SouthGreen bioinformatics platform

Modules de formation 2022

agap

Alliance Bioversity International CIAT

diade

PHIM

intertryp

MiVEGEC

TransVIHMI

Lancement des VMs

- Sur Biosphere:

https://biosphere.france-bioinformatique.fr/catalogue/

VM RNASeq_SG

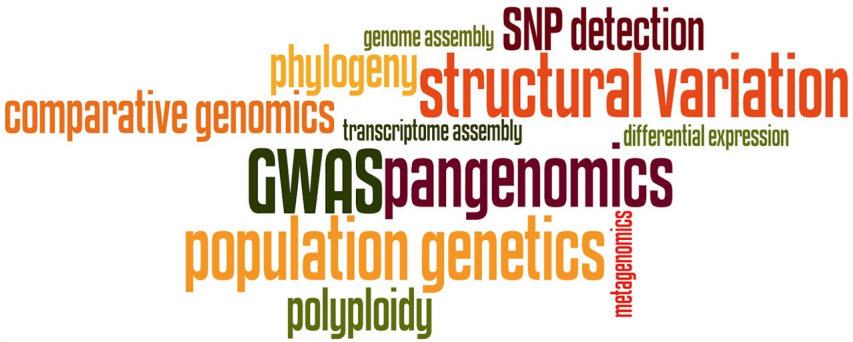
Configurer

Groupe: RNA-Seq SG

Gabarit XLarge (4 vCPUs)

SouthGreen bioinformatics platform

Bioinformatics platform dedicated to the genetics and genomics of tropical and Mediterranean plants and their pathogens




Rice

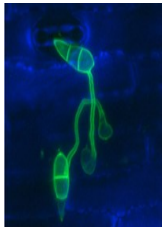

Banana


Palm


Sorghum


Coffee


Cassava


Magnaporthe

www.southgreen.fr

SouthGreen bioinformatics platform

Charte

diade

Larmande Pierre
Orjuela-Bouniol Julie
Sabot François
Tando Ndomassi
Tranchant-Dubreuil Christine

PHIM

Comte Aurore
Dereeper Alexis
Ravel Sébastien

agap

Bocs Stephanie
Boizet Alice
De Lamotte Frédéric
Droc Gaetan
Dufayard Jean-François
Hamelin Chantal
Martin Guillaume
Pitollat Bertrand
Ruiz Manuel
Sarah Gautier
Summo Marilyne

Bioversity International

Rouard Mathieu
Guignon Valentin
Catherine Breton

intertryp

Sempere Guilhem

Alliance
Bioversity International
CIAT International Center for Tropical Agriculture Since 1967 Science to cultivate change

cirad

IRD Institut de Recherche pour le Développement FRANCE

INRAE

SouthGreen bioinformatics platform

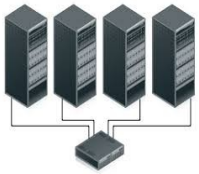
Workflow manager

TOGGLE
Toolbox for generic NGS analyses

SNAKEMAKE

Galaxy

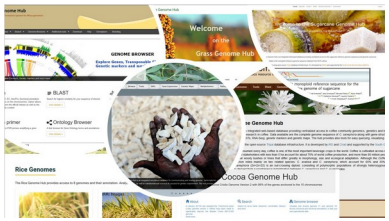
HPC and trainings….



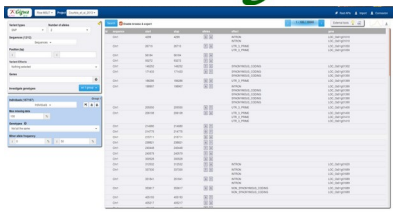
IRD Institut de Recherche pour le Développement FRANCE

cirad

Genome Hubs & Information System

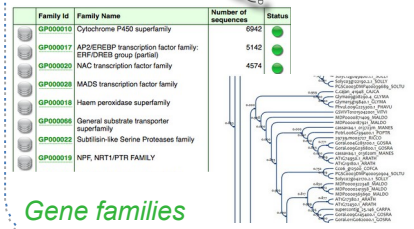


Gigwa



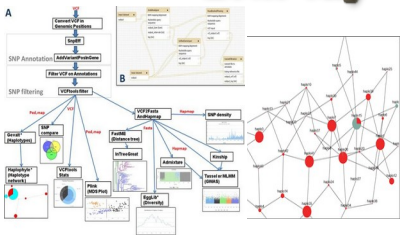
SNPs and Indels

GreenPhyl



Gene families

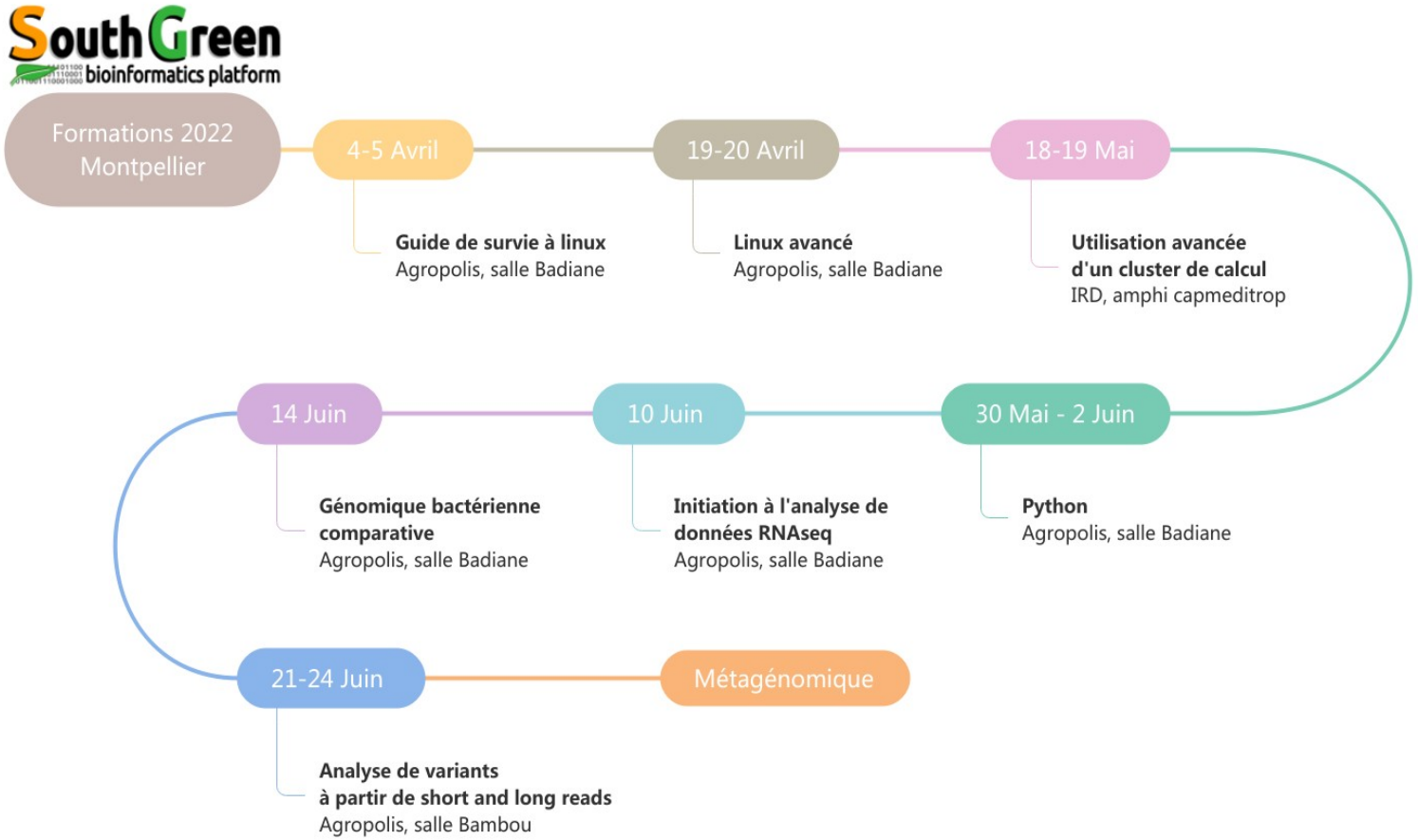
SNiPlay



https://github.com/SouthGreenPlatform

@green_bioinfo

The South Green portal: a comprehensive resource for tropical and Mediterranean crop genomics, Current Plant Biology, 2016


SouthGreen bioinformatics platform
Formations 2022 Montpellier
4-5 Avril
Guide de survie à linux
Agropolis, salle Badiane
19-20 Avril
Linux avancé
Agropolis, salle Badiane
18-19 Mai
Utilisation avancée d'un cluster de calcul
IRD, amphi capmeditrop
30 Mai - 2 Juin
Python
Agropolis, salle Badiane
10 Juin
Initiation à l'analyse de données RNAseq
Agropolis, salle Badiane
14 Juin
Génomique bactérienne comparative
Agropolis, salle Badiane
Métagénomique
21-24 Juin
Analyse de variants à partir de short and long reads
Agropolis, salle Bambou

Trainings 2022

- Toutes nos formations :
  https://southgreenplatform.github.io/trainings/

- Slides & Practices : RNAseq

Version 2022.1

Initiation aux analyses de données transcriptomiques

www.southgreen.fr

https://southgreenplatform.github.io/trainings

Alliance Bioversity International CIAT cirad INRAE IRD Institut de Recherche pour le Développement FRANCE Montpellier SupAgro

Objectif du module

Objectifs

- Connaître et manipuler des packages/outils disponibles pour la recherche de gènes différentiellement exprimés
- Réfléchir sur les différentes techniques de normalisation des données
- Détecter les gènes différentiellement exprimés entre 2 conditions

Applications

- Mapping and counting using STAR , HTSeq-Count
- Differential expression analysis: EdgeR, Deseq2 : DIANE

Experimental design

Pourquoi faire du RNAseq ?

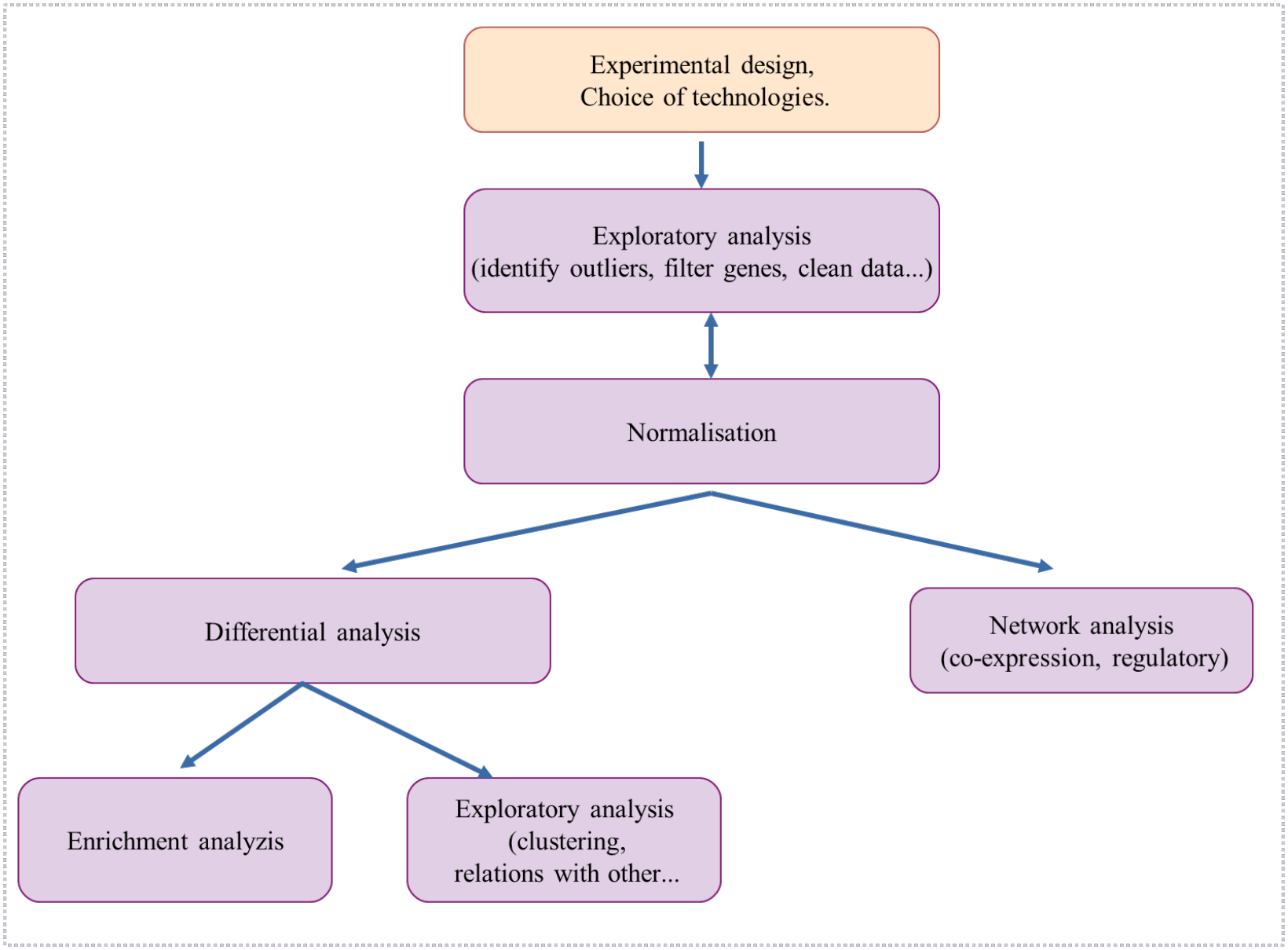
- **L'analyse d'expression différentielle** (différence d'expression dans des conditions précises) au niveau transcriptomique.
- Etude de **l'épissage alternatif** (isoformes) et recherche de nouveaux transcrits.
- **Recherche d'allèles spécifiques** et quantification de leur expression.
- **Construction d'un transcriptome** de novo pour les organismes non modèles.

Choix technologiques

- **Déplétion / enrichissement** :
  - Déplétion des ARNr (eucaryote ou procaryote)
  - Sélection des transcrits poly-A (eucaryotes)
- **Séquençage directionnel**
  - Dans le cas des études ARN anti-sens
- **Multiplexage**
  - Ajouts de séquences tags afin de grouper plusieurs échantillons à séquencer sur une même piste de flowcell.

1- Design experimental

Experimental design

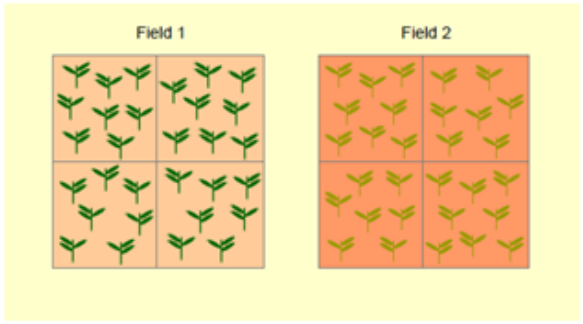


Experimental design

Basic experiment : trouver les différences entre condition contrôle/traitée

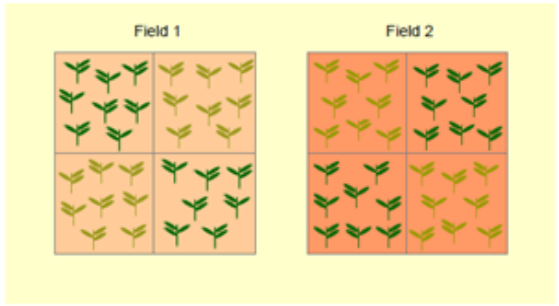
control group plant treated group plant

Mauvais plan expérimental : les plantes traitées sont dans un champs et les contrôles dans un autre.



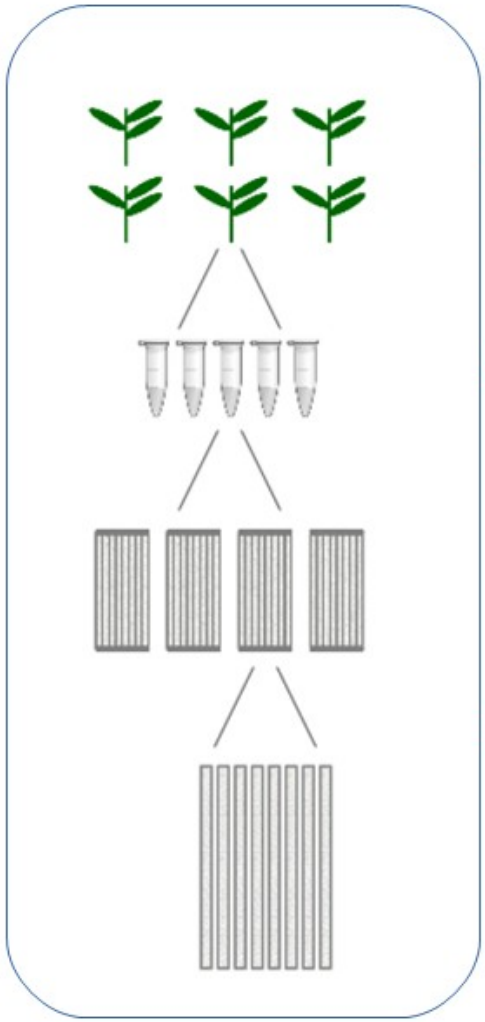
Pas de possibilité de différencier l'effet champs de l'effet traitement

Bon plan expérimental : la moitié des plantes traitées poussent avec un contrôle dans un même champs et l'autre moitié dans un autre champs



Possibilité de différencier l'effet champs de l'effet traitement.

Experimental design



collect

1 – Variations biologiques : variations individuelles dues aux effets génétiques, de l'environnement

Sample preparation

2 – Variations techniques : effet de la préparation des librairies

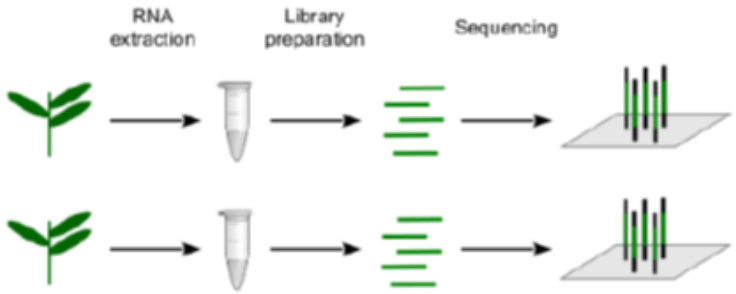
cDNA on lane of flowcell

3 – Variation techniques : effet des lane et des flowcell

Effet lane < Effet Flowcell <Effet de la préparation de la librairie < < Effet biologique

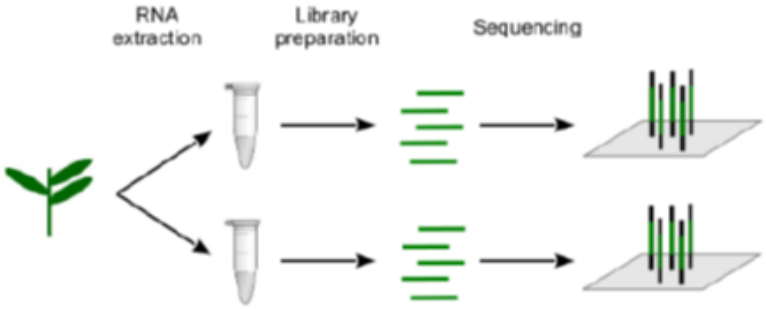
Experimental design

Réplicat biologique : Différents échantillons biologiques, répétés plusieurs fois séparément (au moins 3 fois).



Réplicat Technique : Même matériel biologique, répété plusieurs fois indépendamment des étapes techniques.

- Plusieurs extractions d'une même échantillon
- Plusieurs séquençages d'une même librairie

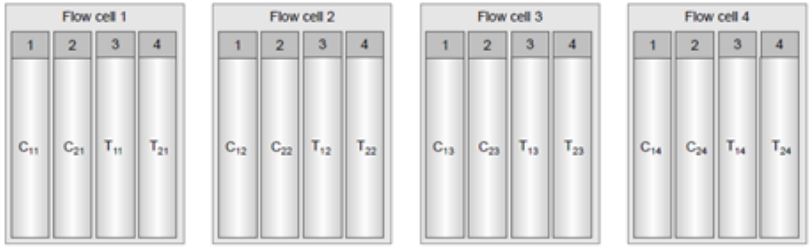


Experimental design

Échantillons séquencés sur deux lanes différentes.

- l'effet lane ne peut pas être mesuré mais la comparaison entre échantillon est préservée.

Exemple :
2 réplicats biologiques par condition et 4 réplicats techniques par réplicats biologiques

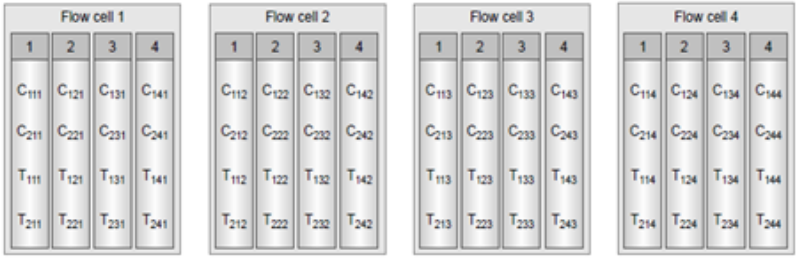


1 2 3 4

Multiplexes RNAseq plan d'expérimentation :

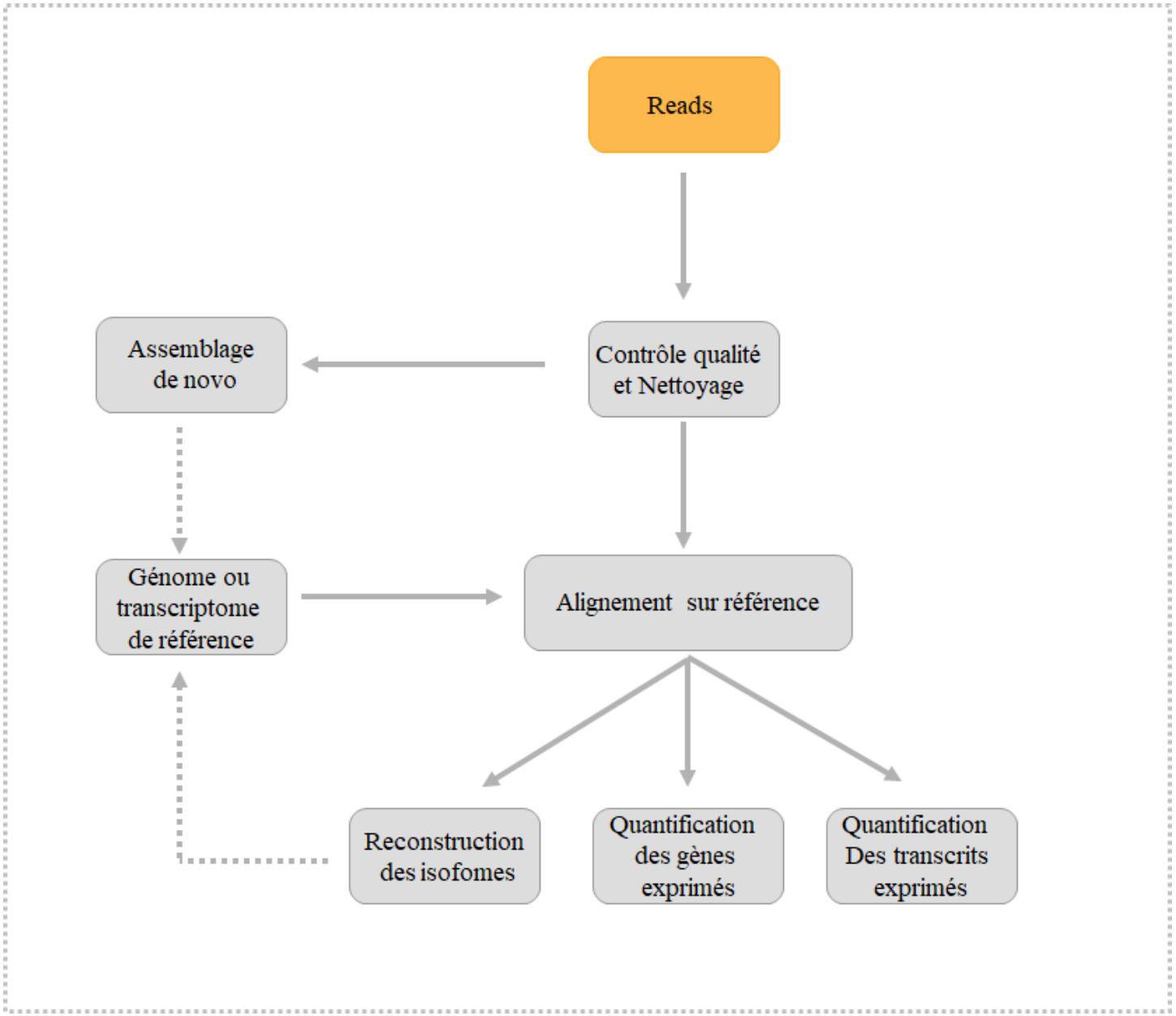
- Les fragments d'ADN sont barcodés, donc plusieurs échantillons sont séquencés sur la même lane

Exemple :
2 réplicats biologiques par condition et 4 réplicats techniques par réplicats biologiques répartis sur 4 flowcell



1 2 3 4

Experimental design



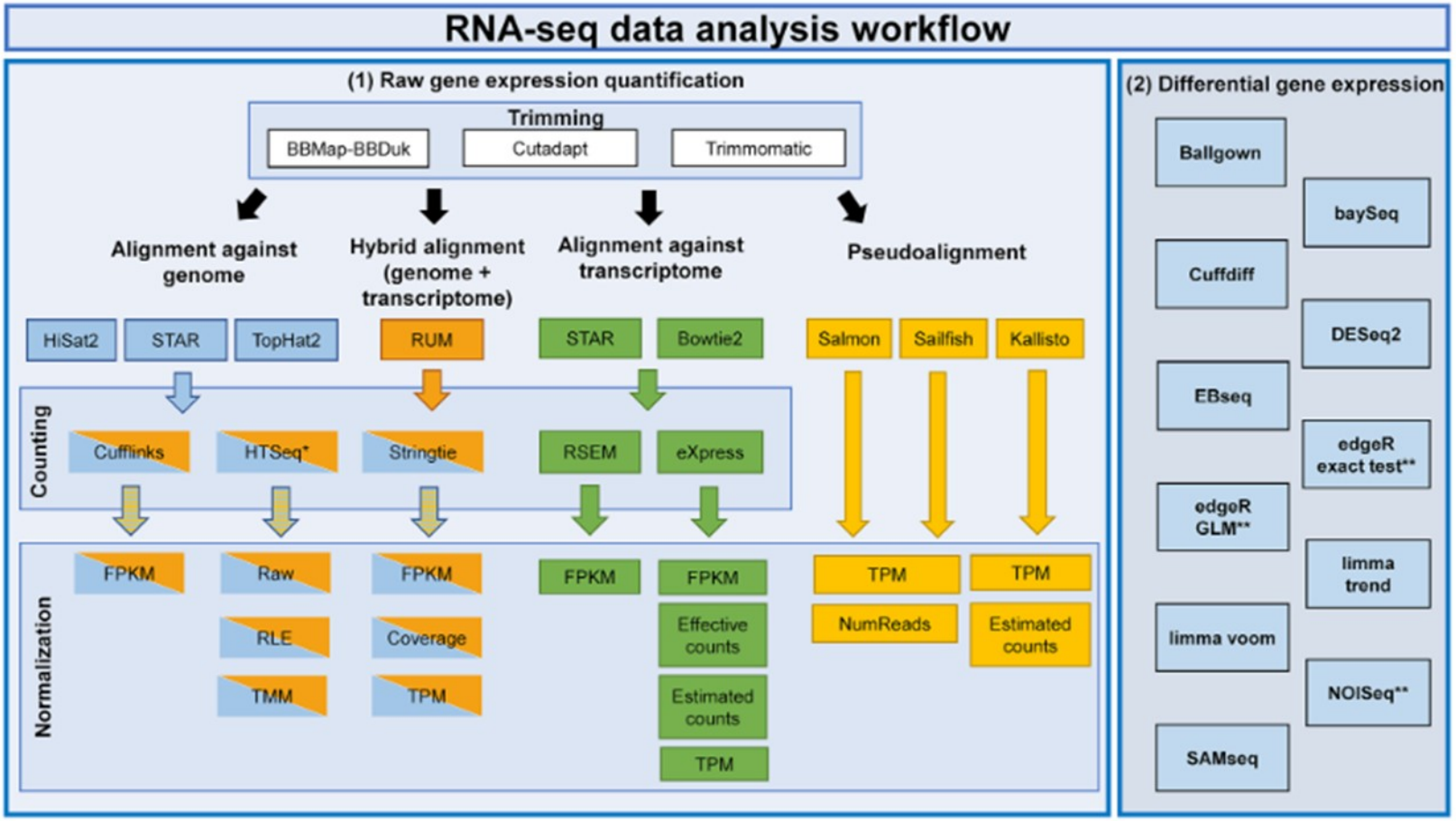
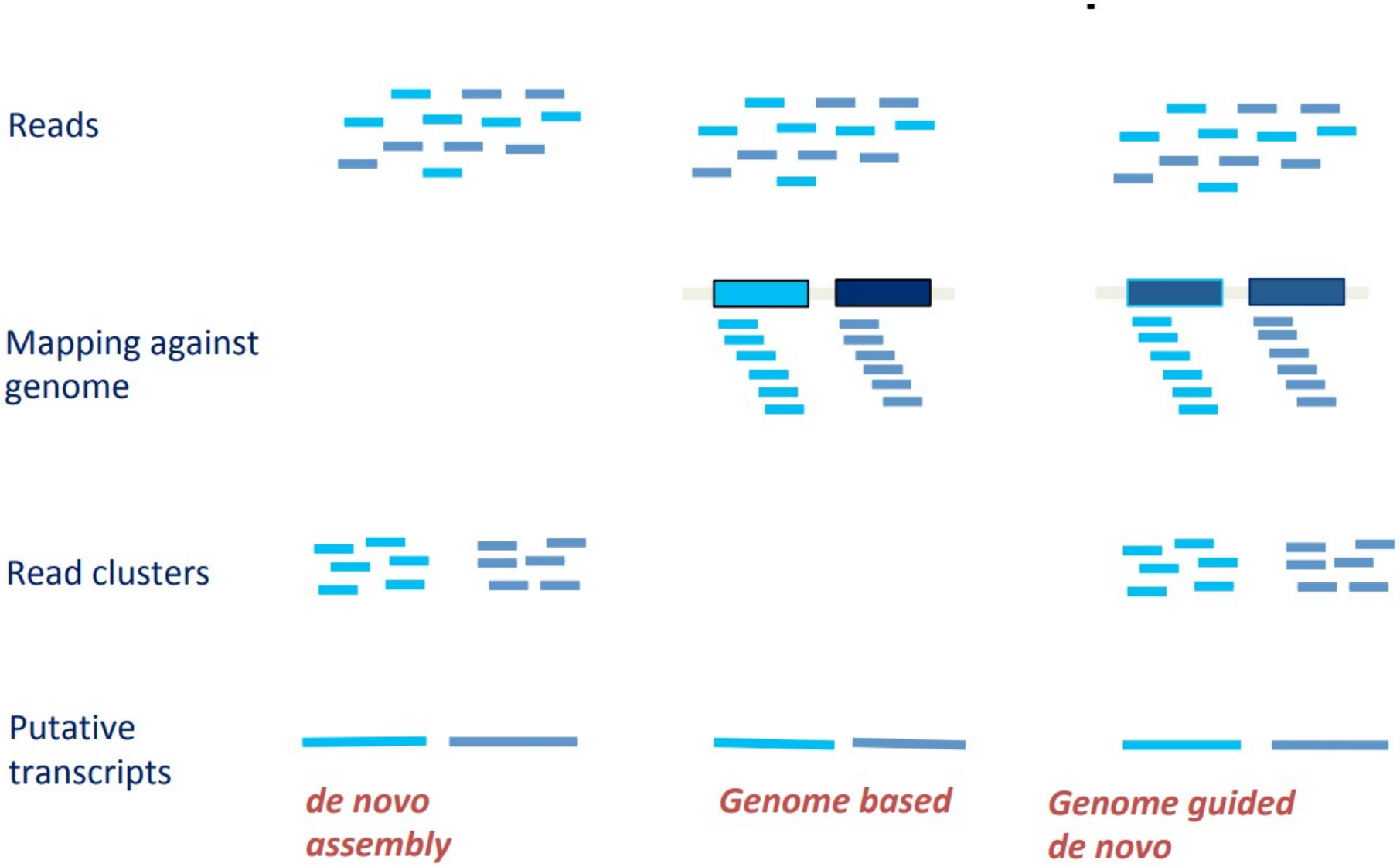


Figure 1. RNA-seq analysis workflow. Left panel (1) represents the raw gene expression quantification workflow. Every box contains the algorithms and methods used for the RNA-seq analysis at trimming, alignment, counting, normalization and pseudoalignment levels. The right panel (2) represents the algorithms used for the differential gene expression quantification. **HTSeq* was performed in two modes: union and intersection-strict. ***EdgeR exact* test, *edgeR GLM* and *NOISeq* have internally three normalization techniques that were evaluated separately.

2- Des reads aux transcrits

Des reads aux transcrits



From http://www.bioinformatics.nl/courses/RNAseq/1c%20Assembly.pdf

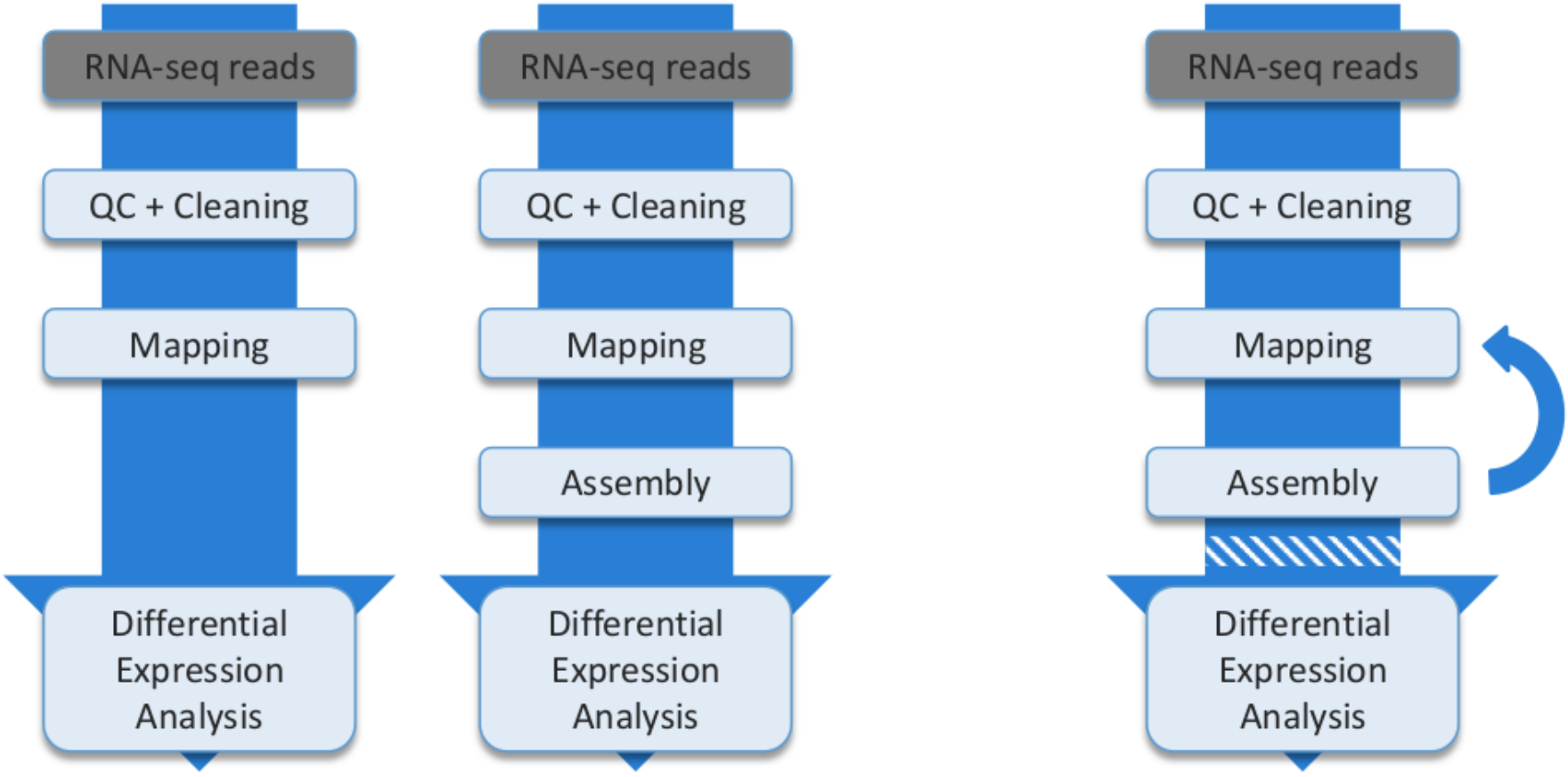
Vision Global of RNAseq

- Reference genome
- Reference transcriptome

- Reference genome
- No reference transcriptome

Non discovery mode

Discovery mode



From Abims RNAseq Training oct 2018

Vérification de la qualité des données NGS

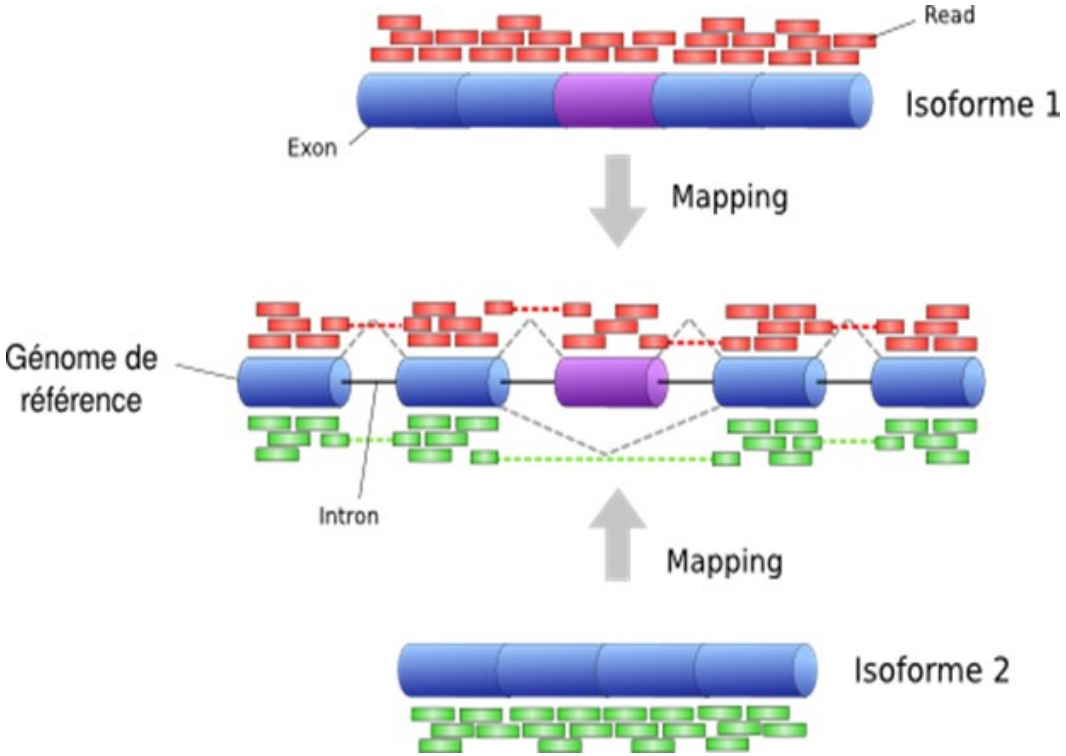
	Problème	Pourquoi les éliminer?	Outils
Sequences biases	Ns, mauvaise qualité des nucléotides, biases hexamères (random priming)	Pour éliminer des erreurs de sequencing. Désastreux pour la plupart des assembleurs	PRINSEQ2 FASTX Toolkit *Trimmomatic* *Fastp*
Adaptors and primers	Peuvent être trouvés dans le 3' final d'un insert très court	Des ponts entre séquences sans relation aucune: Chimères	*Fastp, Trimmomatic*, cutadapt, far, btrim, SeqTrim, TagCleaner, solexaQA
Poly A/T tails, low complexity reads	Des queus poly A/T peuvent etre laissés pendant la préparation de la librairie	Des ponts entre séquences sans relation aucune: Chimères	*PRINSEQ2* *Fastp*
Contaminations	RNA Ribosomal RNA/DNA etrangere (PhiX, Bacteria, ...)		SortMeRNA, riboPicker, DeconSeq

Practice : Nettoyage des reads

TP Fastp

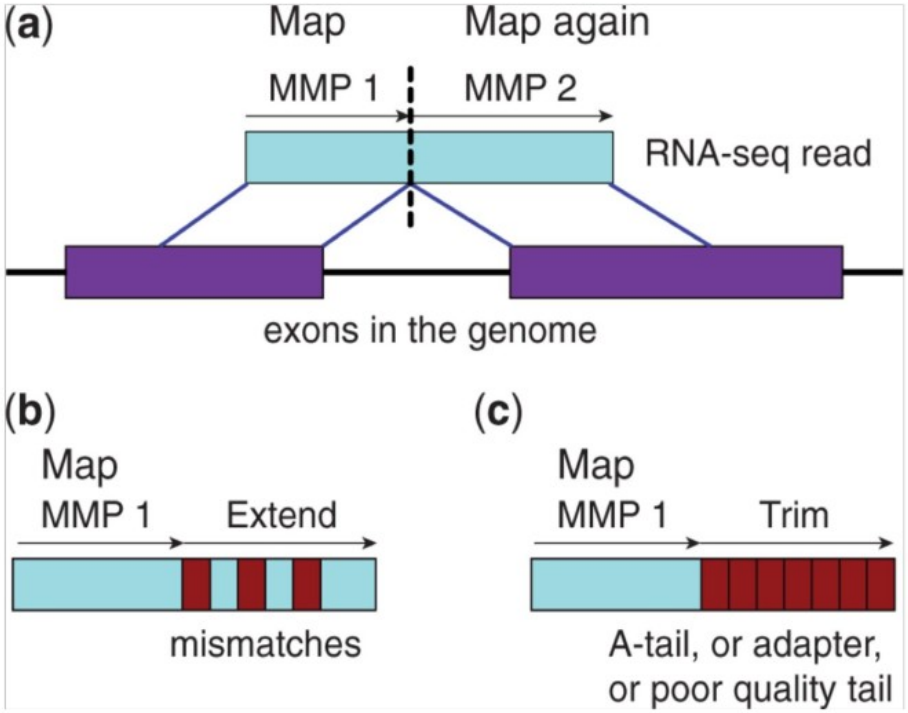
Mapping sur référence

- Permet la mise en évidence d'isoformes
- Aide à l'annotation structurale du génome



STAR

1st step Maximum Mapability Prefix search
-> no mismatches



2nd step :
At the second stage STAR switches MMPs to generate read-level alignments that (contrary to MMPs) can contain mismatches and indels.

STAR is extremely fast but requires a substantial amount of RAM to run efficiently.

A. Dobin & *al.*, *Bioinformatics*, 2013

SAM format

```
@SQ     SN:sctg_997     LN:6840
@SQ     SN:sctg_998     LN:6818
@SQ     SN:sctg_999     LN:6999

@PG     ID:TopHatVN:2.0.3

HWI-ST132_0435:3:63:3889:100528#GATCAG

0
sctg_0
476
3
73M
*
0
0

CCCGCCGCTCCATGATCTCCAAGAGGCGCAGCTCTCGCAAGGCTTCCGCCAAGGTGGTGGCTT
ggggggggggggggggggggggggggggeeeggeeggYb^ce^bbbc_cac[ddacaa_c

AS:i:0 XN:i:0 XM:i:0 XO:i:0 XG:i:0 NM:i:0 MD:Z:73 YT:Z:UU XS:A:+ NH:i:2
CC:Z:sctg_861 CP:i:9032  HI:i:0
```

Reference sequence dictionary

Program

Sequence ID

Flag
Reference sequence name
Leftmost mapping position
Mapping quality
CIGAR string
Reference of the mate/next read
Mapping position of mate/next read
Insert size

Sequence ID
Quality

Mapper tag

htpp://samtools.sourceforge.net/SAMv1.pdf

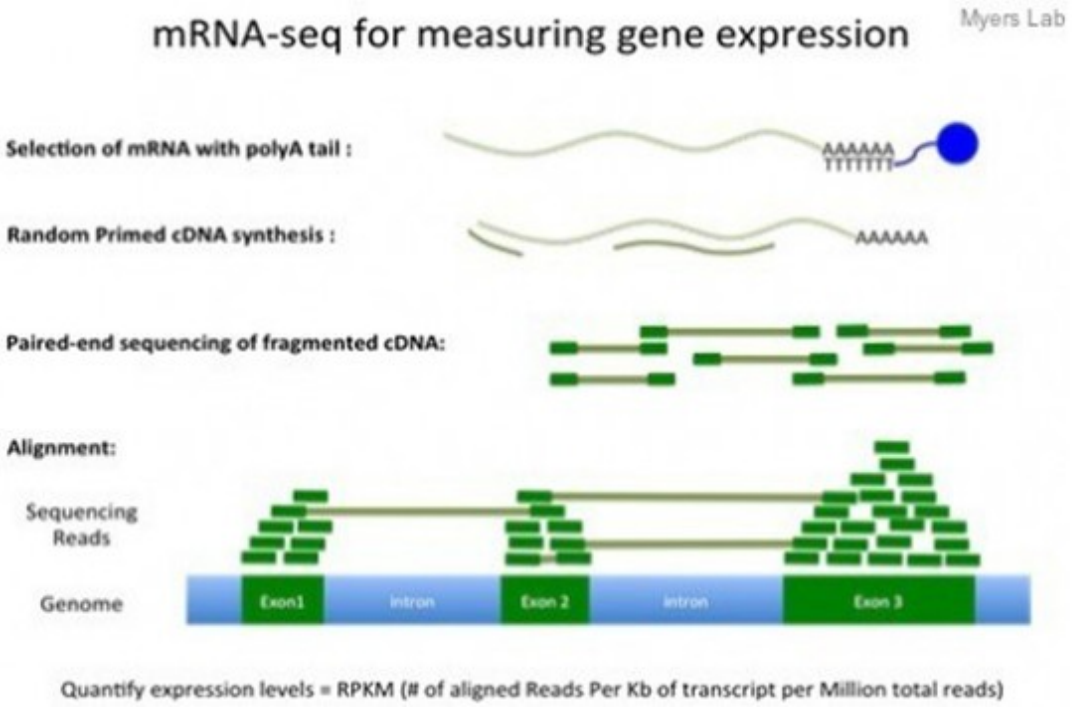
source: Abims RNAseq formation 2018

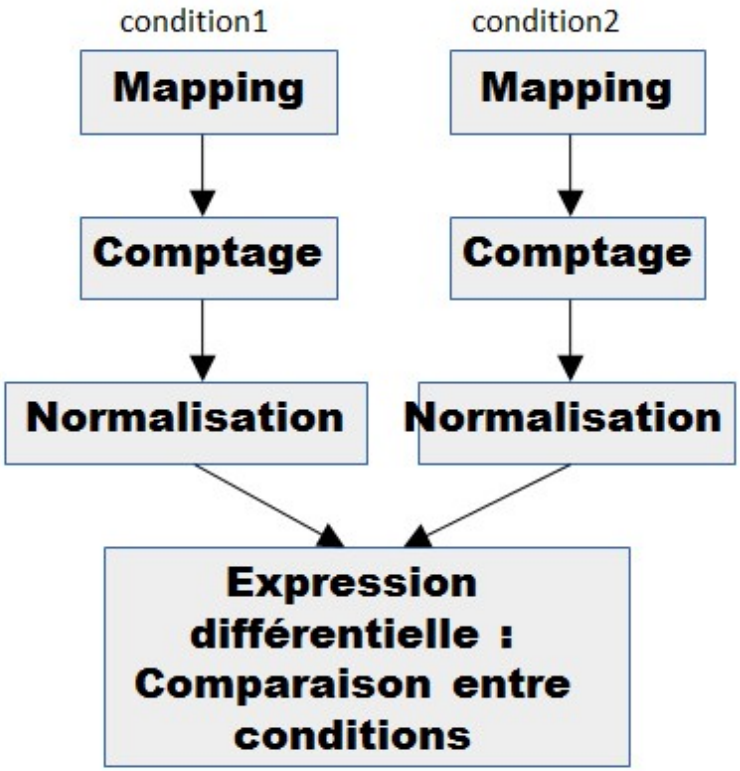
Practice : Mapping

TP Mapping

3- Comptage

Principe du comptage des reads





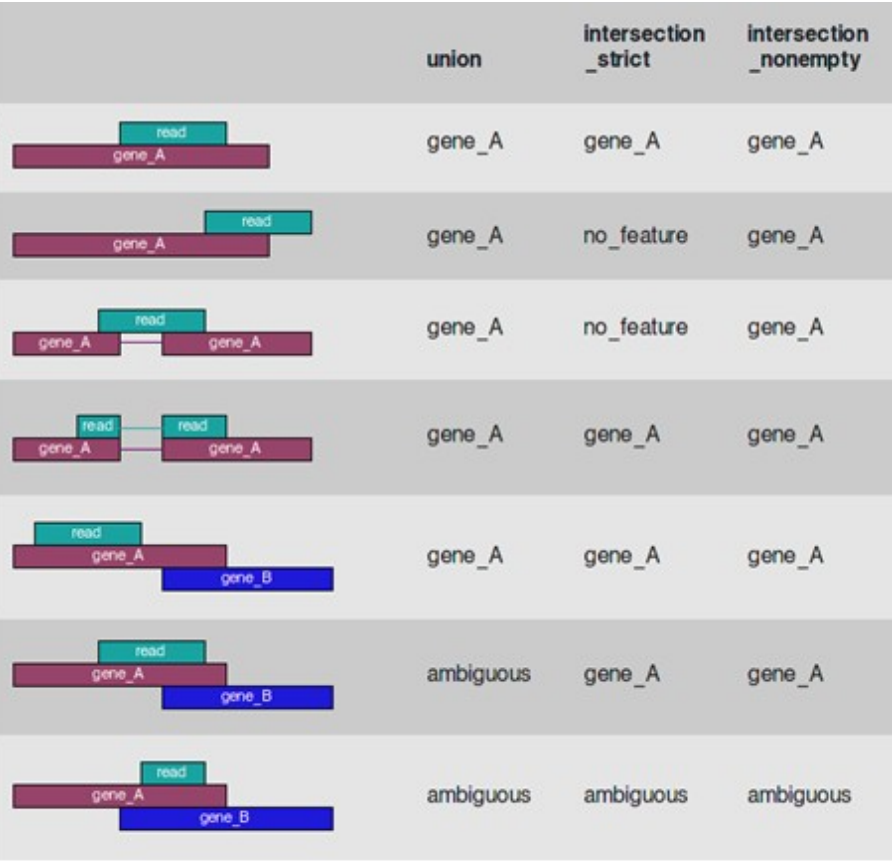
Choix de l'outil de comptage

1) Si le mapping a été fait sur un génome de référence annoté

=> Utilisation de HTSeq-count (prend en entrée l'annotation GFF)

2) Si le mapping a été fait sur un transcriptome de référence

=> samtools idxstats



gtf/gff Format

GFF (general feature format) is a file format used for describing genes and other features of DNA, RNA and protein sequences.

gff3

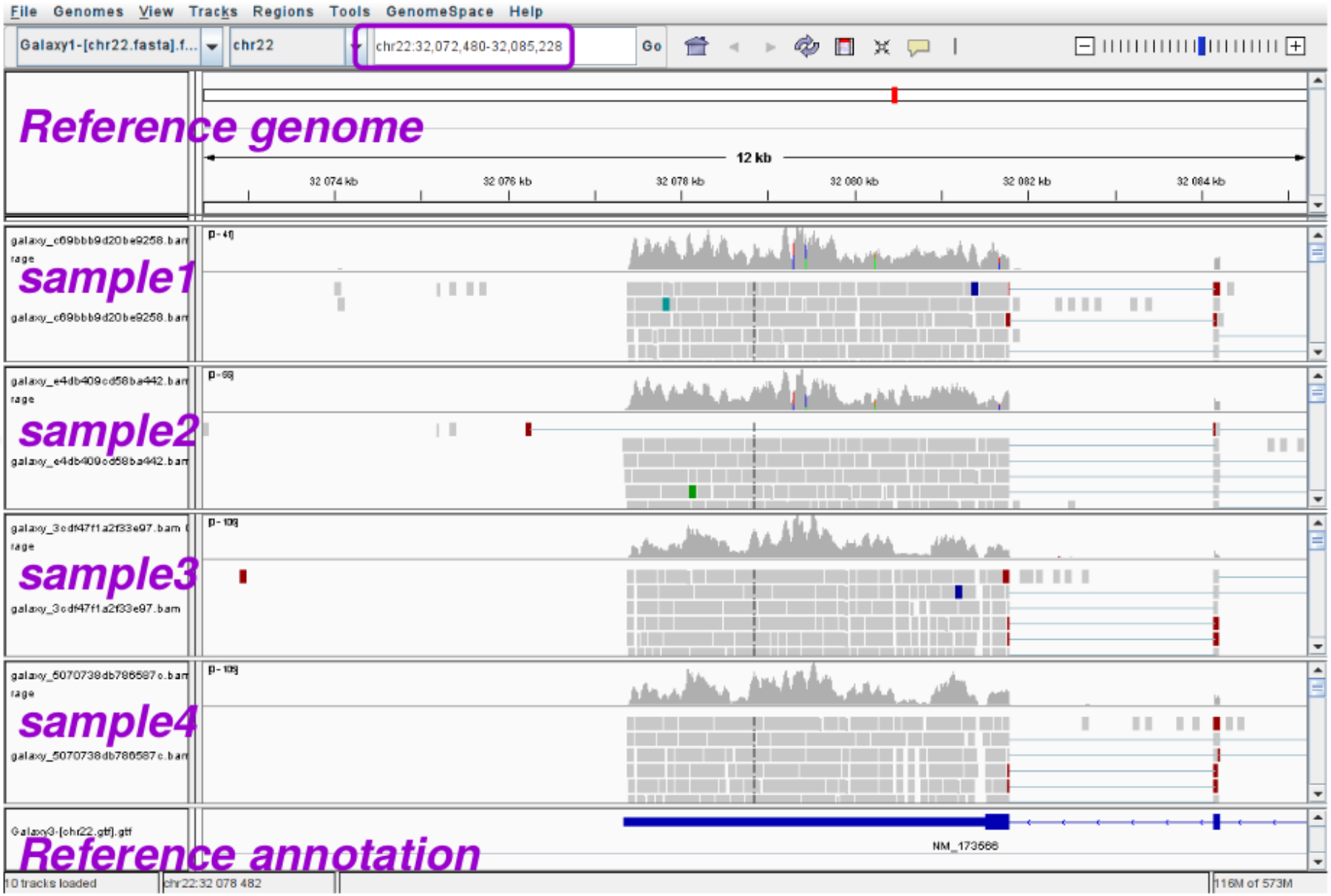
Seqname	Source	Feature	Start	End	Score	Strand	Frame	Attribute
chr22	protein_coding	gene	19701987	19712295	.	+	.	ID=ENSG00000184702;Name=SEPT5
chr22	protein_coding	mRNA	19707711	19708397	.	+	.	ID=ENST00000413258;Name=SEPT5-016;Parent=ENSG00000184702
chr22	protein_coding	protein	19707711	19708397	.	+	.	ID=ENSP00000404673;Name=SEPT5-016;Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	CDS	19707711	19707761	.	+	1	Name=CDS:SEPT5;Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	CDS	19707843	19707977	.	+	1	Name=CDS:SEPT5;Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	CDS	19708165	19708189	.	+	1	Name=CDS:SEPT5;Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	CDS	19708291	19708397	.	+	0	Name=CDS:SEPT5;Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	exon	19707711	19707761	.	+	.	Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	exon	19707843	19707977	.	+	.	Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	exon	19708165	19708189	.	+	.	Parent=ENST00000413258
chr22	protein_coding	exon	19708291	19708397	.	+	.	Parent=ENST00000413258

source: Abims RNAseq formation 2018

Practice : Comptage

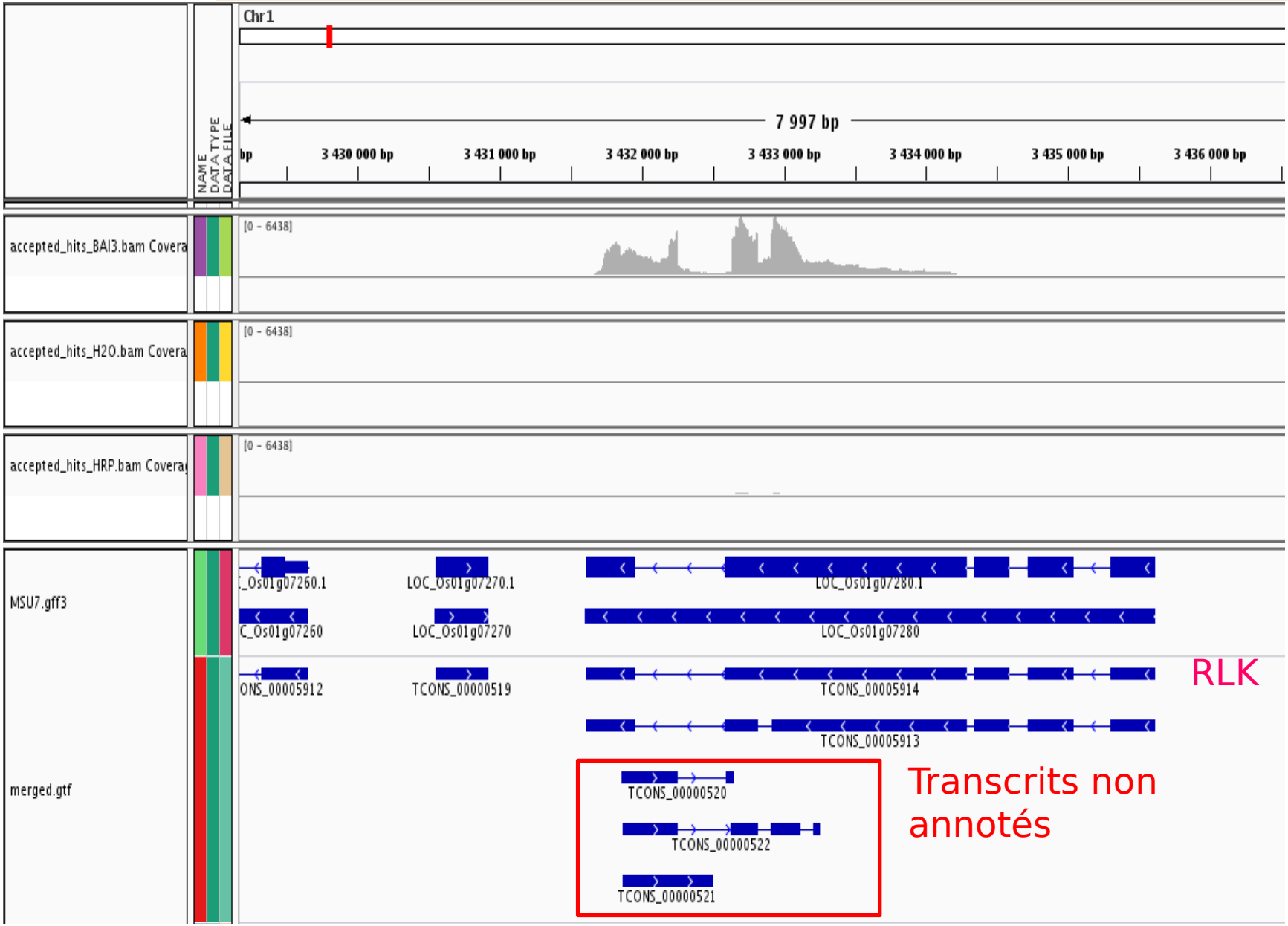
TP Comptage

Local Genome Browser (IGV)



source: Abims RNAseq formation 2018

Local Genome Browser (IGV)



Practice Présentation des données DIANE

Recherche de gènes différentiellement exprimés

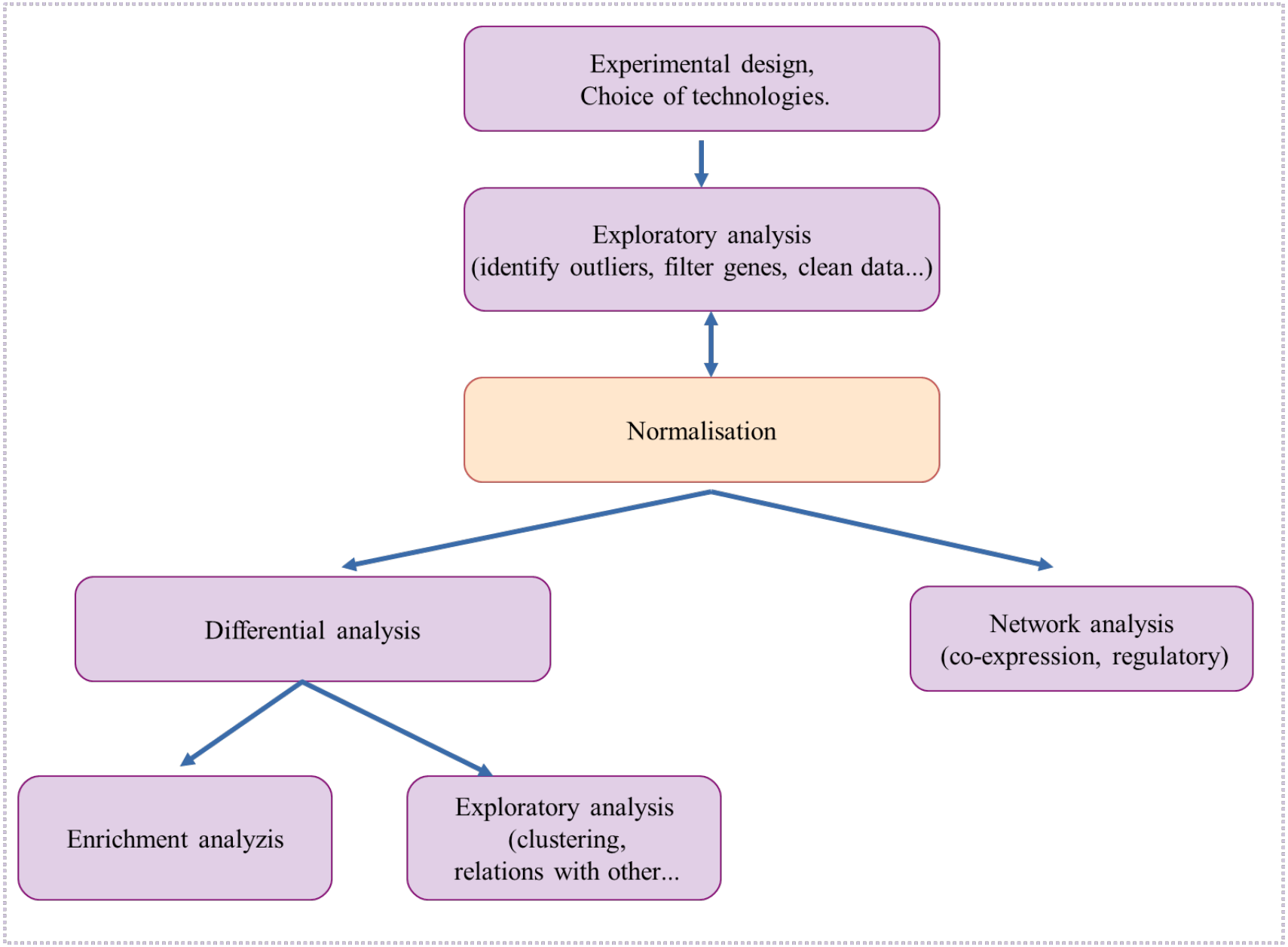
L'analyse différentielle

- Un gène est déclaré **différentiellement exprimé** (DE) entre 2 conditions si la différence d'expression observée est **statistiquement significative** i.e plus grande qu'une variation naturelle aléatoire.

  - Besoin d'un test statistique
  - Les principals étapes de l'analyse :
    - Design experimental
    - Normalization
    - Analyse différentielle
    - Tests statistiques mutiples

4- Normalisation des données

Normalisation des données



Normalisation des données

- **Identifier et corriger** les biais techniques dus au séquençage, pour les rendre comparable
  - S'assurer que les données sont exploitables
  - Réduire les bias techniques expérimentaux
  - De pouvoir comparer les données des différentes conditions entre elles
  - De s'approcher des hypothèses favorables pour l'analyse différentielle (distribution gaussiennedes données

- **Types** de Normalisation :
  - Intra-échantillon (même séquençage)
  - Inter-échantillon (deux séquençage)

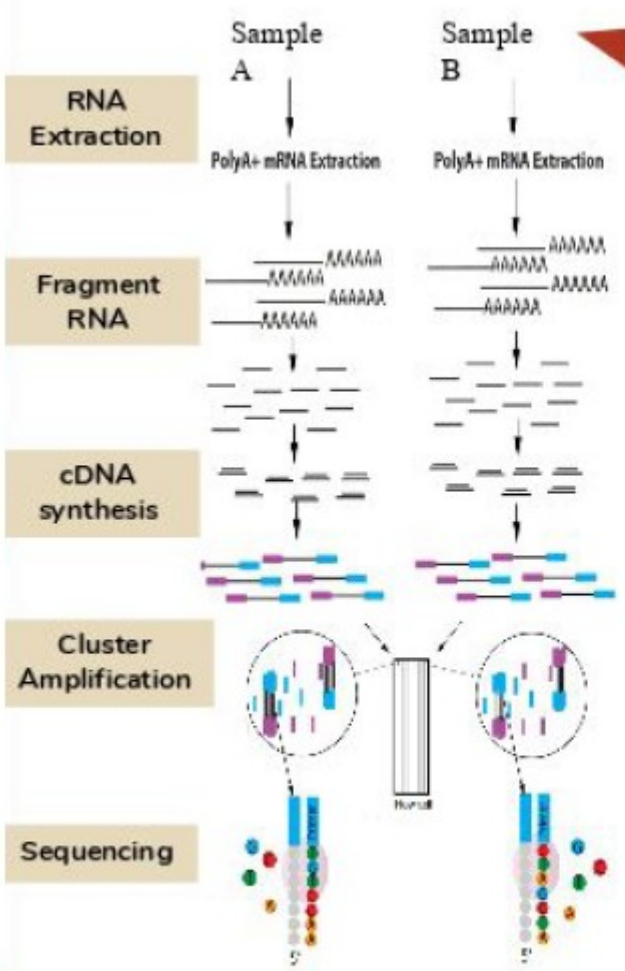
- Ce qui **influence** la normalisation:
  - Taille de la banque
  - Longueur de gènes
  - Composition en GC

Normalisation des données

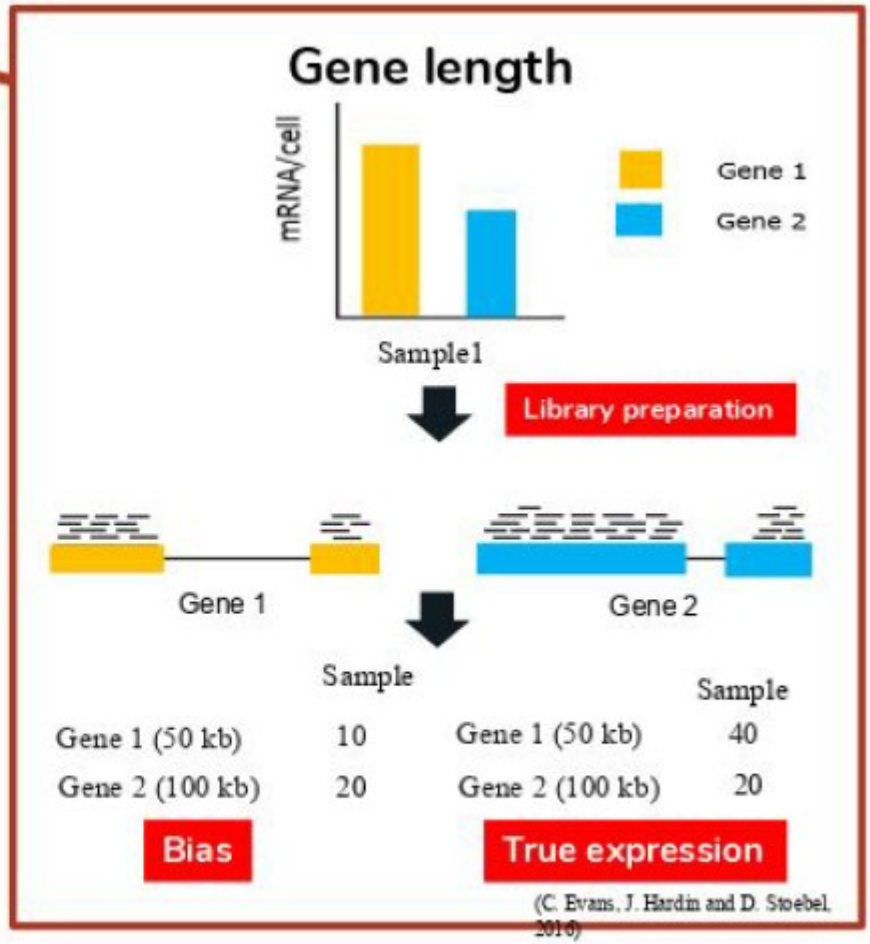
- **Pourquoi réaliser une normalisation ?**

  - Entre échantillon -> Comparer le niveau d'expression d'un gène entre différent échantillons
    - Profondeur du séquençage == taille de la banque
    - Biais d'échantillonnage durant la construction de la banque == effet batch
    - Présence de fragments majoritaires == saturation
    - Composition de la séquence dûe à l'étape d'amplification PCR (composition en GC)
  - Parmi les échantillons -> comparer les gènes dans un échantillon
    - Longueur des gènes
    - Composition de la séquence (GC content)

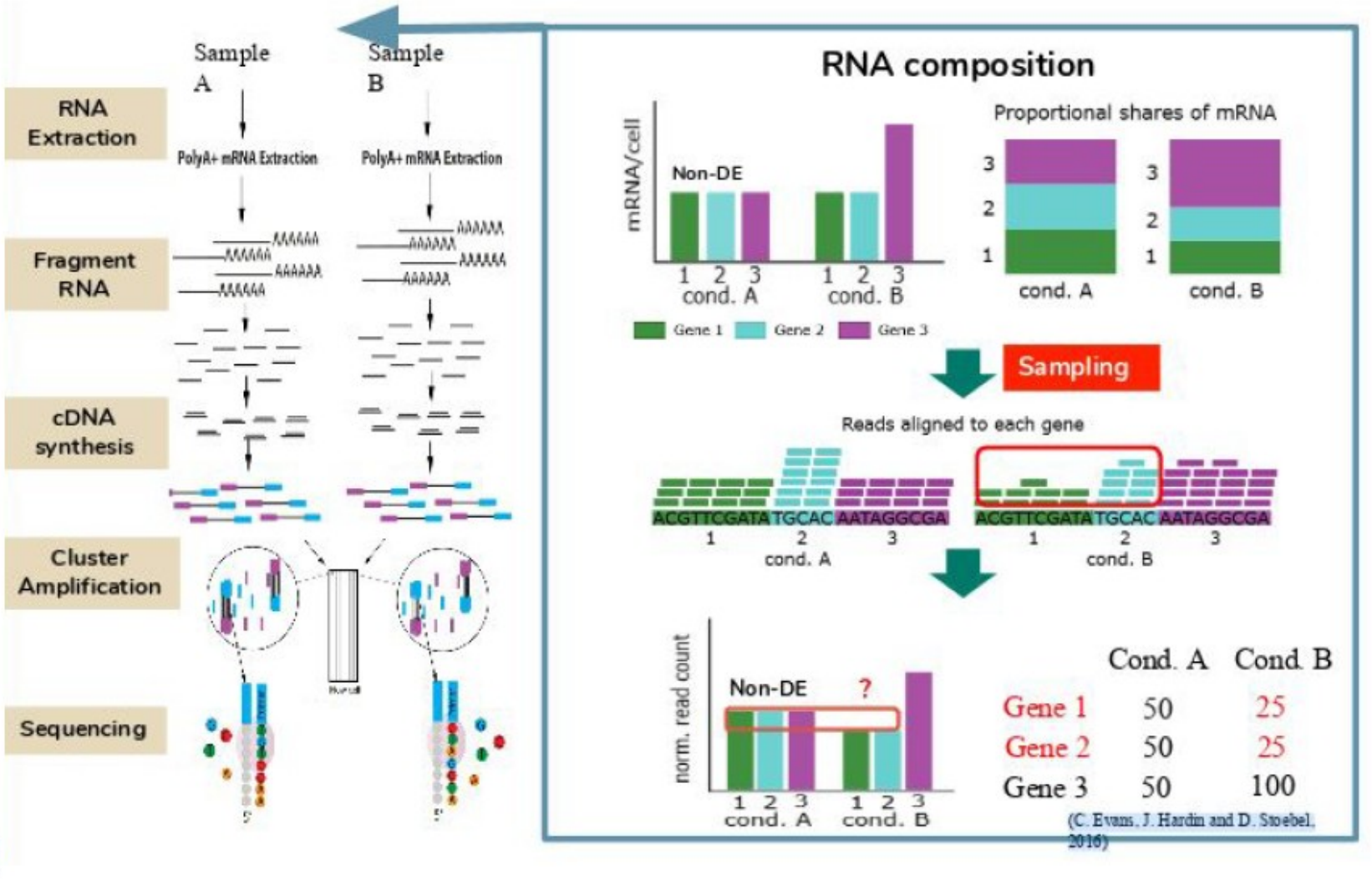
Normalisation des données



(B)

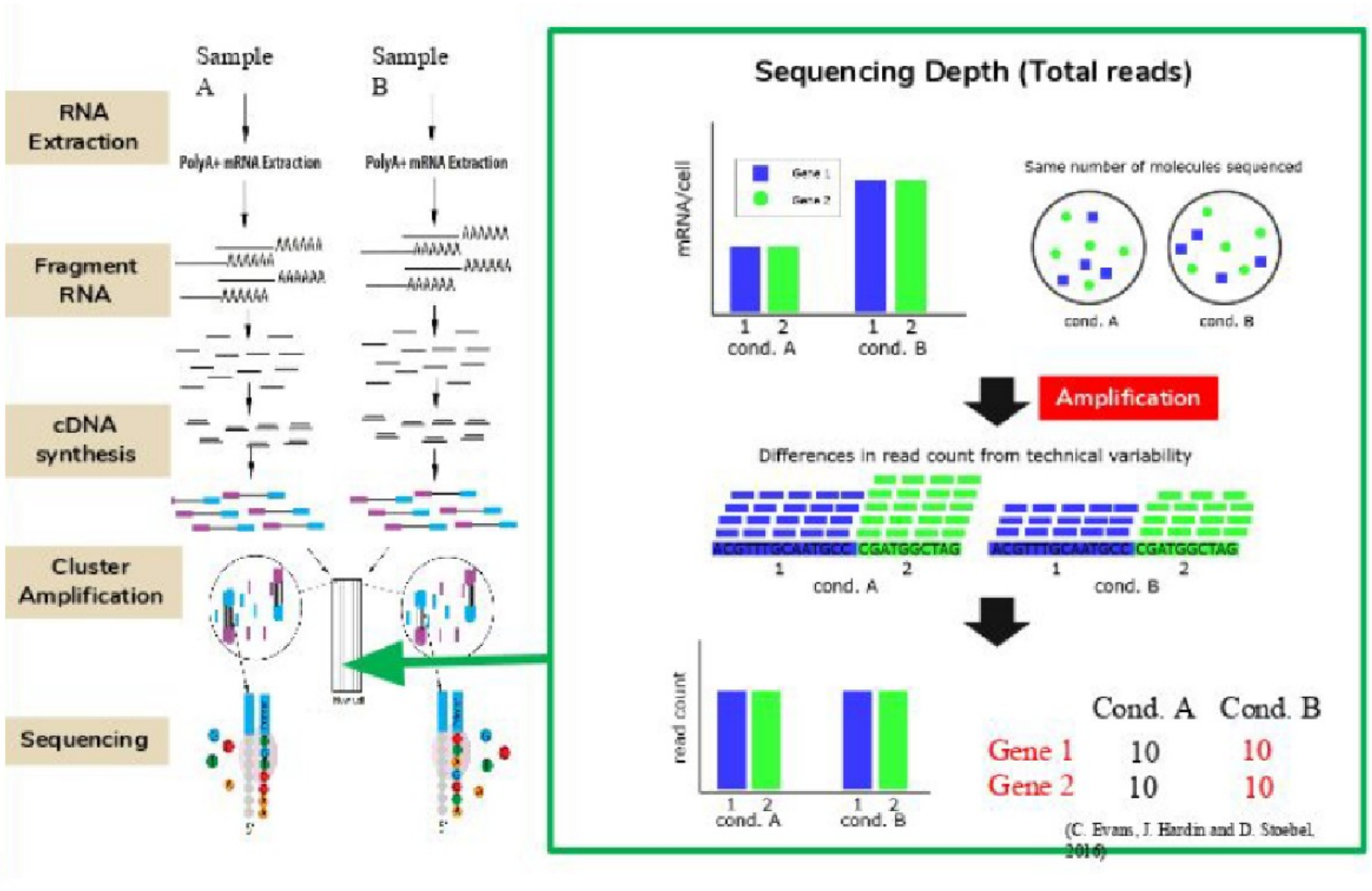


Normalisation des données



(C)

Normalisation des données



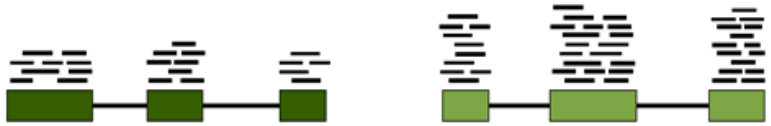
Normalisation des données

- **Facteurs à prendre en compte avant la comparaison des conditions :**
  - Taille de la banque (i.e. profondeur de séquençage) qui varie entre échantillons venant de différentes lanes de la flow cell du séquenceur.
  - Longueur des gènes ayant nombre important de séquences
  - Composition de la banque (taille relative du transcriptome) peut être différente entre deux conditions biologiques
  - Composition en GC parmi différent échantillons peut conduire à un biais d'échantillonnage des gènes (Risso et al, 2011)
  - La couverture des séquences des transcrits peut être biaisée et non uniformément distribuée le long du transcrit (Mortazavi et al, 2008)

Normalisation des données

	sample 1	sample 2	sample 3
gene A	752	615	1203
gene B	1507	1225	2455

Le comptage du gène B est deux fois plus important que pour le gène A, pourquoi ?



Le nombre de transcrits pour le gène B est deux fois plus important que pour le gène A

Les deux gènes ont le même nombre de transcrits,
mais le gène B est deux fois plus long que le gène A.

- Permettre la comparaison de gènes pour un même échantillons.
- Les sources de variabilités : longueur du gène et composition en GC.

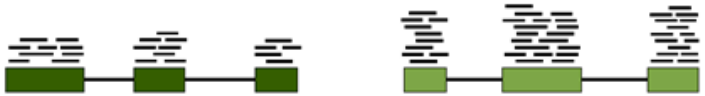
Normalisation des données

	sample 1	sample 2	sample 3
gene A	752	615	1203
gene B	1507	1225	2455

Le comptage dans l'échantillon 3 est plus important que dans l'échantillon 2.

gene A in sample 2 gene A in sample 3

Le gène A est plus exprimé dans l'échantillon 3 que dans le 2.



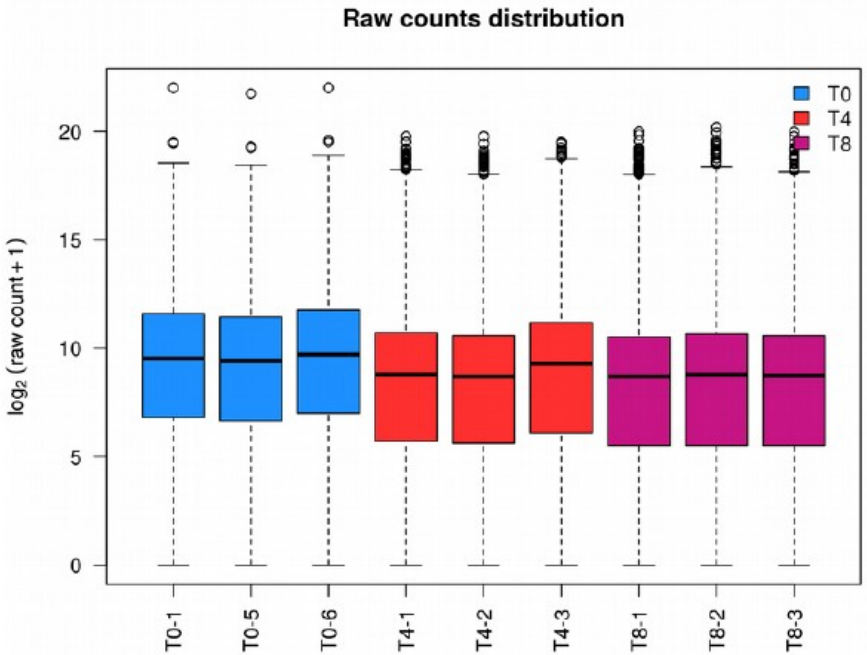
gene A in sample 2 gene A in sample 3

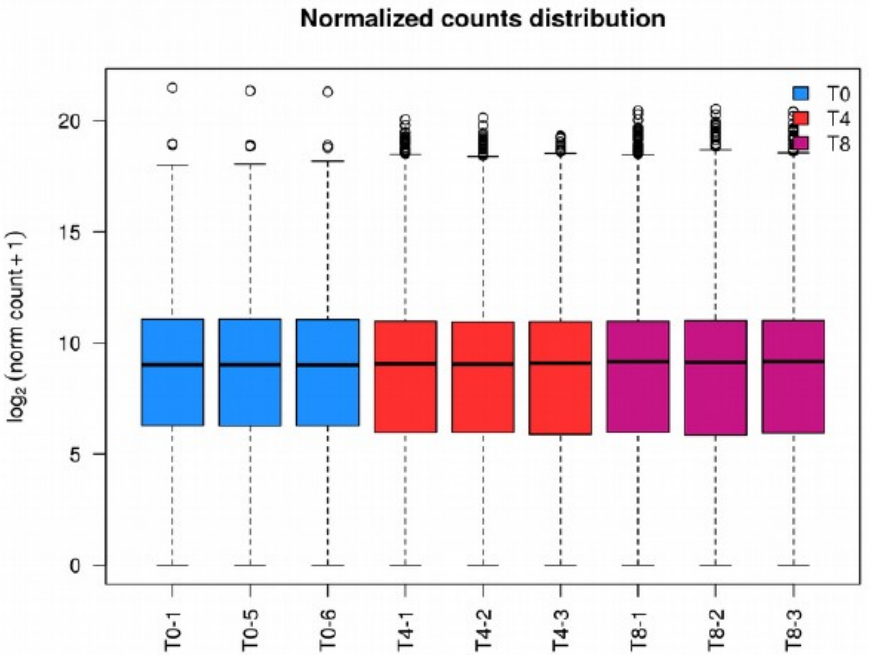
Le gène A est exprimé dans les échantillons 2 et 3, mais la profondeur de séquençage est plus importante dans l'échantillon 3 que dans le 2 (différences de taille des librairies).

- Permettre la comparaison de gènes pour différents échantillons.
- Les sources de variabilités : taille des librairies

Normalisation des données

Effet de la normalisation :
Variance des banques RNAseq avant et après normalisation





Méthodes de Normalisation

Méthodes de Normalisation Intra-banques

Objectif : calculer un facteur d'échelle appliqué à chaque banques

- **Total Count** (TC) : On divise chaque nombre de reads par le nombre total de reads (c'est-à-dire la taill de la banque) et on multiplie par le nombre moyen de reads des banques.

- **Upper Quartile (UQ) :**

  - **Objectif** : On applique la méthode TC en remplaçant le nombre total de reads par le $3^{ième}$ quartile des comptes différents de 0.
    - Normalisation moins sensible aux valeurs extremes
    - Normalisation plus robuste, notamment dans le cas où plusieurs genes très abundant sont déférentiellmenet exprimés.

- **Reads Per Kilobase per Millions** (RPKM) :
  - **Objectif** : réaliser une normalization qui tient compte de la taille de la banque (par une méthode de type Total Count) et de la longueur des genes.
    - Mélange normalization inter et intra banque
    - Permet de comparer les genes entres eux mais inadaptée pour comparer 2 conditions sur un même gene.

Méthodes de Normalisation

Méthodes de Normalisation Intra-banques

Objectif : calculer un facteur d'échelle appliqué à chaque banques

- **TMM :** Trimmed Mean of M-values
  - TMM normalization method Considère que la plupart des gènes ne sont pas différentiellment exprimés.
  - TMM normalise l'output totale d'ARN parmi les échantillons et ne tient pas compte de la longueur du gène ou de la taille de la bibliothèque pour la normalisation.
  - Le TMM sera un bon choix pour éliminer les effets de lot tout en comparant les échantillons de différents tissus ou génotypes ou dans les cas où la population d'ARN serait significativement différente parmi les échantillons.
  - TMM is implemented in edgeR and performs better for between-samples comparisons
  - edgeR does not consider gene length for normalization as it assumes that the gene length would be constant between the samples

- **RLE** : Relative Log Expression (RLE) : Semblable à TMM, cette méthode de normalisation est basée sur l'hypothèse que la plupart des gènes ne sont pas DE. Pour un échantillon donné, le facteur d'échelle RLE est calculé comme la médiane du rapport, pour chaque gène, de son nombre de lectures sur sa moyenne géométrique sur tous les échantillons.

Méthodes de Normalisation

Méthodes de Normalisation Intra-banques

Objectif : calculer un facteur d'échelle appliqué à chaque banques

- **Méthode Total Count (TC) => Peu efficace**
  - **Pas de prise en compte des différences possibles entre les compositions en ARN des conditions.**
- **Méthode RPKM => Peu efficace**
  - **Même dans le cas où un biais lié à la longueur des gènes existe, l'utilisation du RPKM ne permet pas de le corriger complètement.**
- **Méthode à Privilégier => Upper-Quartile, RLE, TMM**
  - **Même dans le cas où un biais lié à la longueur des gènes existe, l'utilisation du RPKM ne permet pas de le corriger complètement.**

Méthodes de Normalisation

Méthodes de Normalisation Intra-banques
Les bais techniques

- **Effet de la Taille de la Banque :**
  - Deux échantillons de même composition en ARN.
    - Une banque pour chaque échantillon
    - Banque A : 2 781 315 reads
    - Banque B : 2 254 901 reads
    - On aura donc artificiellement 1,2334 fois plus de reads dans A que dans B
    - Pourtant les quantités "réelles" sont identiques
    - Bias de la Taille de la banque
- **Effet de la Longueur des Gènes:**
  - Pour un même niveau d'expression.
    - Un long transcrits est plus facilement séquencé
    - Donc plus de reads
    - Il sera plus facilement mis en evidence en DE
    - Corriger le Bias

5- Choix de la méthode de normalisation

Résumé Choix des traitements statistiques

Méthodes de Normalisation intra – banque

RLE , TMM, Upper-Quartile

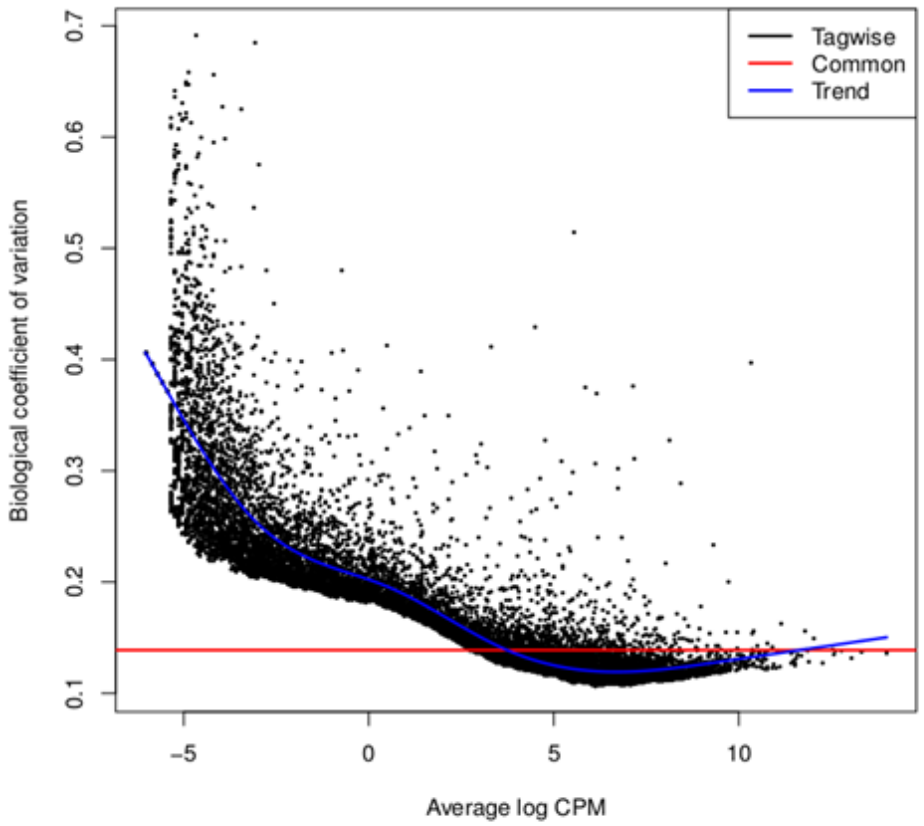
Correction par la variance

Loi binomiale négative

Edge R , DESeq

Méthodes basées sur les normalisations interbanques

EdgeR



Estimation de la dispersion
(entre réplicats biologiques)

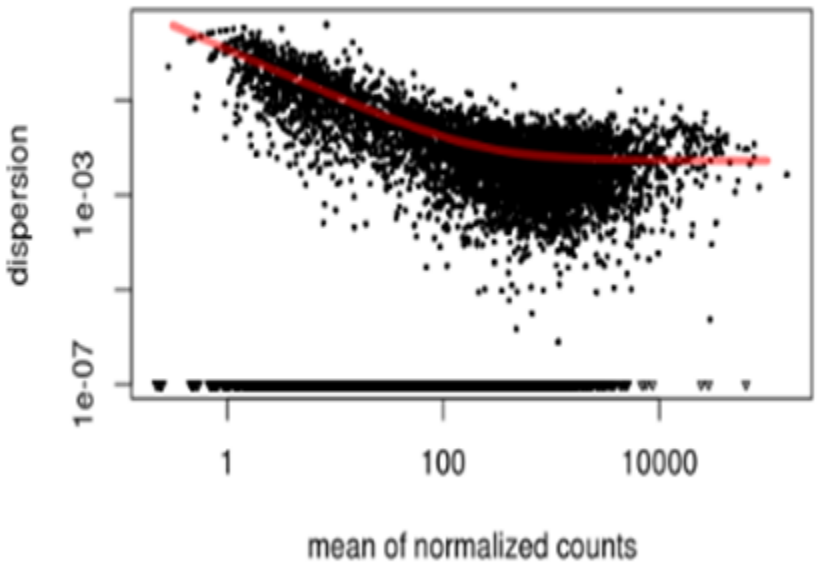
- utilisation de la valeur individuelle (« tagwise ») ou de la valeur ajustée « trend » ou « common » pour le calcul des tests statistiques de DE

- Utiliser la méthode « tagwise » lorsqu'on a au moins 4 réplicats
- Utiliser la méthode commune lorsqu'on a peu de réplicats (2 ou 3)

=> Utilisation de ces valeurs de dispersion pour le calcul des tests statistiques de DE (p-value)

Méthodes basées sur les normalisations interbanques

DESeq



Estimation de la dispersion

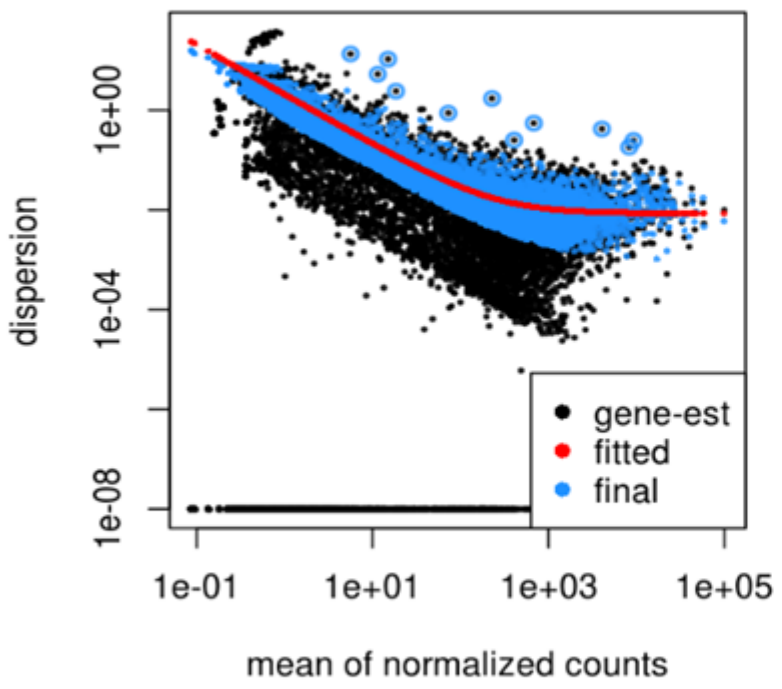
- utilisation de la valeur ajustée pour les transcrits dont l'estimateur individuel (en noir) inférieur à la valeur ajustée

- utilisation de la valeur individuelle pour les transcrits dont l'estimateur individuel est
supérieur à la valeur ajustée

=> Utilisation de ces valeurs de dispersion pour le calcul des tests statistiques de DE (p-value)
=> Plus sensible à la dispersion des données

Méthodes basées sur les normalisations interbanques

DESeq2



Estimation de la dispersion

- utilisation d'une valeur intermédiaire (en bleu) entre
la dispersion individuelle (en noir) et la dispersion ajustée (en rouge)

- utilisation de la dispersion individuelle si celle-ci est
considérée comme extrême par rapport à la distribution globale (points entourés de bleu)

=> Utilisation de ces valeurs de dispersion pour le calcul des tests statistiques de DE (p-value)

Méthodes de Normalisation

Comparaison des outils

Objectif : Choisir l'outils le plus adapté

- **DESeq** utilise une estimation de la variance qui la rend moins permissive pour les grandes variabilités entre conditions**.**
  - Dés qu'au moins l'une des conditions présente une variabilité importante, la méthode ne fait pas confiance à ce gène et ne va pas le considérer comme différentiellement exprimé.
  - En revanche, quand la variabilité intra-conditions est plus faible, DESeq fait plus confiance et sélectionne même les gènes qui ont un fold-Change plus faible que ceux sélectionnés par EdgeR.
  - DESeq est à privilégier pour des experimentations très répétables.

- **DESeq2 est plus souple, moins stringent et il détectera plus de gènes différentiellement exprimés.**

Practice : DIANE

TP Diane

Practice *Saccharomyces cerevisiae*

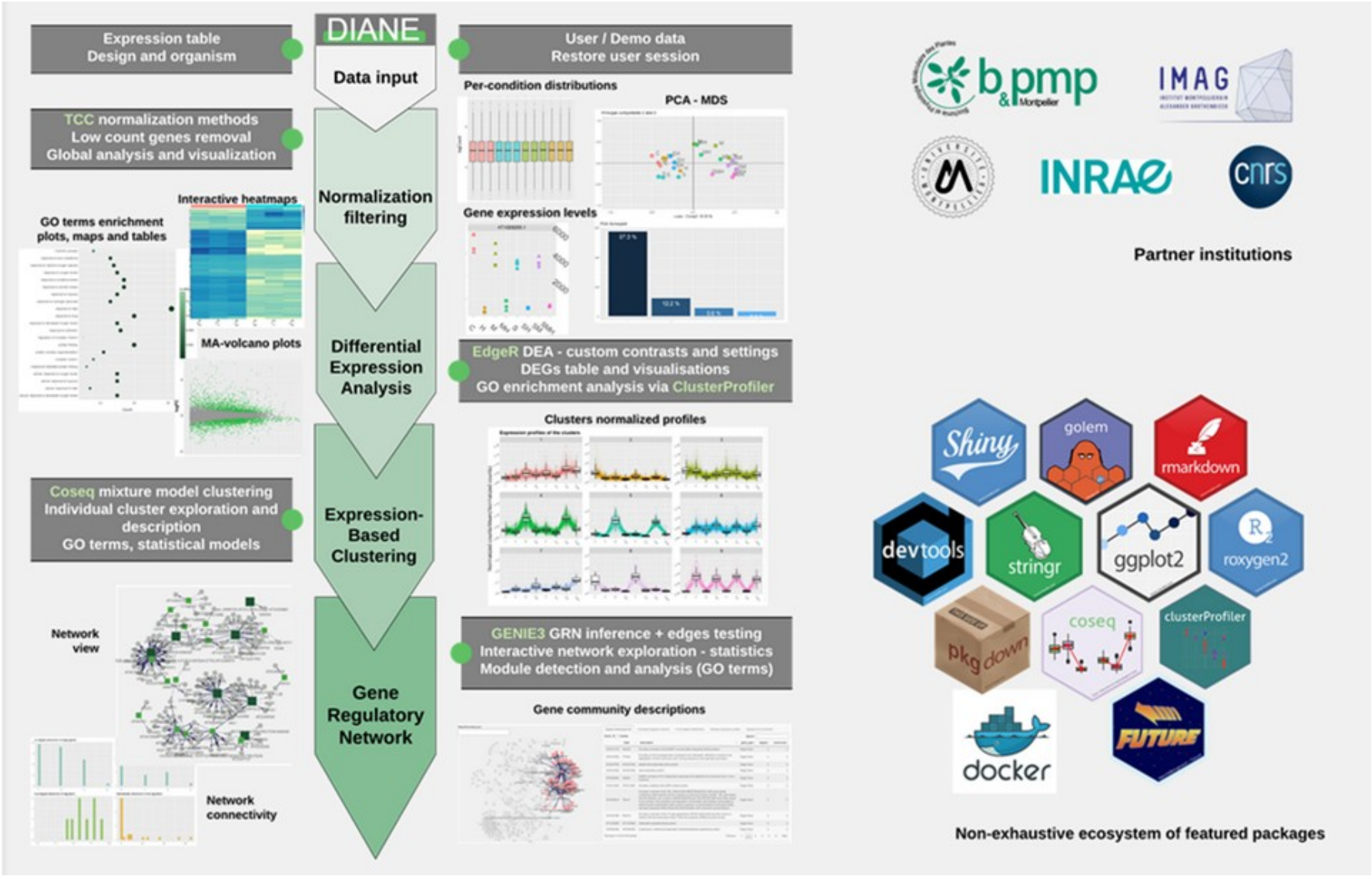
Data:

* ref : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488244/
* data : NCBI SRA database under accession number SRS307298 _*S. cerevisiae*_.
Genome size of _*S. cerevisiae*_ : 12M (12.157.105)
(https://www.yeastgenome.org/strain/S288C#genome_sequence)

Outils :
DIANE : (https://diane.bpmp.inrae.fr/)

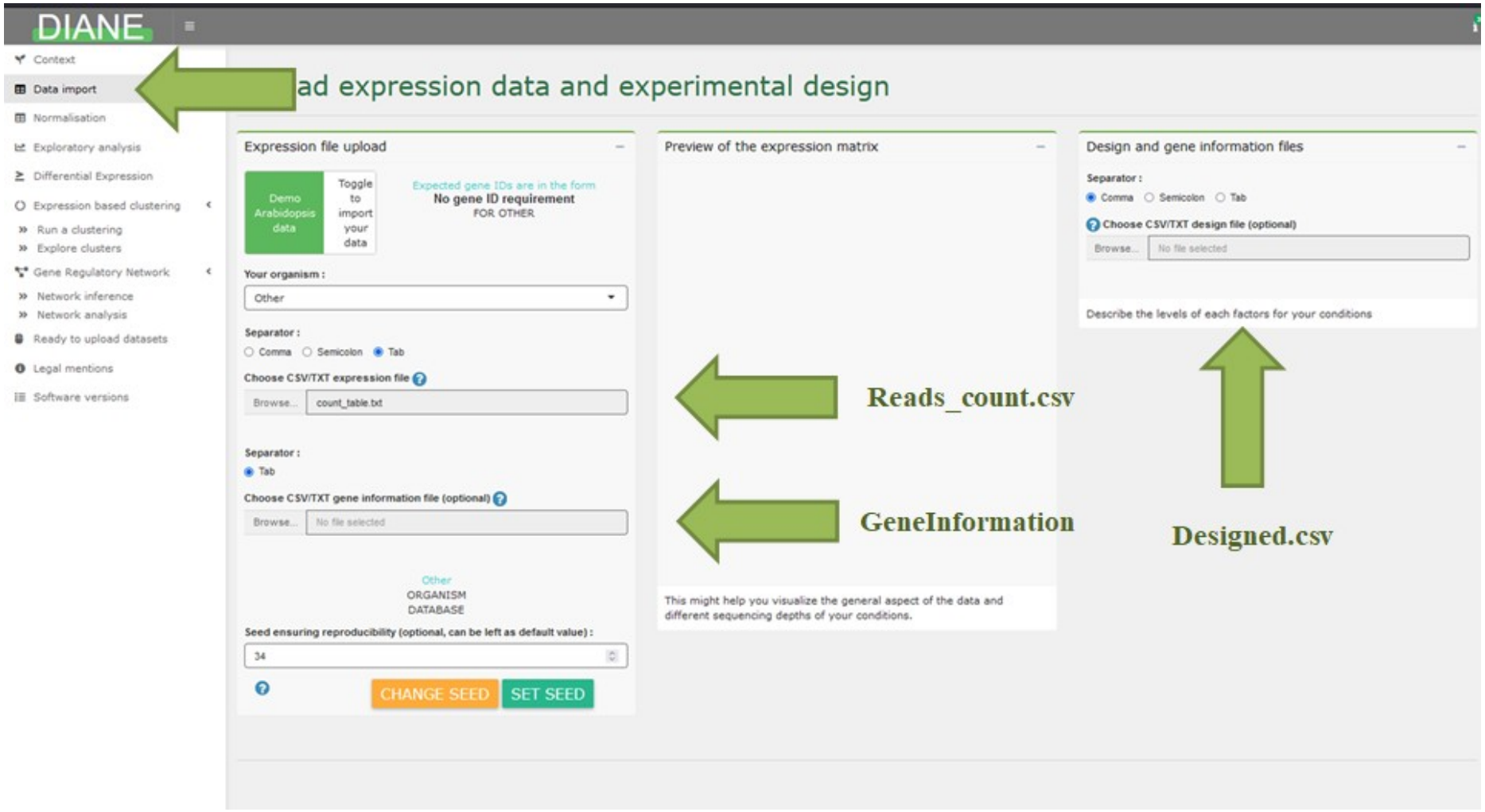
- Après avoir aligné les séquences contre la référence de Saccharomyces cerevisiae déterminer une liste de gènes différentiellement exprimés entre les conditions batch et CENPK.
  - Vous avez à votre disposition la matrice reads counts.
  - Etape 1 Normalisation :
    - Quelle est l'influence de la méthode de normalisation ,
      - tmm,
      - Deseq2
      - aucune normalization.
  - Etape 2 Analyse différentielle avec DIANE
  - Etape 3 Générer une liste et des graph, MA plot , volcano plot et Heatmap.

Practice DIANE Tools Presentation

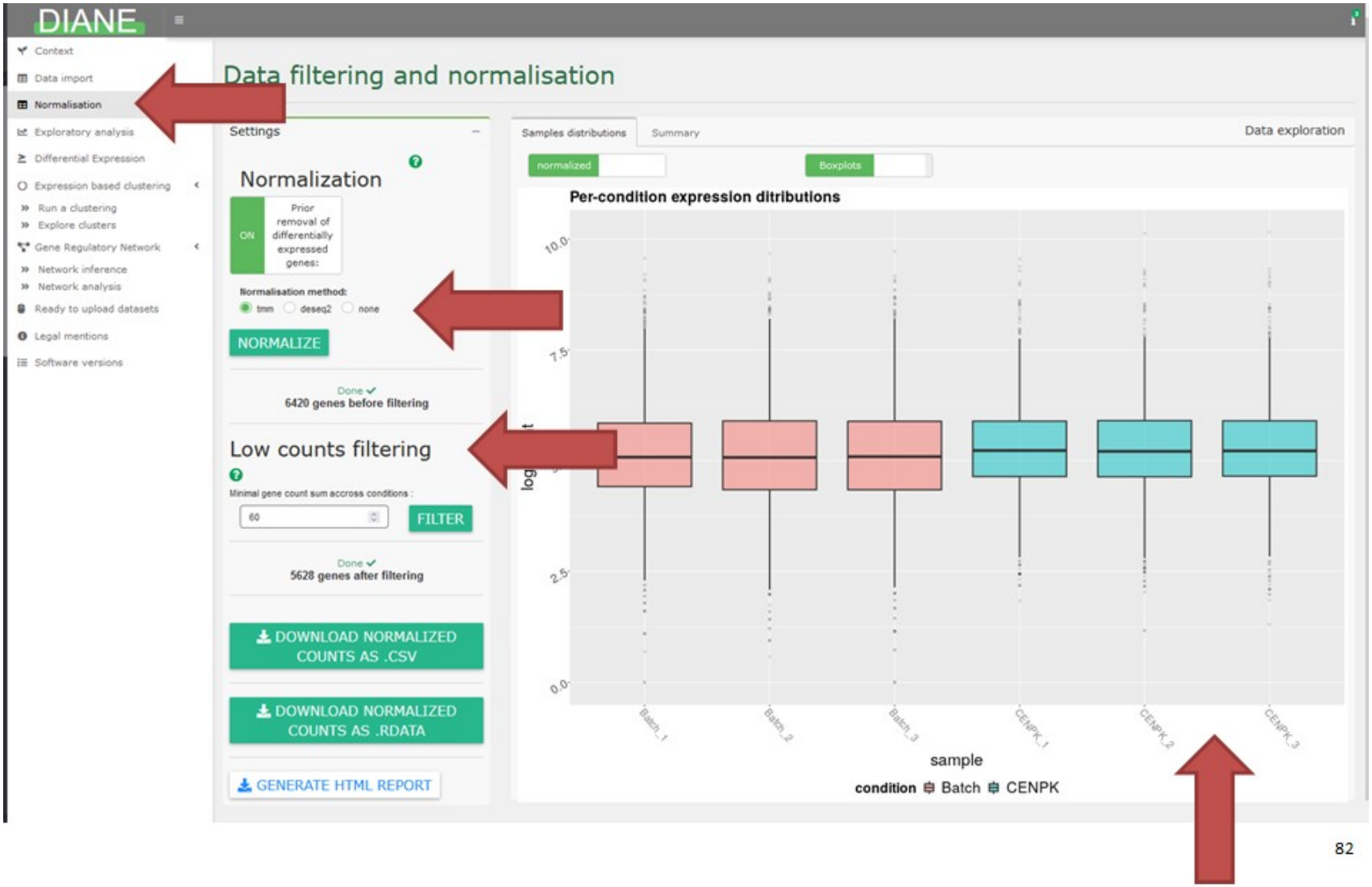


To cite DIANE in publication use:
Cassan, O., Lèbre, S. & Martin, A. Inferring and analyzing gene regulatory networks from multi-factorial expression data: a complete and interactive suite. BMC Genomics 22, 387 (2021). https://doi.org/10.1186/s12864-021-07659-2

Practice : DIANE Import Data



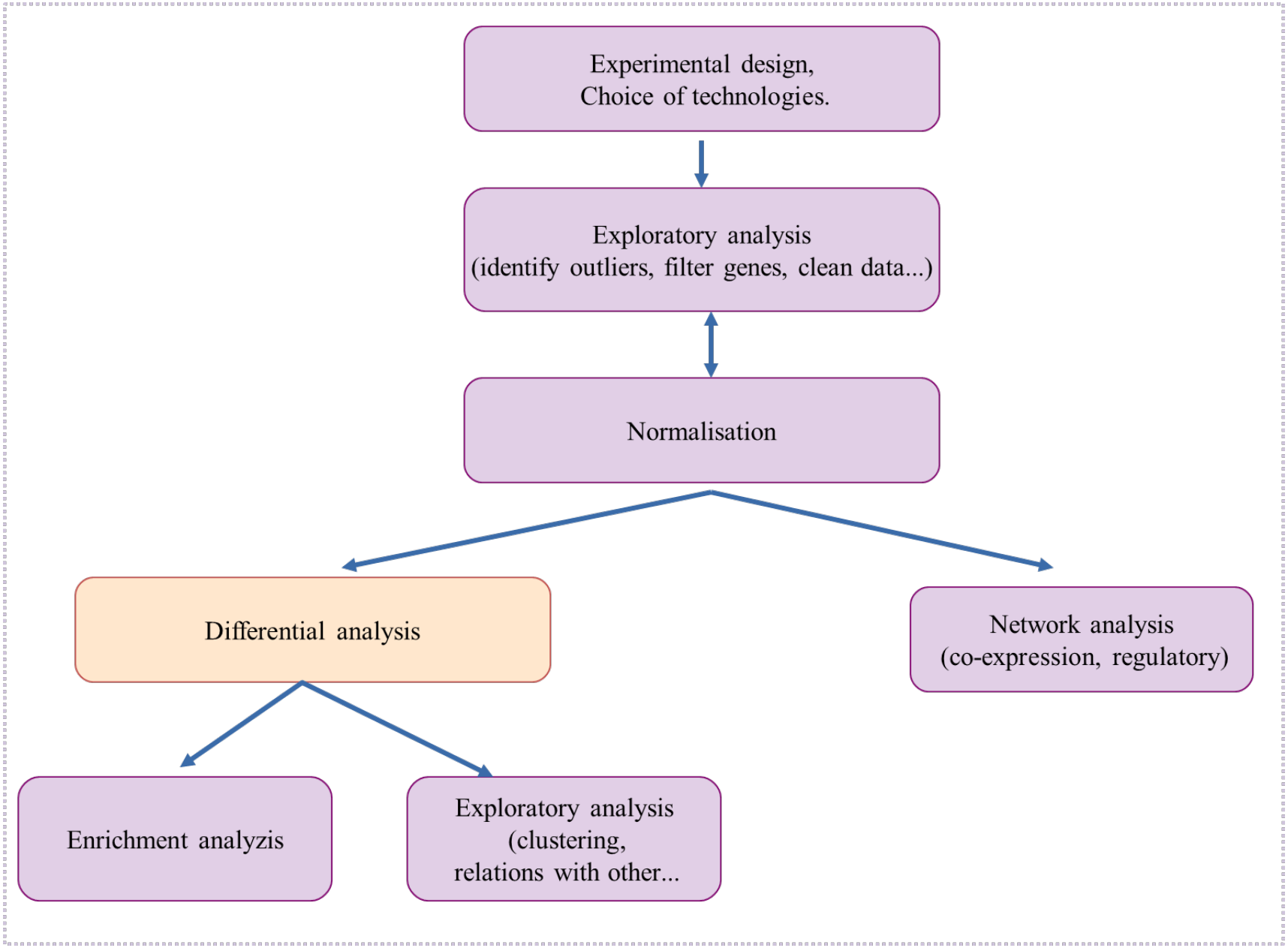
DIANE Normalisation Filtration



82

6- Recherche de gènes différentiellement exprimés

Modélisation des données



Modélisation des données

- **Note** : Utilisation du log(nbr de reads) pour que les données suivent une loi statistique, et nécessité de transformer les « 0 ».
  - => Loi binomiale négative

- **Note** : Utilisation du log(FoldChange)
  - Fold Change = ratio entre 2 niveaux d'expression
  - Ratio de la valeur finale / valeur initiale

Rappel : définition du Fold-Change :

$$FC = \frac{\text{expression condition } V}{\text{expression condition } G}$$

Gene	V1	V2	V3	G1	G2	G3	FC	*p*-valeur
Gene1	5	7	6	2	2	2	3	0.06
Gene2	800	1000	900	350	250	200	3	0.03
Gene3	700	900	1100	350	200	250	3	0.10
Gene4	900	500	1300	200	550	50	3	0.06
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

Modélisation des données

Rappel : définition du Fold-Change :

$$FC = \frac{\text{expression condition } V}{\text{expression condition } G}$$

Gene	V1	V2	V3	G1	G2	G3	FC	p-valeur
Gene1	5	7	6	2	2	2	3	0.06
Gene2	800	1000	900	350	250	200	3	0.03
Gene3	700	900	1100	350	200	250	3	0.10
Gene4	900	500	1300	200	550	50	3	0.06
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

Test p value et FDR

- **p-value :** risque/probabilité de déclarer un gène différentiellement exprimé alors qu'il ne l'est pas.
  - **Ho : le gène g a un niveau d'expression constant**
  - P-value de 0.05= on autorise qu'un gène ait 5% de risque d'être appelé DE alors qu'il ne l'est pas
  - **Problème des tests multiples**: si on teste 10000 gènes non différentiellement exprimés, on autorise 500 gènes à être déclarés DE alors qu'ils ne le sont pas

=> **nécessité de filtrer au préalable les gènes** (ex: niveau total d'expression < 10) pour limiter le nombre de tests

=> **Plus on augmente le nombre de tests , plus on a de chance de décider qu'un gène et différentiellement exprimé alors qu'il ne l'est pas.**

=> **besoin de correction** et utiliser une p-value ajustée adaptée aux tests multiples:

- procédure de Benjamini-Hochberg (BH) qui consiste à contrôler le False Discovery Rate (**FDR**), c'est à dire la proportion de faux positifs dans les gènes déclarés différentiellement exprimés
- procédure de Bonferroni (+ stringent)

Test p value Error

- **Erreur de 1ere espèce (Type 1 error):**
  - Probabilité α de rejeter H0 alors qu'elle est vraie
  - Probabilité de décider qu'un gène est différentiellement exprimé alors qu'il ne l'est pas.
  - **Faux positif**
- **Erreur de 2eme espèce (Type 2 error):**
  - Probabilité β de rejeter H0 alors qu'elle est fausse
  - Probabilité de décider qu'un gène n'est pas différentiellement exprimé alors qu'il l'est.
  - Faux négatif

Situation	Décision	
	accepter H_0	rejeter H_0
H_0 vraie	1-α	α
H_0 fausse (diff. expr.)	β	1-β

- **Conséquence :**
  - En testant les 20000 gènes avec α = 5%
  - **On s'attend à obtenir 20000 x 0,05 faux positifs soit 1000 gènes qui ne sont en réalité pas différentiellement exprimés.**

Statistical Model : filtering by p-value

- **Filtre = risque**
  - Le nombre est la valeur seuil que nous mesurons contre la p-value.
  - Elle indique à quel point les résultats observés doivent être extrêmes pour rejeter l'hypothèse nulle d'un test significatif
  - Ex

=> Résultat avec un niveau de 90% de niveau de confiance , alpha est 1 - 0,90 = 0,10

=> Résultat avec un niveau de 95% de niveau de confiance , alpha est 1 - 0,95 = 0,05

⇒ Résultat avec un niveau de 99% de niveau de confiance , alpha est 1 - 0,99 = 0,01

⇒ α > p-value Ho Rejetée

Statistical Model : Correction test multiples FDR

- **False Discovery Rate (FDR)**
  - **Principe** : ajuster le seuil α en fonction des résultats observés (p-value obtenues)
  - M tests ayant des p-value p1……pm triées par ordre croissant
  - Pour un seuil α trouver le plus grand k tel que $Pk \leq \frac{k}{m}\alpha$ et déclarer les gènes 1 k différentiellement exprimés

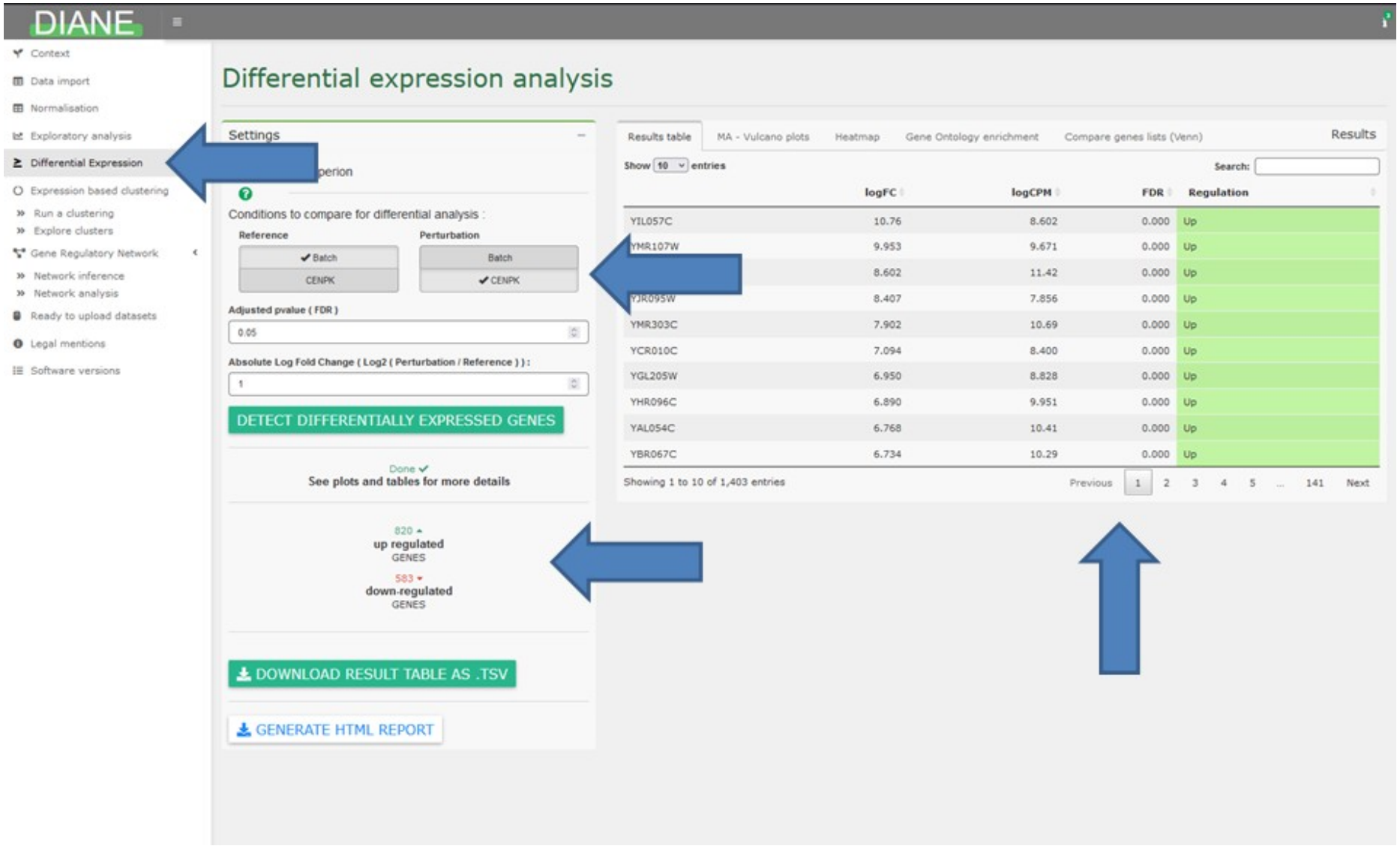
	R_1	R_2	G_1	G_2	p-value	$\alpha * k/m$
267628_at	441.8	431.5	347.2	375.2	0.036937	**0.01**
267629_at	226.5	205.6	185.2	175.9	0.090013	0.02
267630_at	1142.6	1080.7	1019.8	1018.6	0.096209	0.03
267627_at	57	6	45.5	38.6	0.721558	0.04
267631_at	77.7	58	84.4	57.4	0.872008	0.05

  - Ici **aucun gène** n'est déclaré différentiellement exprimé pour α = 0,05

Practice : DIANE

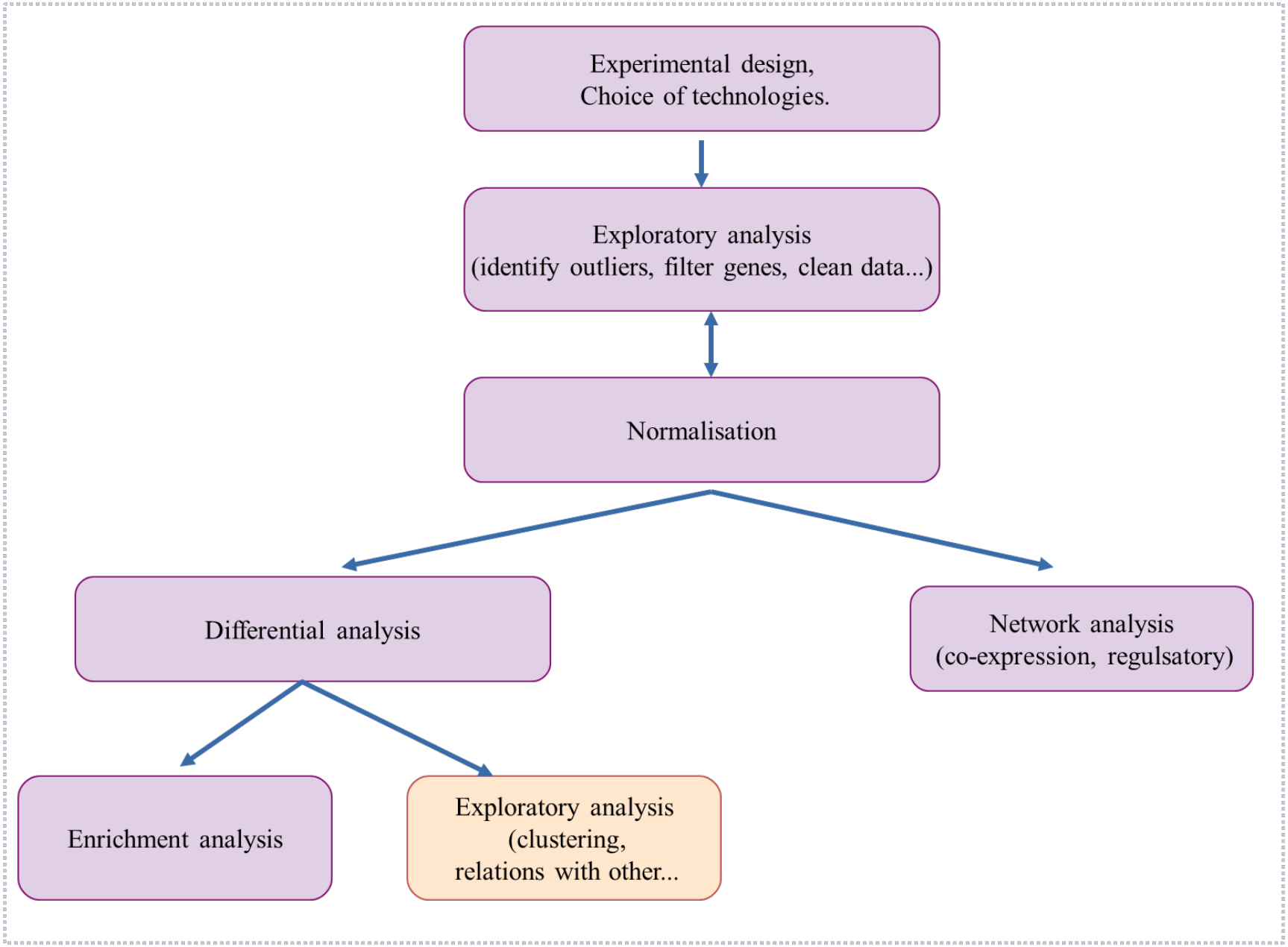
TP Diane

Practice Expression différentielle DIANE



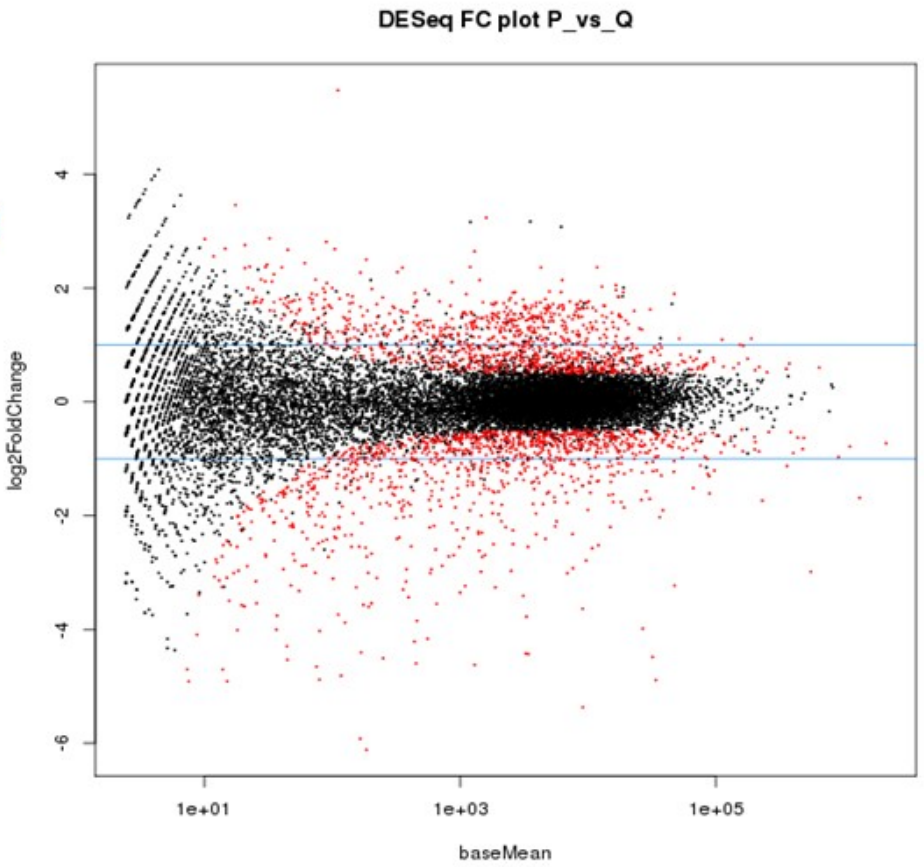
6- Plots and Graphical Representations

Analyses exploratoires



Smear plot

Smear plot / MA plot
Pvalue adj < 0.05



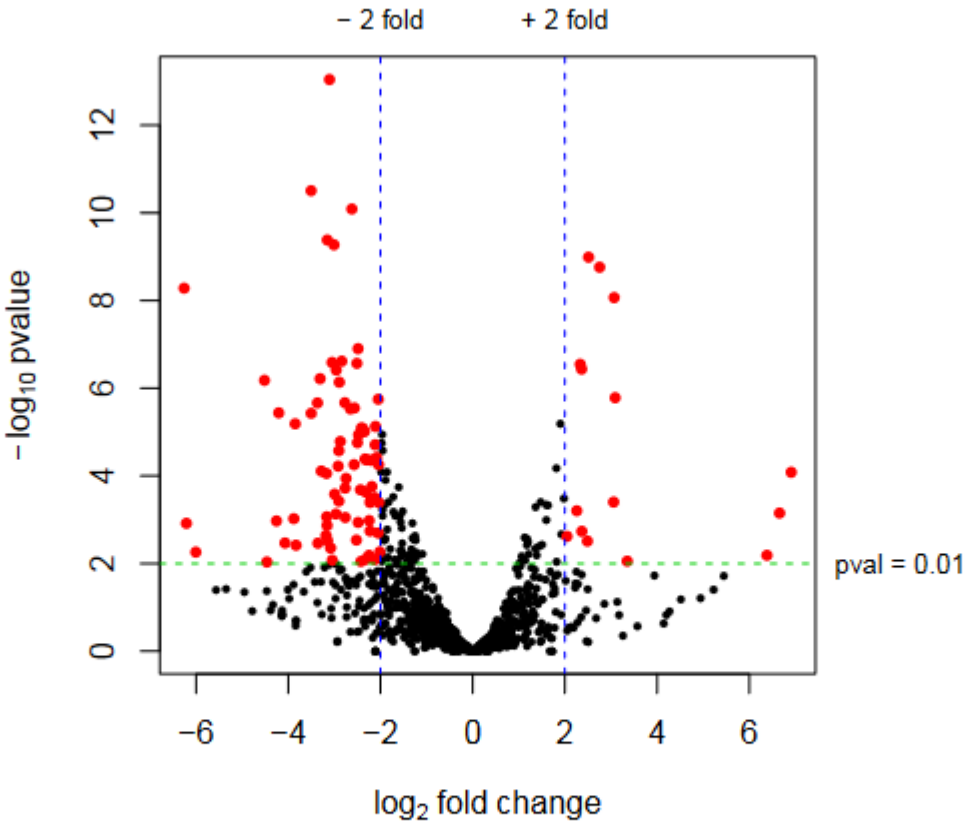
MA plot

Le MA plot est un graphe qui était initialement utilise dans les analyses de puce a ADN. C'est un nuage de points représentant en abscisse l'expression moyenne du gène à travers les différents échantillons, et en ordonnée le log-ratio des expressions moyennes d'une condition par rapport a l'autre. En RNA-Seq, après normalisation, on s'attend a ce que les points soient repartis symétriquement autour de 0 en ordonnée (c'est-a-dire un ratio de 1).

M : ordonnés, ratios des intensités. log2R –log2G = log2(R/G)
A : abscisses, moyenne des intensités du spot. ½ (log2R +log2G)

Volcano plot

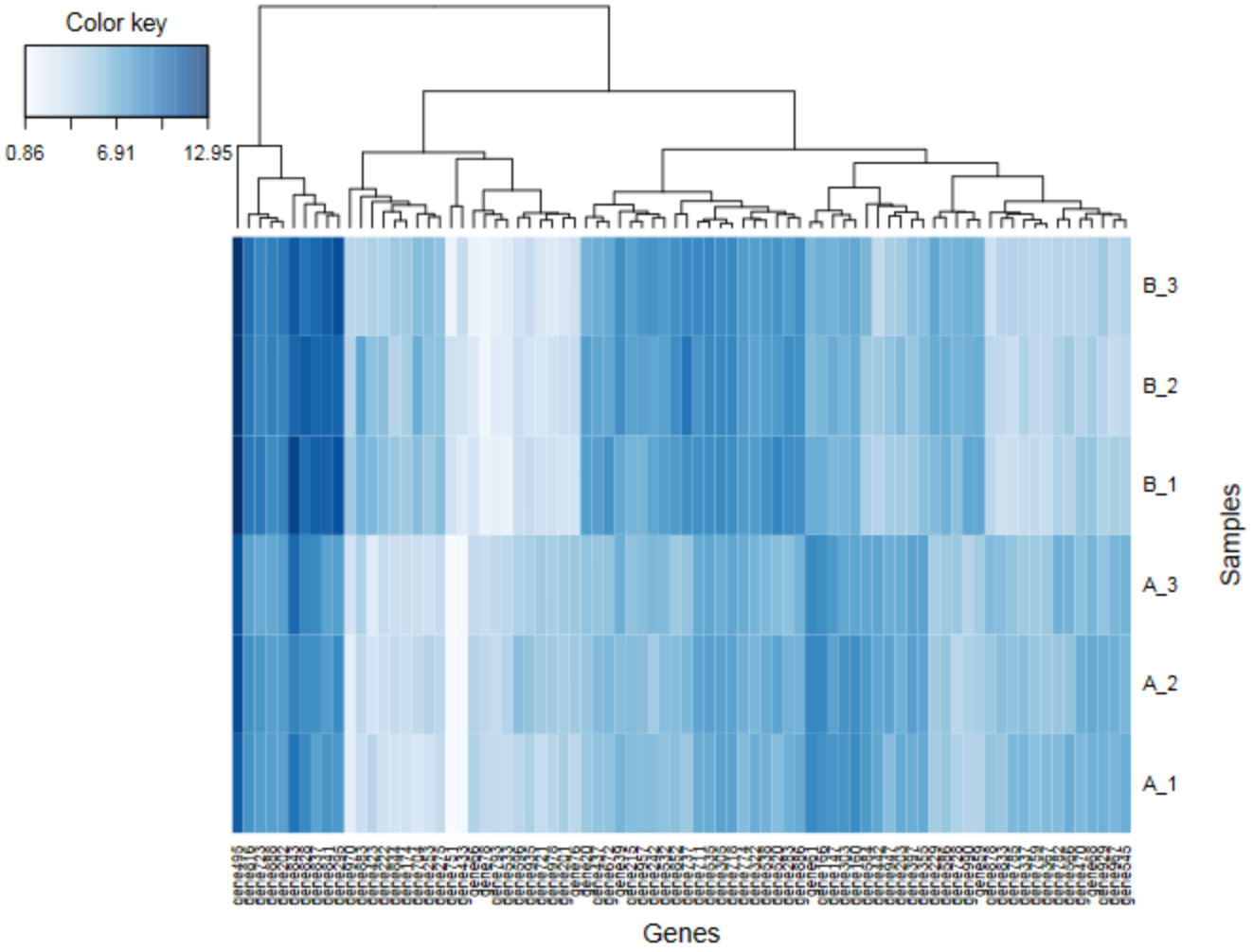
Volcano plot
Pvalue adj < 0.01



Tutorial: http://www.nathalievilla.org/doc/pdf/tutorial-rnaseq.pdf

Fold change vs. P-valeur (t-test ou autre)

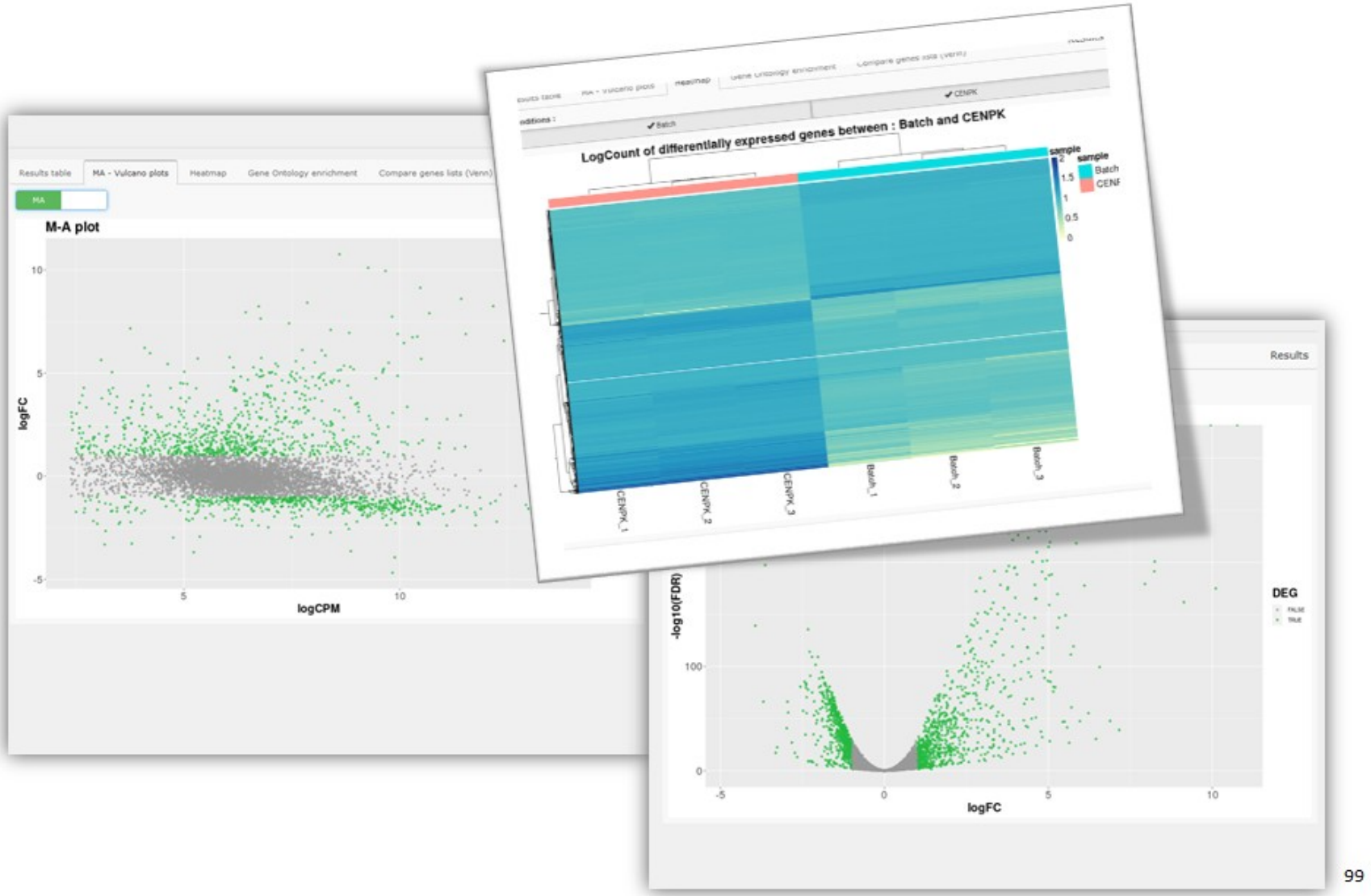
Hierarchical clustering / Heatmap



Practice : DIANE

TP Diane

Practice Graphical representation



DIANE : R Code and html report

DIANE - Differential Expression Analysis report

Code

Dashboard for the Inference and Analysis of Networks from Expression data

This report was automatically generated by DIANE to improve research reproducibility.

It contains the main settings and results for the DEA tab of the application, reporting the last transcriptome comparison that was performed.

Your settings

Normalization method :

Hide

```
print(the_r$norm_method)
```

```
## [1] "deseq2"
```

Reference and perturbation condition :

Hide

```
paste(r$ref, r$trt)
```

```
## [1] "Batch CENPK"
```

Threshold adjusted p-value and minimal expected absolute log fold change :

Hide

```
paste("FDR =", r$fdr, "LFC = ", r$lfc)
```

```
## [1] "FDR = 0.05 LFC =  1"
```

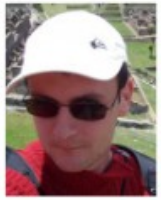
Contributeurs pour cette formation

Alexis Dereeper

Sebastien Ravel

Christine Tranchant-Dubreuil

Sebastien Cunnac



Gautier Sarah

Julie Orjuela-Bouniol

Catherine Breton

Aurore Comte

Alexandre Soriano

Links

Related courses : https://www.nathalievialaneix.eu/
Related courses : https://southgreenplatform.github.io/trainings/linuxJedi/
Tutorial RNAseq : http://nathalievilla.org/doc/pdf/slides-rnaseq.pdf
Book : http://compgenomr.github.io/book/
Degust : http://degust.erc.monash.edu/
MeV: http://mev.tm4.org/
MicroScope: http://microscopebioinformatics.org/
Comparison of methods for differential expression:
https://southgreenplatform.github.io/trainings//files/Comparison_of_methods_for_differential_gene_expression_using RNA-seq_data.pdf
PIVOT: https://github.com/qinzhu/PIVOT/
DESeq2: http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html
EdgR: https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html
DIANE: https://diane.bpmp.inrae.fr/

Merci pour votre attention !

SouthGreen bioinformatics platform

SUIVEZ NOUS SUR TWITTER !

South Green : @green_bioinfo

I-Trop : @ItropBioinfo

N’oubliez pas de nous citer !

Comment citer les clusters?

"The authors acknowledge the IRD i-Trop HPC at IRD Montpellier for providing HPC resources that have contributed to the research results reported within this paper. URL: http://bioinfo.ird.fr/ "

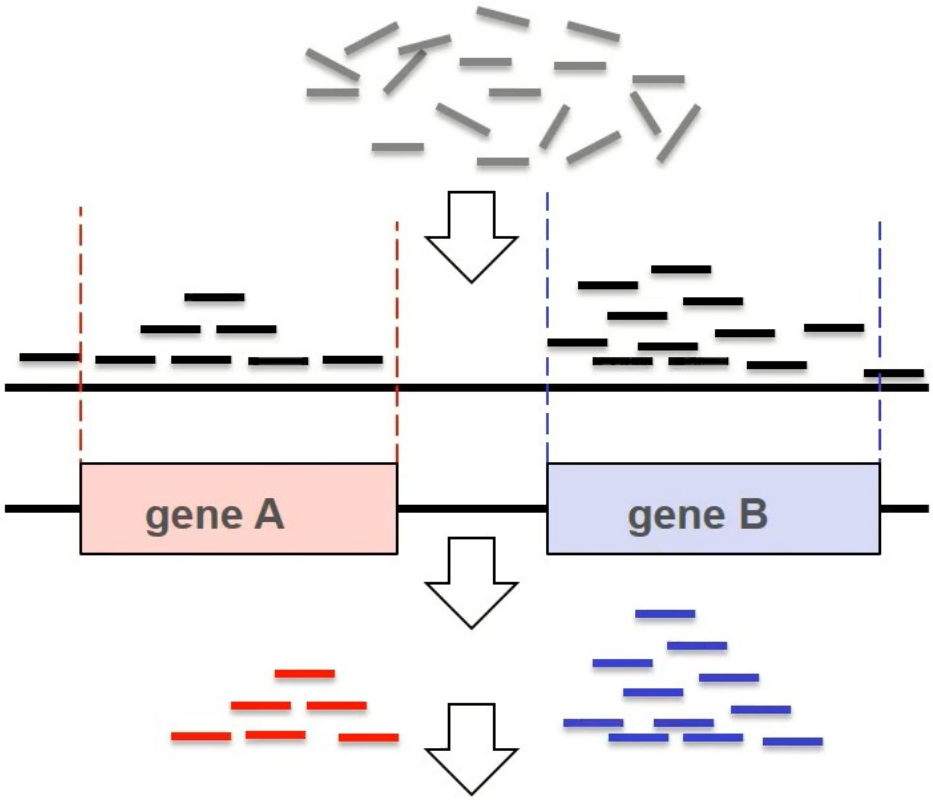
“The authors acknowledge the CIRAD UMR-AGAP HPC (South Green Platform) at CIRAD montpellier for providing HPC resources that have contributed to the research results reported within this paper. URL: http://www.southgreen.fr”

Statistics tools

- **limma** (i.e., voom+limma and vst+limma)
  - unaffected by outliers
  - but they required at least 3 samples per condition
- **SAMseq, ShrinkSeq** (The non-parametric)
  - top performing methods for data sets with large sample sizes
  - required at least 4-5 samples per condition
  - fold change required for statistical significance was lower → compromise the biological significance
  - Small sample sizes inaccuracies in the estimation of the mean and dispersion parameters
- **TSPM**
  - most affected by the sample size
- **DESeq, edgeR and NBPSeq**
  - showed, overall, relatively similar accuracy with respect to gene ranking
  - recommended parameters well chosen and often provide the best results
  - pre-specified FDR threshold varied considerably between the methods
  - **DESeq** : overly conservative
  - **edgeR**, **NBPSeq** : too liberal and called a larger number of false (and true) DE genes.
  - **edgeR**, **DESeq :** varying the parameters of can have large effects on the results
- **EBSeq, baySeq and ShrinkSeq** (posterior probability)
  - **baySeq** performed well under some conditions ; results were highly variable, especially when all DE genes were upregulated in one condition
  - **EBSeq** In the presence of outliers, found a lower fraction of false positives for large sample sizes not fot small sample sizes
  - **baySeq** In the presence of outliers, found a lower fraction of false positives true for small sample sizes not fot large sample sizes

comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. Charlotte Soneson1 and Mauro Delorenzi

RNA-seq data analysis: steps, tools and files



	Control 1	Control 2	Control 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Gene A	6	5	7	170	100	110
Gene B	11	11	10	3	4	2
Gene C	200	150	355	50	1	3
Gene D	0	1	0	2	0	1

STEP	TOOL	FILE
Quality control	FastQC	FASTQ
Pre-processing	Trimmo-matic	FASTQ
Alignment	HISAT2	BAM
Quality control	RSeQC	
Quantitation	HTSeq	Read count file (TSV)
Combine count files to table	Define NGS experiment	Read count table (TSV)
Quality control	PCA, clustering	
Differential expression analysis	DESeq2, edgeR	Gene lists (TSV)

Omics data: multiple testing issue

Context:

We perform a large number *N* of statistical tests for which we reject or not H_0.

Possible conclusions:

Decisions

Unknown truths	Non rejects of H_0	Rejects of H_0
H_0 true	TN	FP
H_0 false	FN	TP

Among all the genes told differentially expressed, the False Discovery Rate (FDR) is:

$$\frac{FP}{FP + TP}$$

Méthodes basées sur les normalisations interbanques

Normalization Technique	Name authors	Description	Software
UQ	Upper Quartile Ref : Bullard et al., 2010 (Upper) Quartile normalization	Les comptages par gène sont divises par le 3e quartile des comptages non nuls de l'échantillon, puis multiplies par la moyenne des 3e quartiles de tous les échantillons.	EdgeR
TC	Total read count adjustment Ref : Mortazavi et al., 2008	Chaque nombre reads est divisé par le nombre total de reads (taille de la banque), puis multiplier par le nombre total moyen de reads des librairies.	
RPKM	Reads Per Kilobase per Million	La normalisation RPKM (Reads Per Kilobase per Million) a été introduite initialement pour faciliter les comparaisons entre gènes d'un même échantillon ; elle combine donc une normalisation inter et intra échantillons. Ainsi, les comptages sont corriges pour prendre en compte la taille de la librairie et la longueur des gènes. Cependant, il a été montre que la correction de la longueur des gènes a pour effet d'introduire un biais dans la variance par gène, en particulier pour les gènes faiblement exprimes. Cette méthode reste toutefois très populaire dans de nombreuses applications.	EdgeR
RLE	Relative Log Expression Ref : Anders and Huber, 2010.	La normalisation RLE (Relative Log Expression) a été développée dans le package Bioconductor DESeq. Elle se base sur l'hypothèse selon laquelle la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimés. Le facteur de normalisation pour un échantillon est obtenu en calculant pour chaque gène la médiane des ratio de ses comptages par rapport a sa moyenne géométrique entre les différents échantillons. L'idée sous-jacente est que les gènes non différentiellement exprimes doivent avoir des comptages similaires entre différents échantillons, et donc un ratio proche de 1. Si l'on suppose que la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimes, la médiane des ratio constitue une estimation du facteur correctif qui doit être applique a l'ensemble des comptages.	DESeq, DESeq2, EdgeR
TMM	Trimmed Mean of M-values Ref : Robinson, M. and Oshlack, A. (2010).	La normalisation TMM (Trimmed Mean of M-values) est implementée dans le package Bioconductor edgeR. Elle se base sur l'hypothèse selon laquelle la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimes. Le facteur TMM est calcule pour chaque échantillon, l'un d'eux étant considère comme l'échantillon de référence et les autres comme des échantillons test. Pour chaque échantillon test, le facteur TMM est la moyenne pondérée des log-ratios entre ce test et la référence, après exclusion des gènes les plus exprimes et des gènes ayant les plus forts log-ratios. D'après l'hypothèse selon laquelle il y a peu de gènes différentiellement exprimes, le facteur TMM doit être proche de 1. S'il ne l'est pas, sa valeur donne une estimation du facteur correctif à appliquer aux tailles des librairies (et pas aux comptages bruts) afin de rendre l'hypothèse vraie.	EdgeR

Méthodes basées sur les normalisations interbanques

RLE

La normalisation RLE (Relative Log Expression) a été développée dans le package Bioconductor DESeq. Elle se base sur l'hypothèse selon laquelle la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimes. Le facteur de normalisation pour un échantillon est obtenu en calculant pour chaque gène la médiane des ratio de ses comptages par rapport a sa moyenne géométrique entre les différents échantillons. L'idée sous-jacente est que les gènes non différentiellement exprimes doivent avoir des comptages similaires entre différents échantillons, et donc un ratio proche de 1. Si l'on suppose que la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimes, la médiane des ratio constitue une estimation du facteur correctif qui doit être applique a l'ensemble des comptages.

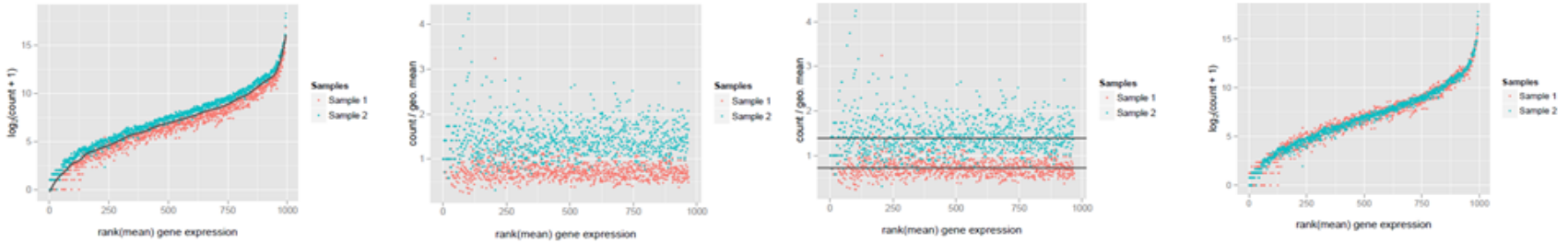
Ref : Anders and Huber, 2010. Dans edgeR, DESeq – DESeq2

1 – Calcule une pseudo référence

2 – Centre les échantillons comparés à la référence

3 – Calcule un facteur de normalisation : médiane des ratio de ses comptages par rapport à sa moyenne géométrique entre les différents échantillons

With edgeR
calcNormFactors(…, mrthod=‘’ RLE’’)
with DESeq
estimateSizeFactors(…)



Méthodes basées sur les normalisations interbanques

TMM

La normalisation TMM (Trimmed Mean of M-values) est implementée dans le package Bioconductor edgeR. Elle se base sur l'hypothèse selon laquelle la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimes. Le facteur TMM est calcule pour chaque échantillon, l'un d'eux étant considère comme l'échantillon de référence et les autres comme des échantillons test. Pour chaque échantillon test, le facteur TMM est la moyenne pondérée des log-ratios entre ce test et la référence, après exclusion des gènes les plus exprimes et des gènes ayant les plus forts log-ratios. D'après l'hypothèse selon laquelle il y a peu de gènes différentiellement exprimes, le facteur TMM doit être proche de 1. S'il ne l'est pas, sa valeur donne une estimation du facteur correctif à appliquer aux tailles des librairies (et pas aux comptages bruts) afin de rendre l'hypothèse vraie.

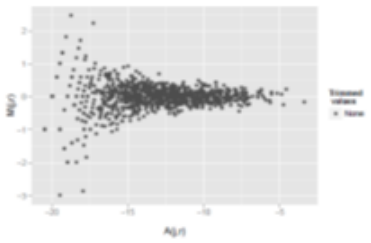
Ref : Robinson, M. and Oshlack, A. (2010). Dans edgeR.

1 – Sélectionner un échantillon pour servir de référence : L'échantillon r avec le quartile supérieur plus proche du quartile de la moyenne supérieure.

2 – Trim 30% on M-values

3 – Trim 5% on A-values

3 – Sur les données restantes, calculer le moyenne pondérée des valeurs M



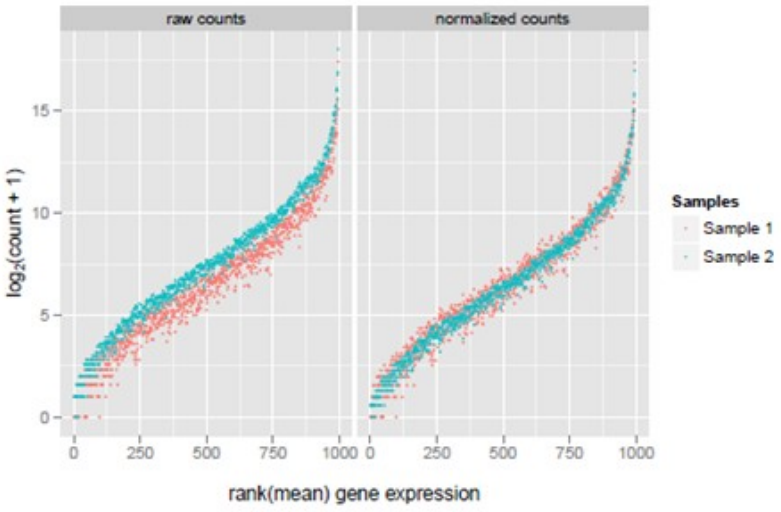
```
## With edgeR
calcNormFactors(..., method="TMM")
```

Méthodes basées sur les normalisations interbanques

Total read count adjustment

Chaque nombre reads est divisé par le nombre total de reads (taille de la banque), puis multiplier par le nombre total moyen de reads des librairies.

Ref : Mortazavi et al., 2008



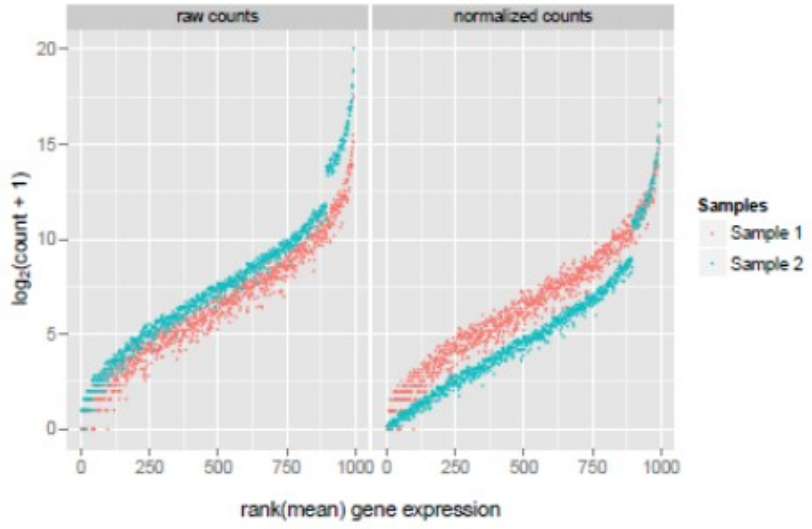

```
## With edgeR
cpm(...,
normalized.lib.sizes=TRUE)
```

Méthodes basées sur les normalisations interbanques

Upper Quartile

Les comptages par gène sont divises par le 3e quartile des comptages non nuls de l'échantillon, puis multiplies par la moyenne des 3e quartiles de tous les échantillons.

Ref Bullard et al., 2010 (Upper) Quartile normalization



1 – dans lequel Q (p)j est un quantile donné (généralement le 3e quartile) de la distribution des comptes dans l'échantillon j.

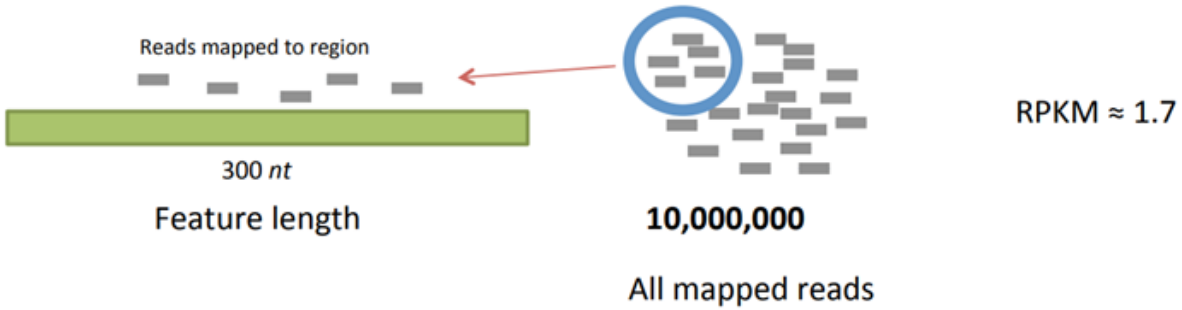
With edgeR
calcNormFactors(..., method = "upperquartile", p = 0.75)

Normalisation des données

Correcting for **transcript length** and **total number of reads**

RPKM

La normalisation RPKM (Reads Per Kilobase per Million) a été introduite initialement pour faciliter les comparaisons entre gènes d'un même échantillon ; elle combine donc une normalisation inter et intra échantillons. Ainsi, les comptages sont corriges pour prendre en compte la taille de la librairie et la longueur des gènes. Cependant, il a été montre que la correction de la longueur des gènes a pour effet d'introduire un biais dans la variance par gène, en particulier pour les gènes faiblement exprimes. Cette méthode reste toutefois très populaire dans de nombreuses applications.



$$RPKM = 10^9 \text{ x } \frac{\text{Number of reads mapped to a region}}{\text{Total reads x region length}}$$

RPKM: *R*eads *P*er *K*ilo base of transcript per *M*illion reads