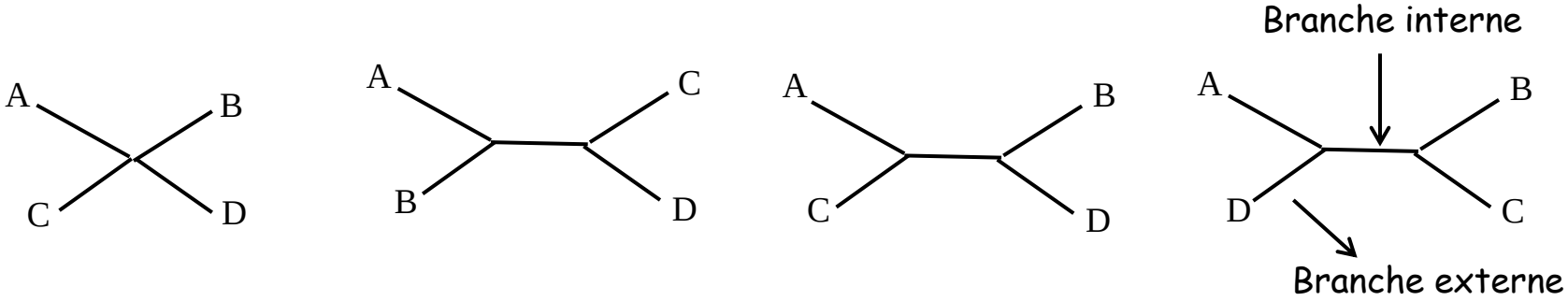
# Trouver l'arbre

**Problème** : un seul arbre vrai, l'arbre évolutif
Comment le distinguer dans tous les arbres possibles

Si trois OTU : un seul arbre non raciné et trois racinés




Si quatre OTU : quatre arbres non enracinés dont trois résolus




4 branches = 4 racines possibles

5 branches : 5 racines possibles

Total : 19 arbres enracinés possibles

# Trouver l'arbre

Nombre de topologies d'arbres non racinées binaires pour *n* taxons

$$Tn = \prod_{k=3}^{n} (2k-5)$$

$$N_{arbres} = 3.5.7...(2n-5) = \frac{(2n-5)!}{2^{n-3}(n-3)!}$$

Arbre binaire = d'un ancêtre, seuls deux organismes peuvent diverger

| n | $N_{arbres}$ |
|---|---|
| 4 | 3 |
| 5 | 15 |
| 6 | 105 |
| 7 | 945 |
| ... | ... |
| 10 | 2.027.025 |
| ... | ... |
| 20 | ~ $2 \times 10^{20}$ |

Construire un arbre d'évolution de **10 espèces** revient à **réfuter 2.027.024** cas possibles

# Méthodes de reconstruction phylogénétique

Quatre familles principales de méthodes :

- Parcimonie : à partir d'un ensemble de caractères choisis.
- Méthodes de distance : à partir de distances établies sur un ensemble de caractères.
- Méthodes du maximum de vraisemblance : à partir des probabilités de l'apparition des transformation d'un état de caractères en un autre.
- Approche bayésienne

# Principe général d'une méthode de distance

## Alignement de séquences

```
CAAACAGCGTT---GGCTCTCTA
AAAATAACACCaacATGCAAATG
AAAACAGCACCaacGTGCAAATG
AAAACAGCACCaacGTGCAAATG
```

Mesure des distances évolutives

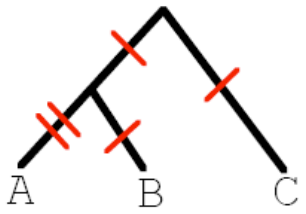
Matrice des distances évolutives entre paires de séquences

| | A | B | C |
|---|---|---|---|
| A | **0** | | |
| B | **3** | **0** | |
| C | **4** | **3** | **0** |

distance matrix

Calcul d'un arbre à partir des distances

Arbre (non enraciné)




tree

# Calcul des distances entre deux séquences

La distance *d* séparant deux séquences est définie comme le nombre moyen de substitution par site qui s'est produit depuis que ces deux séquences ont divergé de leur ancêtre commun.

<u>Divergence observée ou *p*-distance</u> : la plus simple

On compte le nombre *s* de substitutions observées entre deux séquences alignées que l'on rapporte au nombre de sites homologues *n* alignés, donc :

$$p = \frac{s}{n}$$

## Proportional (*p*) Distance

DNA Site

| Species | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | A | T | A | T | A | C | G | T | A | T |
| II | A | T | G | T | A | C | G | T | A | T |
| III | G | T | A | - | A | C | G | T | G | C |
| IV | G | C | G | T | A | T | G | C | A | C |

$p =$ <u># differences</u> / # sites

| | I | II | III | IV |
|---|---|---|---|---|
| I | - | 0.1 | 0.4 | 0.6 |
| II | | - | 0.5 | 0.5 |
| III | | | - | 0.6 |
| IV | | | | - |

facile à calculer mais quand les séquences ne sont pas proches (issues d'organismes distants dans l'évolution), elle sous-estime les distances évolutives.

Cause : l'existence de substitutions multiples. Phénomène plus critique pour les séquences d'acides nucléiques car possèdent un alphabet plus pauvre que les séquences protéiques : quatre lettres au lieu de 20.

# Calcul des distances entre deux séquences nucléiques

**Substitutions multiples**

**Séquence1 GAAAAG**
**Séquence2 ATGAAG**

| Type de substitution | Séquence 1 | Séquence 2 | Nombre de substitutions observé | Nombre de substitutions réel |
|---|---|---|---|---|
| Substitution unique (simple) | G | G ➤ A | 1 | 1 |
| Substitutions multiples | A | A ➤ C ➤ T | 1 | 2 |
| Substitutions coïncidentes au même site | T ➤ A | T ➤ G | 1 | 2 |
| Substitutions parallèles | T ➤ A | T ➤ A | 0 | 1 |
| Substitutions convergentes | C ➤ G ➤ A | C ➤ A | 0 | 3 |
| Substitution réverse (inverse) | G ➤T ➤ G | G | 0 | 2 |

Pour tenter de corriger le biais du aux mutations multiples, des hypothèses sont faites sur la façon dont les bases se sont substituées à un locus donné : modèles évolutifs

# Choix d'un modèle évolutif

Des méthodes permettant de tester l'adéquation du modèle aux données existent mais souvent le choix du modèle est du fait de l'utilisateur et de ses connaissances.

<u>Quelques règles simples :</u>

- construction d'une phylogénie à partir de gènes protéiques :
  - séquences très distantes dans l'évolution : utilisation des séquences protéiques.
  - séquences proches dans l'évolution : utilisation des séquences acides nucléiques voir travailler uniquement sur les positions synonymes.

- Utilisation de séquences nucléiques : grand nombre de modèles
  - critère important : le degré de divergence entre les séquences.
  - pas toujours pertinent d'utiliser les modèles avec beaucoup de paramètres :
    - ❖ si les séquences sont courtes ou trop similaires les estimations des paramètres sont mauvaises.
    - ❖ modèle arrivant à saturation plus rapidement donc si séquences très divergentes, fréquemment impossible de calculer les distances.
  - donc si même résultat avec deux modèles, utiliser le plus simple car la variance de la distance augmente avec le nombre de paramètres.
  - application de la correction Gamma que si nombre de sites utilisés important car nécessite d'estimer un paramètre supplémentaire (la forme $\alpha$ de la distribution). Cette correction permet de prendre en compte des vitesses d'évolution différentes pour les différents sites (positions alignées).

# Choix d'un modèle évolutif séquences nucléiques
# Likelihood Ratio Test

Nécessite que les modèles que l'on veut tester soit imbriqués (du plus simple au plus complexe) : logiciel JModelTest

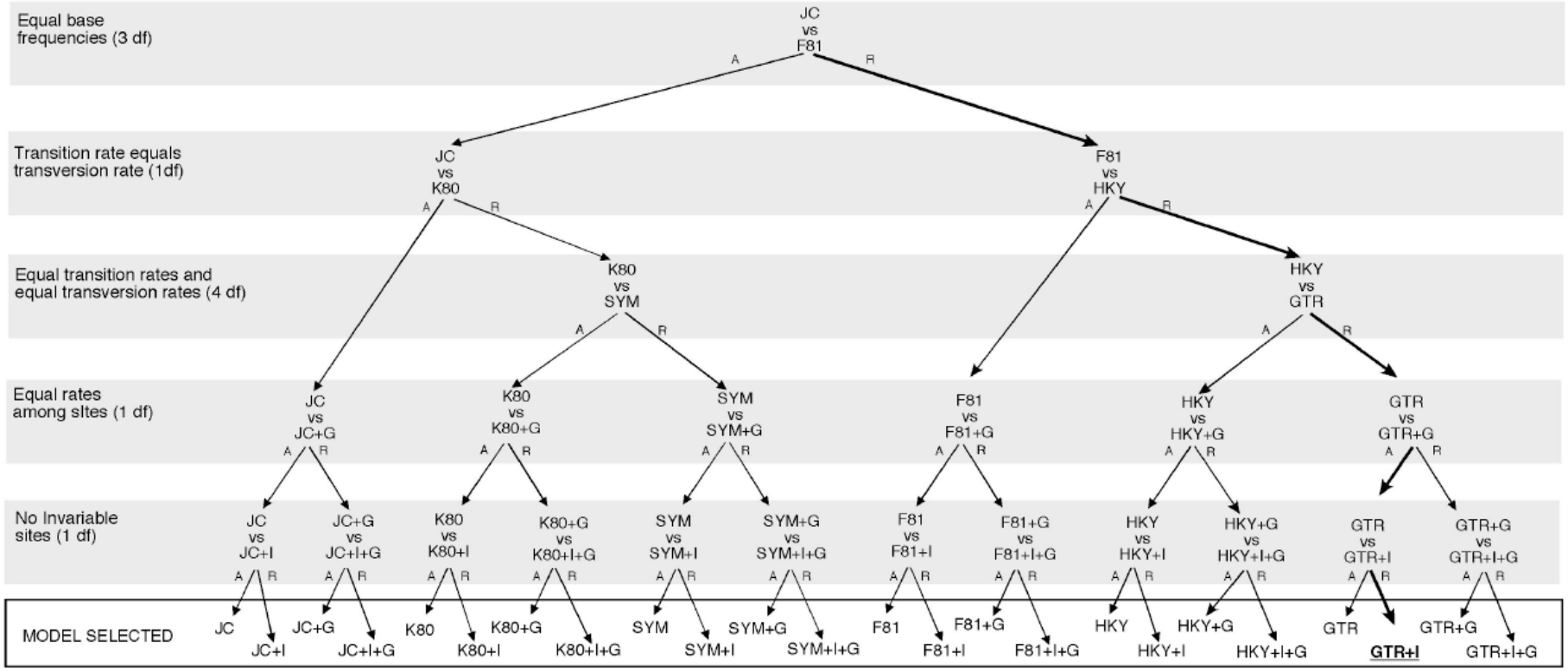



Figure 17. Example of a particular forward hierarchy of likelihood ratio tests for 24 models. At any level the null hypothesis (model on top) is either accepted (A) or rejected (R). In this example the model selected is GTR+I.

*(Extrait du manuel de JModelTest)*

# Choix d'un modèle évolutif séquences protéiques
# Akaike Information Criterion (AIC)

Plusieurs modèles aussi :

- Poisson
- PAM
- JTT
- Blosum62
- WAG
- LG
- (spécialisé comme mitochondrie de mammifères, HIV etc…)

Le logiciel ProTest permet de choisir le modèle le plus adapté aux données

# Choix d'une méthode de reconstruction d'arbre

**Méthode de parcimonie** : cherche à minimiser le nombre de changements. Plus adéquate pour des données de présence/absence. Pas conseillée pour la reconstruction phylogénétique à partir des séquences

**Méthode de distance** : **la Neighbor Joining (NJ) :** Constitue une approximation du minimum d'évolution (critère d'optimisation).
Principe général du minimum d'évolution : Examine toutes les topologies, calcule la somme de la longueur des branches de chacune d'entre-elles et retient celle qui minimise la somme des longueur des branches (arbre de longueur minimum). Des variantes avec pondérations ont également été développées comme la BIONJ (Gascuel, 1997). La BIONJ apporte de améliorations évidentes surtout quand les séquences sont fortement divergentes et/ou quand elles présentent des vitesses d'évolution différentes.

Conclusion :

- Méthode performante car bon équilibre entre rapidité et efficacité. Elle peut être appliquée sur des très grands jeux de données. Robuste car ne dépend pas de l'ordre des séquences.
- ne fait pas l'hypothèse de l'horloge moléculaire
- Souvent utilisée pour chercher des arbres qui vont servir de point de départ pour des méthodes plus coûteuses en temps calcul comme la méthode du maximum de vraisemblance
- Elle peut être appliquée sur n'importe quel type de distances évolutives.
- Ne donne pas d'informations sur les états de caractères de l'ancêtre commun.

# Choix d'une méthode de reconstruction d'arbre

Méthode du maximum de vraisemblance :

On a un grand nombre de scénarios évolutifs possibles. Cependant certains d'entre eux sont plus susceptibles que d'autres de produire les séquences actuelles.

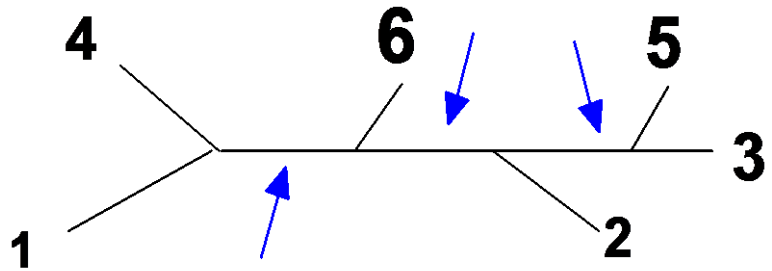
Le but des méthodes de maximum de vraisemblance est d'identifier ces scénarios, c'est-à-dire de trouver les valeurs des paramètres de $\Theta$ qui maximisent la probabilité d'observer les séquences actuelles.

- C'est la méthode la mieux justifiée au plan théorique.
- Des expériences de simulation de séquences ont montré que cette méthode est supérieure aux autres dans la plupart des cas.
- Mais c'est une méthode très lourde en calculs.
- Il est presque toujours impossible d'évaluer tous les arbres possibles car ils sont trop nombreux. Une exploration partielle de l'ensemble des arbres est réalisée en utilisant des méthodes de réarrangements locales ou globales similaires à celles utilisées en parcimonie.

Methodes principales : PhyML, RAxML et TREE-PUZZLE

# Fiabilité des arbres phylogénétiques: le bootstrap

- L'information phylogénétique contenue dans un arbre non raciné réside entièrement dans ses branches internes.

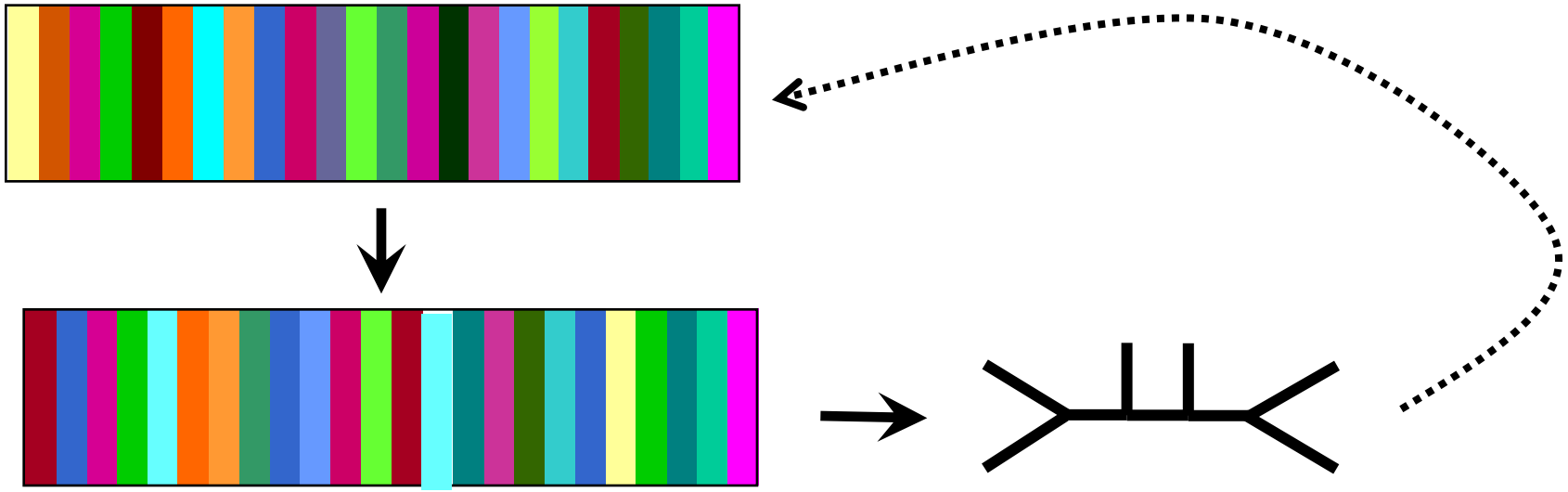



internal branch separating group 1+4
from group 6+2+5+3

- La forme de l'arbre est déterminée par la liste des branches internes.
- Evaluer la fiabilité d'un arbre = évaluer celle de chaque branche interne.

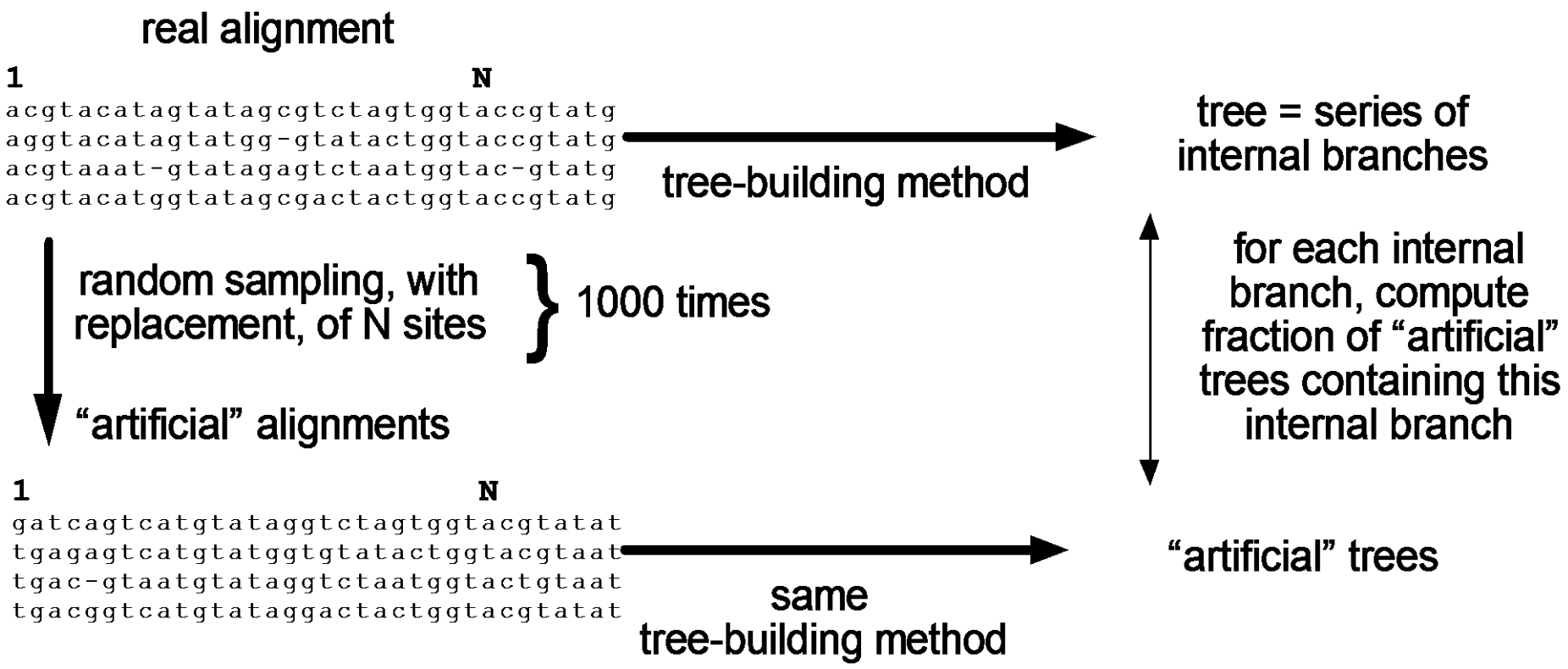
# Le bootstrap : procédure

- Tirage avec remise de *n* positions parmi *n* positions
  - Le tirage avec remise de positions, en respectant l'effectif original, revient à conférer un poids aléatoire aux positions
- Construire l'arbre phylogénétique
- Répéter 1) et 2) un grand nombre de fois (1000)



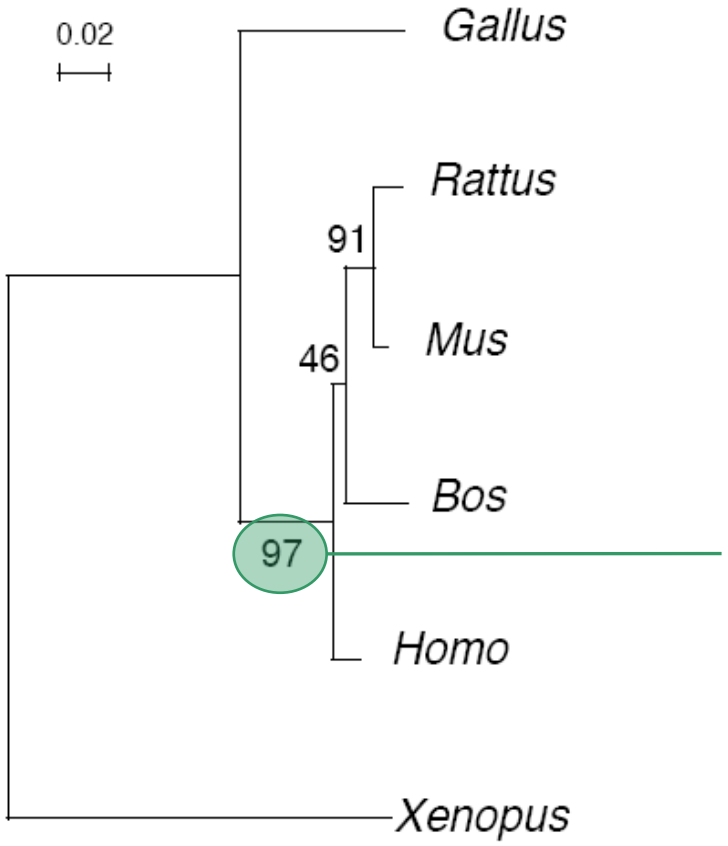
Pour chaque arbre reconstruit on compte le nombre de fois que l'on observe la branche interne. Le soutien de la branche est exprimé en pourcentage de réplications. Si la branche est observée dans tous les arbres, la valeur du bootstrap est égale à 100.

# Le bootstrap : procédure



# Le bootstrap

Test individuellement la validité de chaque branche interne de l'arbre. Pour cela, on calcule le pourcentage de fois où chaque branche interne de l'arbre de départ se retrouve dans les arbres construits par rééchantillonage. Ce pourcentage correspond à la valeur du bootstrap.




**Estimation** statistique de la **confiance** à accorder à une branche

97% des 1000 arbres contenaient cette branche

# Le bootstrap : interprétation

Problème beaucoup discuté .

De manière générale, une faible valeur de bootstrap indique que la quantité d'information supportant la bipartition induite par une branche interne est faible.

Quel seuil ?

Si on applique les critères standards utilisés en statistique, il ne faudrait considérer comme valide que les branches ayant un support de bootstrap ≥ 95% (sinon la branche n'existe pas).
Des travaux ont montré que ce seuil était trop élevé, notamment ceux de Hillis et Bull (1993, Syst. Biol., 42, 182-92) qui à l'aide de simulations ont montré que des supports de 70% pouvaient correspondre à des groupements significatifs.
Cependant résultat pas généralisable à toutes les analyses.