TP4 Analyse Fonctionnelle

Justine Guégan - j.guegan-ihu@icm-institute.org
Guillaume Meurice - guillaume.meurice@gustaveroussy.fr
Marie-Anne Debily - marie-anne.debily@gustaveroussy.fr

15 décembre 2016

Les données nécessaires à cette séance se trouvent sur le site web :

https://pf-bb.github.io/CentraleSupelec-R-genomics/TP4.html.

Objectif

Dans les TP2 et 3, vous avez appris à manipuler des données d'expression, à évaluer la variabilité de profils transcriptionnels, et à rechercher des gènes différentiellement exprimés entre deux groupes d'échantillons. Aujourd'hui, nous vous proposons de vous pencher sur l'analyse fonctionnelle de ces gènes : quels sont les mécanismes biologiques sous-jascent, si tant est que nous puissions les identifier ?

Répondez aux questions dans un document Rmarkdown produisant un fichier **PDF** ou **HTML**.

Données

Les ARNm de 17 échantillons de tumeurs du sein de 3 types, HER2 positif (HER2), triple négatif (TNBC), non triple négatif (Non-TNBC), et 3 échantillons de sein normal (NBS) ont été séquencés par Illumina HiSeq2000.

Analyse des données

Lors du TP précedent, vous aviez généré des MA-plots, des volcanoplots et des heatmaps permettant de représenter les gènes différentiellement exprimés entre deux groupes d'échantillons. Afin de repartir sur la même base, nous vous donnons aujourd'hui les fichiers suivants :

- Fichier des comptages normalisés : counts_normalized.txt
- Fichier d'annotation des échantillons : annot_sample.txt
- Fichiers MA-plot : ces fichiers contiennent en ligne les gènes, et en colonnes, les valeurs **M**, **A**, ainsi que les p.values et p.values ajustées.

    - dataMAplot_HER2_vs_NBS.txt
    - dataMAplot_TNBC_vs_NBS.txt
    - dataMAplot_NTNBC_vs_NBS.txt

note : pour répondre aux questions de ce TP, il faudra charger ces fichiers dans R. Pour cela, n'oubliez pas les options `header = TRUE`, `row.names = 1` et `sep = "\t"`.

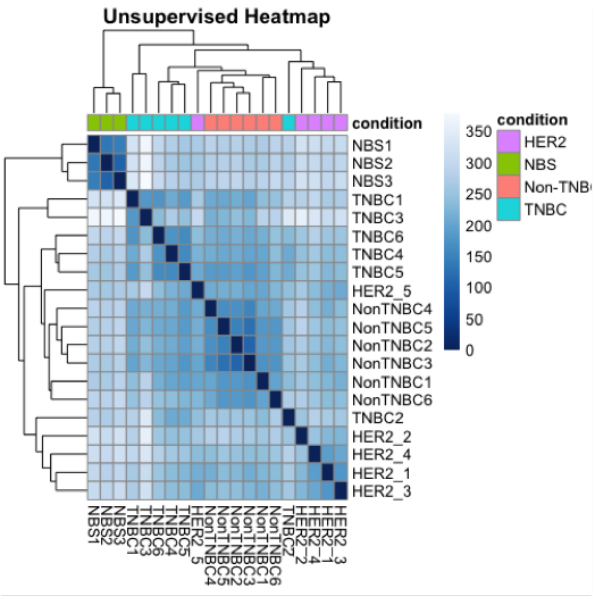
1. Un peu de Biologie

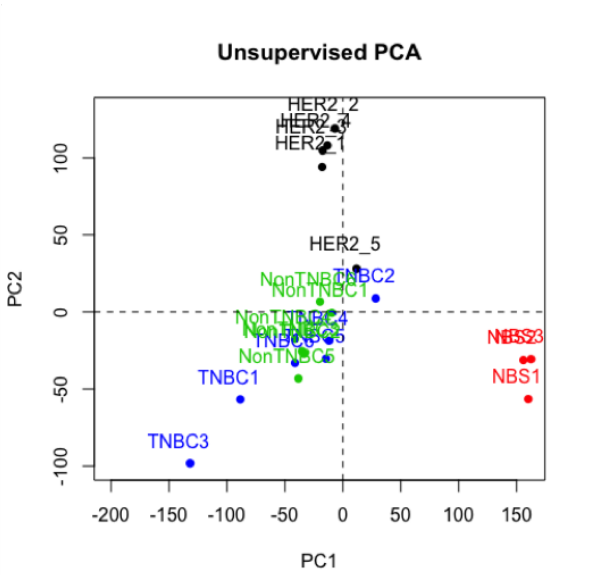
Question 1.1: Trouvez une brève définition des 3 sous types de cancer. Identifiez, pour chaque sous-type, le ou les gènes caractéristiques, ainsi que des voies de signalisation (pathway) associées au cancer du sein. Vous pouvez utiliser le portail suivant : `https://www.mycancergenome.org`. Y a t'il des traitements différents par sous groupe ?

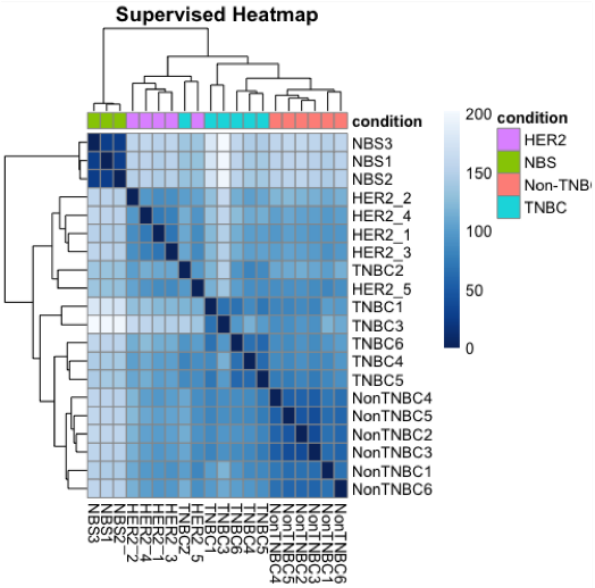
Question 1.2:

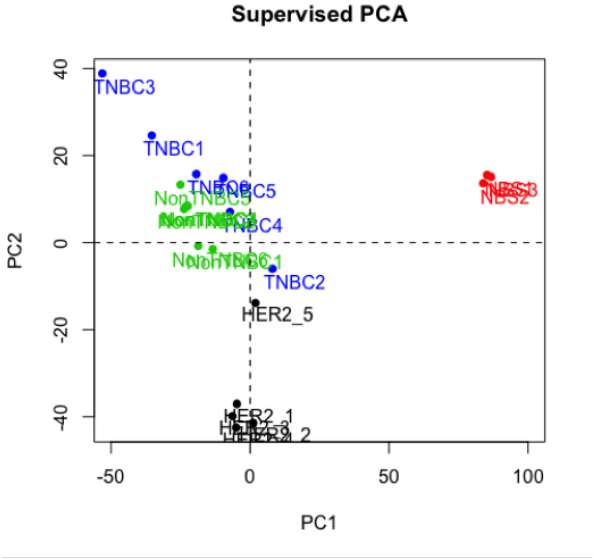
- Retrouvez les gènes cités précédemment dans notre jeu de données (différents noms peuvent exister pour un même gène = alias. Les gènes sont tous associés à une abbréviation appelée *Gene Symbol* et très utilisé dans les bases de données).
- Création des graphiques permettant de visualiser les mesures d'expression de ces gènes :
  Créez un graphique par gène avec en abscisse les 4 conditions et en ordonnée les comptages normalisés. Supprimer les labels des abscisses en précisant l'argument `xaxt='none'`. Vous pouvez ensuite personnaliser les labels des abscisses grâce à la fonction `axis()`.
  Cela vous parait-il cohérent avec ce que l'on pourrait attendre ? Que pensez vous de l'hétérogénéité entre les patients au sein d'un même sous groupe ?

Question 1.3: Comparez l'ACP et la heatmap générées sur la liste des gènes spécifiques à chaque sous type (voir figure ci-dessous) par rapport à l'ACP et à la heatmap obtenues sur les données non supervisées (lors du TP2). Que pouvez-vous en conclure ?


Unsupervised Heatmap
condition
NBS1
NBS2
NBS3
TNBC1
TNBC3
TNBC6
TNBC4
TNBC5
HER2_5
NonTNBC4
NonTNBC5
NonTNBC2
NonTNBC3
NonTNBC1
NonTNBC6
TNBC2
HER2_2
HER2_4
HER2_1
HER2_3
condition
HER2
NBS
Non-TNB
TNBC
350
300
250
200
150
100
50
0


Unsupervised PCA
PC2
PC1
HER2_5
TNBC2
TNBC1
TNBC3
NBS1
-200
-150
-100
-50
0
50
100
150
100
50
0
-50
-100


Supervised Heatmap
condition
NBS3
NBS1
NBS2
HER2_2
HER2_4
HER2_1
HER2_3
TNBC2
HER2_5
TNBC1
TNBC3
TNBC6
TNBC4
TNBC5
NonTNBC4
NonTNBC5
NonTNBC2
NonTNBC3
NonTNBC1
NonTNBC6
condition
HER2
NBS
Non-TNB
TNBC
200
150
100
50
0


Supervised PCA
PC2
PC1
TNBC3
TNBC1
TNBC2
HER2_5
-50
0
50
100
40
20
0
-20
-40

2 Analyse fonctionnelle : sur-représentation de catégories fonctionnelles

Question 2.1: Test de Fisher et table de contingence.

	ERBB	Not in ERBB	TOTAL
In my gene list	n_o	n-n_o	n
Not in my gene list	N_o-n_o	N-n-N_o+n_o	N-n
TOTAL	N_o	N-N_o	N

Avec :

- N : le nombre total de gènes de la table de comptage
- N_o : le nombre de gènes de la voie HER2.
- n : le nombre de gènes significativement différentiellement exprimés entre HER2 et NBS
- n_o : le nombre de gènes communs entre les deux listes de gènes

Un test de fisher sur la table de contingence ci-dessus permet de déterminer si notre liste de gènes significativement différentiellement exprimés est significativement enrichie par les gènes particpant à la voie de signalisation HER2 :

En vous appuyant sur le code suivant, construisez la table de contingence et calculez la p.value issue du test de Fisher (fonction `fisher.test`). Concluez.

```
### chargement de la liste de gene de la voie de signalisatin de ERBB2
erbb = read.delim("data_TP4/ERBB.txt", header = TRUE)
erbb = as.vector(erbb$GeneID)

### Selection de gènes d'interet à partir du contraste HER2 vs NBS
updown = read.table("data_TP4/dataMAplot_HER2_vs_NBS.txt", sep="\t", header=TRUE, row.names=1)
IDX = intersect(which(updown$Adj.p.value < 0.01), which(abs(updown$M) > 1))
her2_vs_nbs_gene = rownames(updown)[IDX]


### Gènes commun entre `erbb` et `her2_vs_nbs`
inter = intersect(erbb, her2_vs_nbs_gene)
```

Nous vous proposons à présent de réaliser la même démarche, à une plus grande échelle : rassurez-vous, de nombreuses applications web existent pour cela. Nous allons, dans ce TP, utiliser ToppGene.

Question 2.2 : Réalisez une analyse de sur-représentation de catégories fonctionnelles pour les gènes significativement différentiellement sur- et sous-exprimés au seuil de logFC de 1 pour le sous type HER2.

- Commencez par ouvrir le fichier `dataMAplot_HER2_vs_NBS.txt` dans Excel.
- Selectionnez la liste des gènes sur et sous-exprimés en utilisant un seuil de `logFC > 1 ou <= -1` et une `p.value ajustée <= 0.01`.
- En utilisant l'outil ToppFun (https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp), choisissez les identifiants HGNC Symbol (*Entry type*) et copiez/collez votre liste de gènes d'interêt, puis lancez l'analyse. L'application vous indique alors le nombre de symbols retrouvés dans sa propre base de connaissance. Dans le tableau listant les bases de données à interroger, sélectionnez :

- GO:Biological Process
- Pathway : BioSystems : KEGG
- Disease

Vous pouvez laisser les options de calcul par défaut (mode de correction FDR, cutoff de la p.value à 0.05).

Question 2.3 : Quels sont les processus biologiques `GO` les plus récurrents parmis l'ensemble des 34 premiers termes significatifs (donnez quelques mot-clefs) ?

Question 2.4 : Quelles sont les trois voies de signalisation de la base de données **KEGG** significativement enrichies ? En affichant plus de données `Show XX more annotations`, quelles voies de signalisation pourraient être intéressantes compte-tenu du contexte biologique ?

Question 2.5 : Que vous suggère le tableau n°3 ?

3 Visualisation de Pathways

Nous vous proposons de visualiser en détail la modulation des gènes de voies de signalisation.

Installez le package Bioconductor `pathview` :

```
source('http://www.bioconductor.org/biocLite.R')
biocLite("pathview")
```

note : pour comprendre en détail le fonctionnement de ce package, vous pouvez visualiser la "vignette" en utilisant le code suivant : `> browseVignettes(package = "pathview")`.

Question 3.1 : Quelles sont les gènes différentiellement exprimés au seuil de p.values ajustées de 1% et au seuil de valeur absolue de logFC de 1 ? Construisez une matrice d'une colonne contenant ces logFC. Les noms de lignes de cette matrice seront les noms des gènes.

Question 3.2 : A l'aide de la fonction `pathview()` du package que vous venez d'installer, et de la matrice de gènes précédemment construite, visualisez les *pathways* identifiés à la question 1.

note : utilisez les options `gene.data`, `pathway.id` et `gene.idtype = "SYMBOL"`

- hsa05224 : Breast cancer
- hsa04012 : ERBB signaling pathway
- hsa05200 : Pathway in cancer
- hsa04110 : Cell Cycle
- hsa04630 : JAK/STAT signaling pathway
- hsa04010 : MAPK signaling pathway
- hsa04150 : mTOR signaling pathway

Question 3.3 : Pour chacunes de ces voies, proposez une interpretation biologique.