UNIVERSITÉ D'ANGERS
UFR INFORMATIQUE

RAPPORT DE STAGE
MASTER 1 2016-2017

UMR INSERM 1232
-EQUIPE IMMUNITÉ INNÉE ET IMMUNOTHÉRAPIE

ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

Présenté par : RASOLONIAINA MARLINO

Maître de stage : Dr. VALÉRIE SEEGERS

Responsable d'équipe : Dr. YVES DELNESTE

Laboratoire d'accueil : INSERM U1232-Equipe 7
Bâtiment IRIS
CHU-4,rue Larrey
49933 ANGERS

12 Avril 2017 — 20 Juin 2017

Table des matières

1 INTRODUCTION :

Besoin d'inspiration

2 PRÉSENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL :

2.1 Présentation générale (activité, organisation, services...) :

2.2 Présentation du service rattaché :

3 PRÉSENTATION DU SUJET DE STAGE :

3.1 Objet et missions du stage :

3.2 Missions réellement réalisées :

4 ACQUISITION DES DONNÉES :

4.1 Les puces à ADN :

Une puce à ADN est constituée d'un support physique (le plus souvent une lame de verre) sur lequel sont déposées des molécules d'ADN correspondant à de petits fragments du génome (jusqu'à 40 000 dépôts différents par puce). On recouvre la puce de la solution contenant la population d'ARN à étudier. Les ARN s'hybrident sur les fragments d'ADN complémentaires. La quantité d'ARN fixée reflète la concentration de cet ARN dans la solution.
Pour des raisons pratiques, on utilise des ADNc plutôt que directement les ARN. Les ADNc sont marqués par un nucléotide radioactif ou un fluorochrome. Il est possible d'étudier simultanément plusieurs populations d'ADNc sur une même puce en utilisant des fluorochromes différents. La meilleure façon d'utiliser cette possibilité est de marquer l'ADN génomique avec un fluorochrome, toujours le même. On obtient ainsi une référence stable au cours des années qui permet de mettre toutes les puces à la même échelle, quelle que soit leur origine.
Un scanner mesure l'intensité du signal émis par l'ADNc hybridé au niveau de chaque dépôt. Parmi les valeurs que proposent les logiciels pour cette intensité, la plus fiable est la médiane de l'intensité des pixels car elle est moins sensible aux défauts de l'image (pixels sur-brillants par exemple).
Les puces comportent généralement plusieurs dépôts identiques pour chaque gène. Cela simplifie le travail lorsqu'il faut repérer les aberrations dans la lecture des intensités puisqu'il suffit d'examiner les cas où les valeurs diffèrent beaucoup d'un dépôt à l'autre. Il s'agit le plus souvent d'un défaut physique sur la puce et il est facile d'éliminer la valeur aberrante. Dans le doute, on conserve la médiane des différentes mesures.
Plusieurs types de puces à ADN existent selon le support, la nature des fragments fixés à la surface, le mode de fabrication, la densité, le mode de marquage

des cibles et les méthodes d'hybridation. On sait que toutes les technologies des puces ADN se basent sur le principe fondamental de l'hybridation complémentaire des brins d'acide nucléique même si leurs techniques se diffèrent largement entre-elles, par exemple sur la longueur et la type de la sonde utilisée (cDNA arrays, oligonucleotide array), l'étiquetage et le protocole d'hybridation... La vraie différence entre ces approches résident sur la précision, la spécificité, la sensibilité et la robustesse de chaque plateforme.

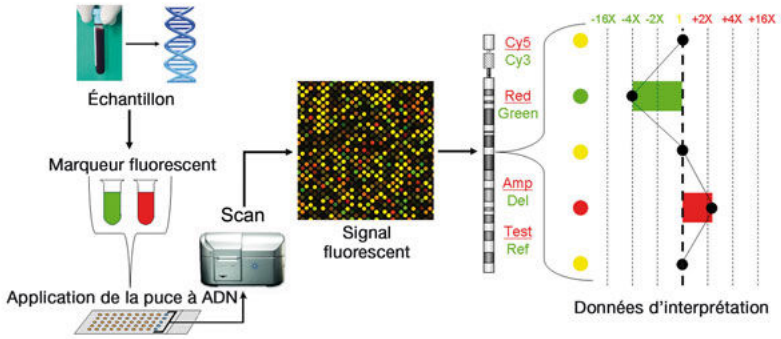


Figure 1 – Principe général d'utilisation des puces ADN

4.2 La technologie Illumina :

Illumina, Inc. est une société américaine qui fabrique et commercialise des systèmes intégrés pour l'analyse de la variation génétique et la fonction biologique, notamment des gammes de produits et services qui servent les marchés du séquençage, génotypage et expression génétique.
Une de ces récentes fabrications, la puce "BeadArray technologie".

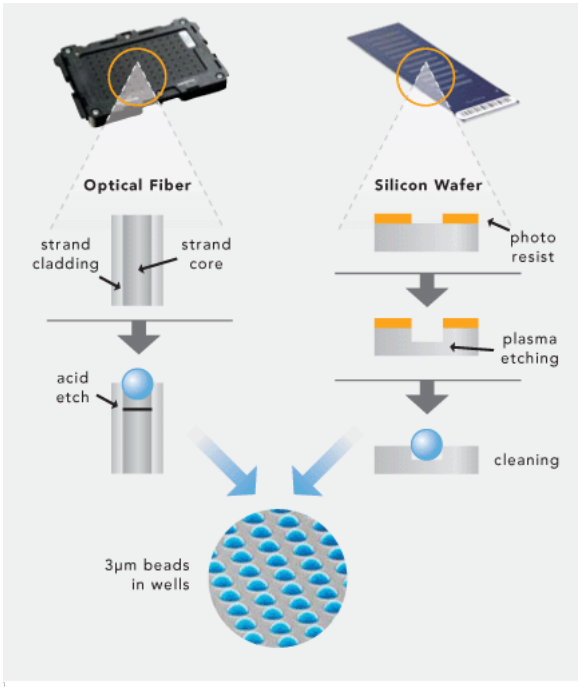


Figure 2 – Illumina BeadArray Technologie

Dans l'analyse des expressions des gènes, Illumina utilise deux approches différentes : l'hybridation directe(Direct Hybridization assay) et le DASL (cDNA-mediated Annealing Selection Extension and Ligation). L'expérience est faite avec la première approche qui consiste à utiliser un simple brin de la séquence d'ADN par spot. Cette séquence monocaténaire est censée s'hybrider avec la séquence cible étiquetée dans l'échantillon. La quantité du signal fluorescente produit détermine la quantité de l'ARN cible dans l'échantillon.

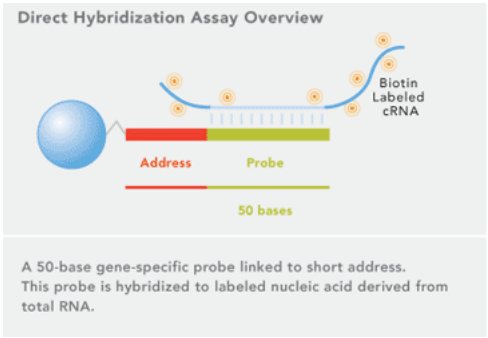


Figure 3 – An Illumina Direct Hybridization probe

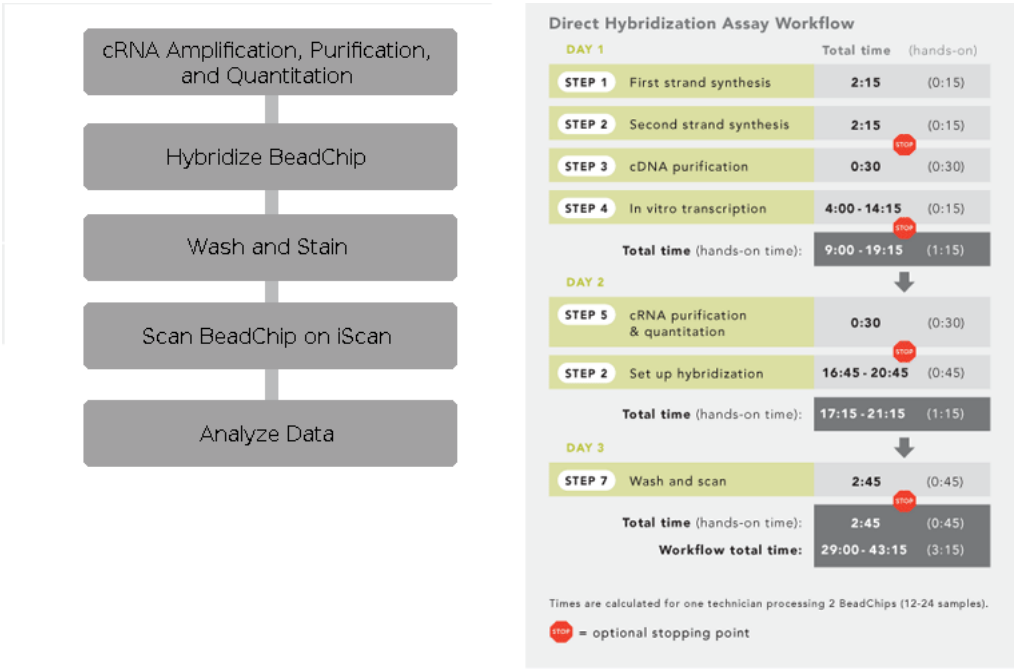
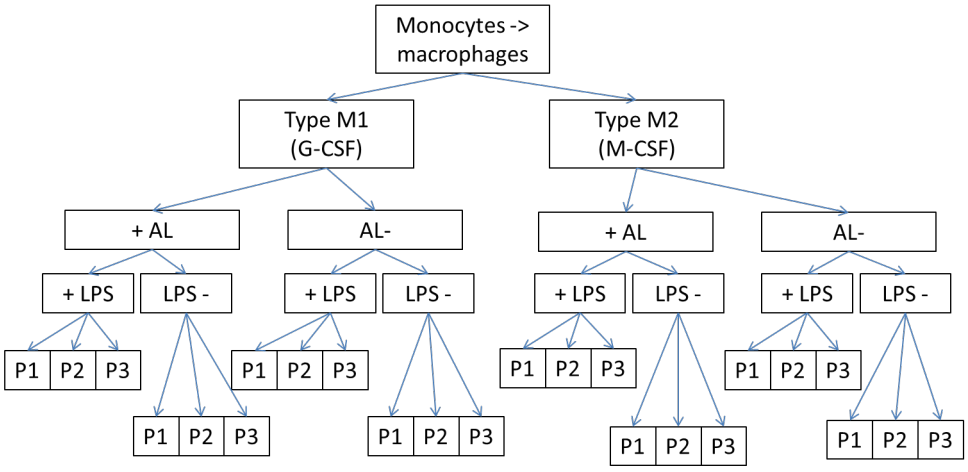


Figure 4 – Direct Hybridization assay workflow

4.3 Plan expérimental :



N=24 prélèvements
8 conditions expérimentales différentes

Figure 5 – Plan éxpérimental

L'expérience a été faite avec la puce ADN Illumina HumanHT-12 v4.0 BeadChip 12x1 avec 48210 sondes pour chaque prélèvement. 887 de ses sondes sont classés comme des sondes de contrôles. On se trouve donc avec 47323 individus sur 24 variables. Ce qui nous donne une matrice de données de dimmension :

$$\text{47323 rows} \left\{ \overbrace{\begin{pmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & \cdots & a_{nm} \end{pmatrix}}^{\text{24 columns}} \right.$$

4.4 Les sources de variations et les défis sur l'utilisation des puces ADN :

La littérature nous raconte que si on effectue à plusieurs reprises une même expérience, on peut se heurter à des valeurs d'expérience légèrement différentes à chaque exécution. Il est de ce fait très intéressant de voir de plus près les grandes étapes et les effets des processus biologiques qui sont derrières ces sources de quantité de variabilité dans l'étude des expressions génomique avec les puces ADN. De ce point de vue, ces variations sont considérées comme des bruits dans la phase d'analyse des expressions.
Est-ce que la variation d'un gène particulier est due au bruit de fond de la puce ou c'est réellement une différence entre les différentes expériences testées ? C'est là le vrai challenge. Si on prend un gène spécifique, combien de quantité de sa valeur représente la mesure de la variance due à la régulation des gènes et due à la quantité de bruit ? Ces sources de variation (Tableau : 1)nous mènent aux problèmes de fiabilité et de reproductibilité dans les mesures des puces ADN qui sont souvent négligés. Néanmoins, une grande partie de la variabilité induite par la puce elle-même peut être déterminée à l'aide des techniques de réplications ou d'autres techniques de séparations des bruits (Exemples : conception d'expérience statistique, normalisation des données). Plusieurs efforts ont été menés pour évaluer la fiabilité, la précision et la reproductibilité des puces ADN, inclus des projets comme MAQC(MicroArray Quality Control).

5 DESCRIPTION DES DONNÉES :

5.1 Décryptage et lecture :

Après avoir scanné la puce, le scanner iScan d'Illumina exporte et produit des fichiers de sortie selon les paramètres définis. Les fichiers qui contiennent les intensités des spots (.idat) sont encryptés et d'autres fichiers sont fournis à titre indicatif et de mesure pour l'analyse.

Pour la lecture des fichiers .idat, l'utilisation d'un fichier manifeste qui contient l'ensemble de tout les informations nécessaires concernant la puce est indispensable pour le décryptage : le nom et l'identifiant des gènes (Probe_id, Array_Address_Id, Symbol, Barcode), le statut d'un spot (regular, negative,

Facteur	*Commentaires*
Préparation des mRNA	Tissus, les kits et les procedures variantes
Transcription	Les variations inhérentes dans la réaction, le type de l'enzymes utilisé
L'étiquetage (Labeling)	Depend du type,des procédures et l'âge de l'étiquette
Amplification (PCR)	Il est difficille de quantifier le rendement du PCR
Variations géométriques des broches	différentes surfaces et propriétés dues à des erreurs aléatoires de production
Volume de l'échantillon	fluctue stochastiquement même pour la même broche (pin)
Fixation de l'échantillon	La fraction de l'ADNc cible (une gouttelette) qui est chimiquement liée à la surface de la diapositive n'est pas prise en compte
Paramètre d'hybridation	influencé par plusieurs facteurs comme la temperature,le temps,le buffering
Hybridation nonspécifique	un ADNc s'hybride avec une sequence qui n'est pas exactement son complémentaire
Réglages de gain	déplace la répartition des intensités de pixels
Limitation de la plage dynamique	Variabilité de la saturation au bas de gamme ou au haut de gamme
Alignement d'image	Les images d'un même BeadArray à diverses longueurs d'onde correspondant à des canaux différents ne sont pas alignées ; différents pixels sont considérés pour le même emplacement
Placement de la grille	le centre du spot n'est pas bien localisé
Bruit de fond nonspécifique	Élévation erronée de la moyenne de l'intensité du bruit de fond
Forme de spot	L'intensité des spots irréguliers sont difficille à segmenter en bruit de fond
Segmentation	Des contaminants lumineux peuvent ressembler comme un signal(ex : poussière)
Quantification de spot	la moyenne des pixels, la médiane,...

Table 1 – Sources of fluctuations in a typical cDNA microarray experiment

biotin,...) Dans la suite logique des choses, Illumina fourni un logiciel payant (GenomeStudio Software) qui aide sur le traitement et l'analyse des puces ADN (Genotyping Module, Gene Expression Module, Methylation Module).

5.2 Données brutes via Bioconductor :

Bioconductor est un projet de développement et un ensemble de package (1380 packages en 2017) gratuit et open source dans l'analyse et la compréhension des

File	*Description*
(Serial Number).txt	un fichier qui stocke la positions et l'identité de chaque spots, qui contient quelques informations sur les paramètres du scanner
Metrics.txt	un pour chaque BeadChip et contient des informations récapitulatives sur l'intensité des signals, la quantité de saturation, la mise au point et l'enregistrement sur l'image (s) de chaque section
Effective.cfg	fichier de configuration des paramètres du scanner
(Serial Number).sdf	fichier de description des échantillons d'Illumina utilisé pour déterminer les propriétes (positions) physique d'une section et savoir les sections liées sur chaque échantillons
*.idat	contiennent la moyenne des intensités du signal de chaque spots

Table 2 – Description des fichiers de sortie

données génomiques basé principalement en langage de programmation statistique R. Limma est un des packages (de choix) dans Bioconductor pour l'analyse des expressions génomique des puces ADN. La function read.idat de package Limma permet de lire les fichiers idat d'Illumina BeadArray en fournissant en paramètre le fichier manifeste .bgx correspondant à la plateforme d'expression de gène à étudier. On obtient après un objet limma de type EListRaw qui contient les objets suivants :

E	matrice des intensité brutes
other$NumBeads	matrice de mêmes dimensions que E donnant les nombre de spots (bead) utilisées pour chaque valeur d'intensité.
other$STDEV	matrice de mêmes dimensions que E donnant un écart type au niveau des spots ou une erreur standard pour chaque valeur d'intensité.
genes	un data.frame des annotations des sondes qui contient des informations extraites du fichier manifeste relatif au type de puce utilisé : Probe_Id, Array_Address_Id, Status

Table 3 – Contenu de l'objet EListRaw retourné par la fonction read.idat() de limma

5.3 Contrôle et qualité :

Par approximation, on peut considérer qu'un signal émit par la puce soit :
- la vraie intensité produit par le gène cible
- un signal d'une hybridation non-spécifique
- un bruit de fond non-spécifique

La puce d'Illumina introduit alors des sondes appelées sonde de contrôle pour pouvoir mesurer et quantifier la qualité des données obtenues. Avec ces probes contrôles, on peut quantifier les bruits et la qualité du signal, de voir la qualité de la mesure d'expression d'un spot d'un BeadArray particulier et de son

ensemble. Une valeur anormale produit par un seul BeadArray peut compromettre le résultat d'une analyse sur l'ensemble des données. On ne peut pas donc être assuré d'avoir un bon résultat en phase d'analyse si la qualité des données obtenues n'est pas acceptable.

Contrôle de spécimen biologique	ces sont des gènes appelés 'housekeeping genes' qui doivent être exprimés dans tous les échantillons
Contrôle de l'étiquetage des échantillons (Labeling)	des ARN spécifiques(lysA,pheA,thrB,trpF) sont introduits dans les échantillons juste avant la transcription inverse (cDNA) et l'étiquetage. Des faibles signaux provenant de ses sondes indiquent des éventuelles problèmes lors de la réaction
Contrôle de l'hybridation	— Cy3-labeled hyb : ce contrôle se compose de 6 sondes d'oligonucléotides marqué par le fluorochrome Cy3 avec trois concentrations (low, medium, high) et doit produire des signaux progressivement croissants. — Low-stringency hyb : ce contrôle de stringence d'hybridation se compose de 8 sondes (medium, high) avec exception que chaque sonde contient deux bases mésappariés (Perfect Match & Mismatch) — High-stringency hyb
Contrôle de génération des signaux	des ARN sont marqués par de la biotin. On attend un signal d'hybridation positif provenant de ces sondes
Contrôle de sonde négative	des centaines de sondes de séquences aléatoires sans cibles dans le génome sont intégrées dans la puce reflétant les signaux de bruit de fond du système d'imagerie,d'hybridation croisée et autres.On s'attend à des faibles signaux provenant de ces sondes.

Table 4 – Liste des contrôles des données d'Illumina BeadArray

Métiques	*Valeurs attendues*
Hybridization Controls*	High > Medium > Low
Low Stringency*	PM > MM2
Biotin and High Stringency*	valeurs élevées
Negative Controls (Background and Noise)	valeurs faibles
Gene Intensity (Housekeeping and All Genes)	Plus élevée que les bruits de fond (Housekeeping > All Genes)
Labeling and Background	Labeling >= Background

Table 5 – Contrôle d'hybridation direct de la technologie BeadArray d'Illumina

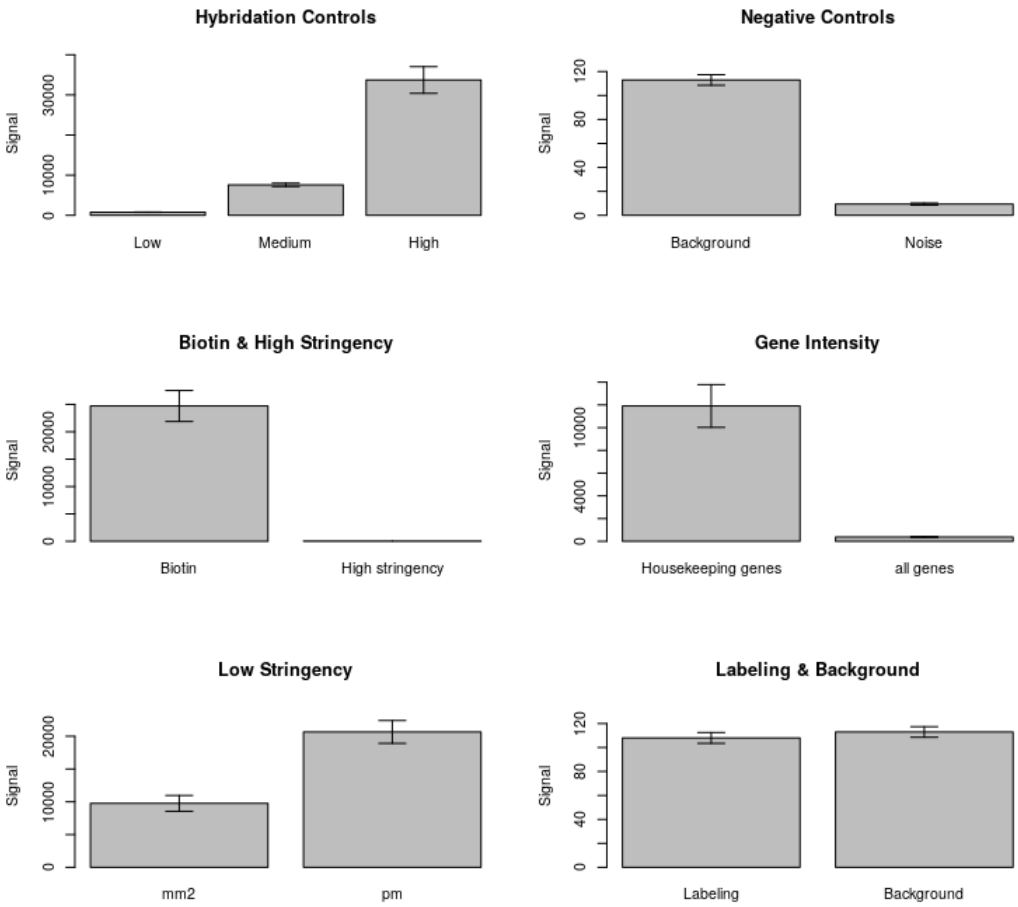


Figure 6 – Résume de l'ensemble de contôle d'hybridation direct de la technologie BeadArray d'Illumina

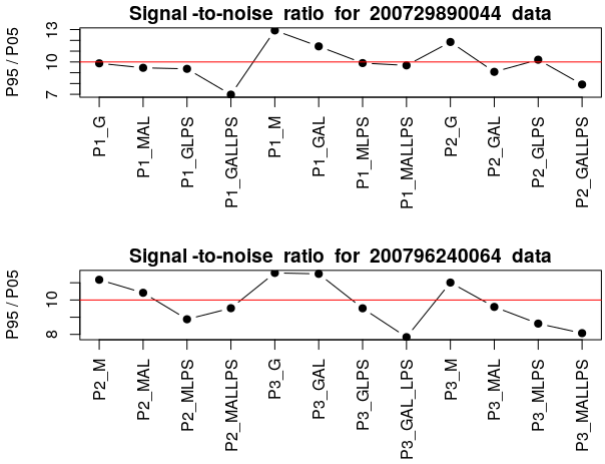


Figure 7 – Rapport signal-bruit sur les deux puces

Un rapport signal/bruit (SNR) peut être calculé en utilisant les mesures fournies par le scanner (dans le fichier metrics.txt) incluant les 95(P95) et 5(P05) quantiles de toutes les intensités de pixels de l'image de chaque section. Ces informations de mesures dépendent du paramètre de scanner et sont tout aussi utile pour l'évaluation de la qualité des données des échantillons ou bien pour évaluer si des échantillons semblent être des valeurs aberrantes. Illumina recommande que le ratio SNR soit supérieur à 10 pour les puces HT-12.

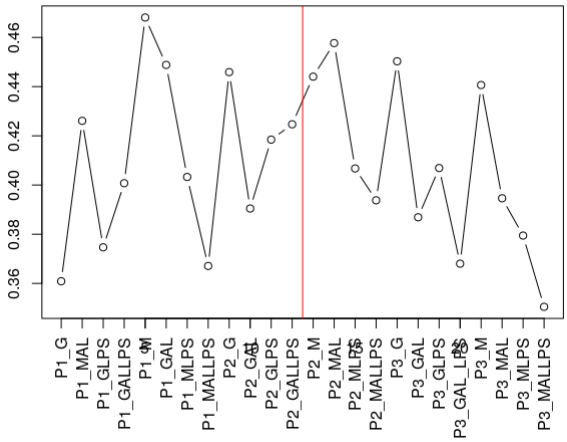


Figure 8 – Estimation de proportion des sondes exprimées sur les deux puces avec la fonction propexpr() de limma

Ces valeurs ne sont pas vraiment des probabilités, elles estiment la proportion globale de sondes sur chaque section de la puce Illumina BeadChip qui correspondent à des gènes exprimés selon la méthode de Shi et al (2010).

$pi1 = (pb - p)/(pb - p1)$ avec $(pi1[pi1 > 1] \leftarrow 1$ et $pi1[pi1 < 0] \leftarrow 0)$

La fonction compare la distribution d'intensité empirique des sondes de contrôle négatif avec celle des sondes régulières. Un modèle de mélange est adapté aux données de chaque échantillon de la puce pour inférer la

distribution d'intensité des sondes exprimées et estimer la proportion exprimée.

6 PRÉTRAITEMENT DES DONNÉES :

6.1 Transformation :

La distribution du niveau d'expression des gènes est très asymétrique avec un petit nombre de valeurs élevées. C'est une source de problèmes, car de nombreuses méthodes statistiques supposent implicitement une distribution gaussienne. Un simple calcul d'écart type ne satisfait donc pas de donner une interprétation habituelle de la distribution. La transformation logarithmique est la plus utilisée. Il y a plusieurs avantages d'utiliser la transformation logarithmique. Les données transformées sont plus faciles à interpréter (avec la variation du niveau d'expression des gènes plus réaliste) et aussi plus signifiantes de point de vue biologique (les intensités sont généralement comprises entre 0 et 65 535). L'asymétrie est fortement diminuée et la transformation rend la distribution du niveau d'expression des gènes presque normale(distribution gaussienne). Après transformation, les méthodes statistiques peuvent être utilisées en toute confiance.

6.2 Normalisation :

Il n'est pas très judicieux de se lancer tout de suite à la comparaison et l'analyse des expressions des gènes à partir des échantillons multiples, car des sources parasites de variations des expressions peuvent fausser le résultat, exemples :quantité d'ARN différentes dans les échantillons, efficacité de la détection de fluorescence, biais systématiques, artefacts, conditions d'hybridation des échantillons. Parmi ces sources, on cible plus précisément :

- *l'hétérogénéité du bruit de fond* : Si le bruit de fond présente des variations très différentes d'une puce à une autre, ou très structurées spatialement sur une puce, alors on peut être amené à corriger le signal par soustraction du bruit de fond.
- *l'hétérogénéité du signal* : De la même manière, le principe d'invariance d'une très grande majorité des expressions géniques d'une puce à une autre doit se traduire par une répartition comparable des valeurs des signaux entre les différentes puces. Si des différences marquées existent, il est judicieux de ramener les signaux moyens de chaque puce à la même valeur.

Avant de s'approcher des hypothèses favorables pour l'analyse différentielle, la normalisation est nécessaire afin de s'assurer que les données des différentes puces sont exploitables et comparable entre elles, que les différences d'intensité sont en effet dues à l'expression différentielle et non aux artefacts et les biais techniques expérimentaux. Il y a plusieurs méthodes de normalisation souvent classé en deux catégories :

- *méthodes qui utilisent des données de référence (baseline array)* : scaling methods and non-linear methods
- *méthodes qui combinent l'information de toutes les sections de la puce dans un ensemble de données donné (méthode complet)* : Lowess,normalisation par quantile,RMA(Robust Multi-Array Analysis)

6.3 La fonction neqc() du package Limma :

Le package Limma (écrit par Gordon Smyth,Matthew Ritchie et autres) contient pas mal de fonction de normalisation de puce à ADN que ce soit à une ou double couleur. Mais la fonction qui nous intéresse est la fonction neqc() spécialement personnalisée pour les puces Illumina BeadChips. Cette fonction R effectue avant la transformation logarithmique des données une correction de bruit de fond utilisant des sondes de contrôle négatif suivie après par la normalisation par quantile utilisant à la fois les sondes de contrôle positif et négatif.
L'algorithme utilise le modèle « normexp » pour la correction de bruit de fond qui consiste à modéliser les intensités de pixels observées en tant que somme de deux variables aléatoires, une normalement distribuée et l'autre répartie exponentiellement, représentant respectivement le bruit et le signal de fond. La moyenne (*mu*) et l'écart-type (*sigma*) du bruit de fond normalement distribuée du modèle normexp sont estimés avec les valeurs des sondes de contrôle négatif et la moyenne (*alpha*) du signal répartie exponentiellement est estimée comme la différence entre la moyenne du signal et la moyenne des sondes de contrôle négatif.

$mu \leftarrow colMeans(xn, na.rm = TRUE)$

$sigma \leftarrow sqrt(rowSums((t(xn) - mu)^2, na.rm = TRUE)/(nrow(xn) - 1))$

$alpha \leftarrow pmax(colMeans(xr, na.rm = TRUE) - mu, 10)$

$mu.sf \leftarrow x - mu - sigma^2/alpha$

$signal \leftarrow mu.sf + sigma^2 * exp(dnorm(0, mean = mu.sf, sd = sigma, log = TRUE) - pnorm(0, mean = mu.sf, sd = sigma, lower.tail = FALSE, log.p = TRUE))$

Après la correction, un petit décalage (offset) est ajouté (par défaut 16) aux intensités corrigées pour améliorer la performance dans la phase d'analyse d'expression différentielle et on applique la normalisation par quantile(*normalizeBetweenArrays*).
Le but de la normalisation par quantile est de mettre la distribution, médiane et la moyenne des intensités des sondes de chaque puce sur le même niveau pour toutes les échantillons. Ceci est fait de façon suivante :

1. Donner la matrice des intensités X de dimensions $p * n$ avec les colonnes représentent les échantillons et les lignes représentent les sondes
2. Trier chaque colonne de X par ordre croissant pour construire X_{sort}
3. Calculer la moyenne par ligne de X_{sort} et affecter cette moyenne sur chaque élément dans la ligne pour avoir X_{sm}
4. Construire $X_{normalized}$ en réarrangeant les éléments de chaque colonne de Xsm dans l'ordre de la matrice original X

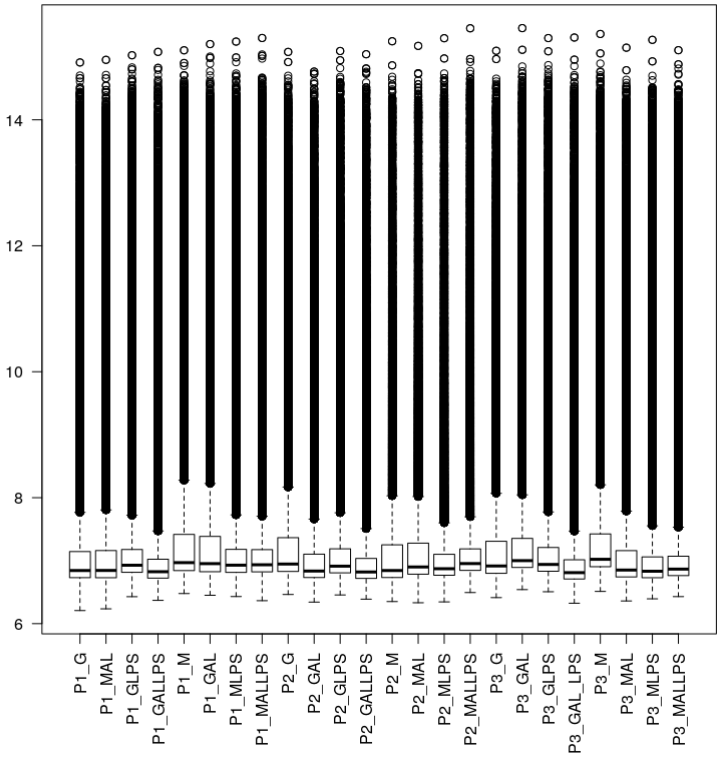


Figure 9 – Box plot des signaux avant normalisation

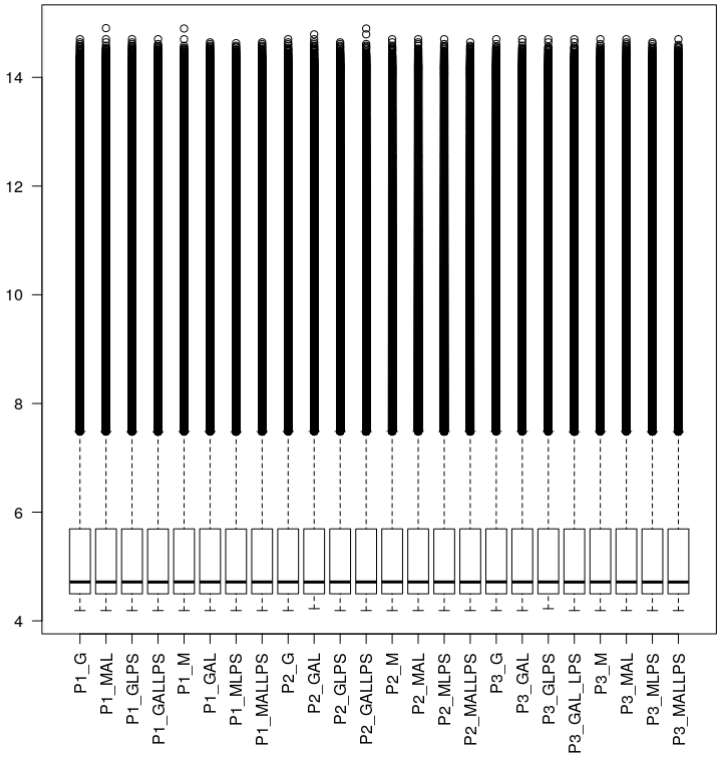


Figure 10 – Box plot des signaux après normalisation

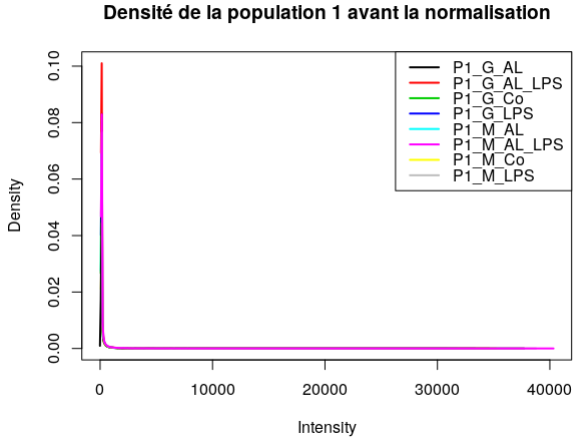


Figure 11 – Densité de la population 1 avant la normalisation

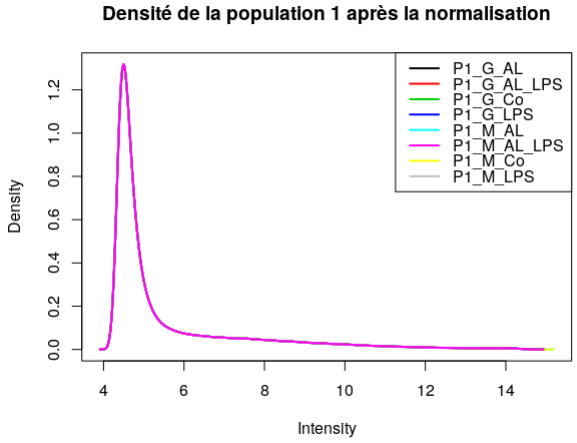


Figure 12 – Densité de la population 1 après la normalisation

7 ANALYSE DES DONNÉES DE TRANSCRIPTOME :

=> En cours

8 INTERPÉTATION :

=> Pas de temps

9 CONCLUSION :