

TP03 - Découverte de R - Exercices

Justine Guégan - ICONICS

17 mars 2017

Ce polycopié rassemble différents exercices vous permettant d'apprendre à utiliser le langage de programmation R, en particulier, la lecture/écriture de fichiers, les graphiques, l'interprétation d'un code R existant. De manière générale, pensez à lire toutes les sous-questions car elles permettent de vous guider.

La notation entre `<>` n'est pas une notation R, c'est juste pour vous indiquer de personnaliser ce qu'il y a entre `<>`. Par exemple, `brewer.pal(4, "<NomPaletteDeVotreChoix>")` pourrait correspondre à `brewer.pal(4, "Greys")`.

Je vous propose de créer un document Rmarkdown pour ce TP.

Exercice 1 : Résumer et visualiser une liste de variants

Cet exercice a pour but de vous faire:

- lire/écrire des fichiers (excel)
- filtrer des tableaux
- faire des représentations graphiques de base

Le fichier `VariantsTable.xlsx` est un tableau contenant une liste de variations génomiques (snps/indels) issues d'une capture de gènes faite par séquençage à haut débit, et ce, pour 4 patients : `Sample1`, `Sample2`, `Sample3` et `Sample4`. Cette liste de variants est annotée avec différentes base de données représentant les différentes colonnes du fichier.

1. Lire le fichier `VariantsTable.csv` (séparateur tabulation `\t`)

2. On veut travailler sur l'impact fonctionnel des variants.

2.1 A partir de la colonne `ExonicFunc.refGene`, comptabilisez le nombre de variants par catégorie **pour l'échantillon `Sample1`**. Indice : `which()` ; `==`

2.2 A partir du résultat de la question précédente, représentez les données sous forme de camembert, encore appelé pie chart (`pie()`). Le rendu de base de cette fonction n'est pas très joli ... Essayons de l'améliorer

2.3

- trie le résultat de la question 2.1 (`sort()`)
- dans les arguments de `pie`, supprimez les bords du camembert, changez les couleurs à l'aide du package `RColorBrewer`. Pour rappel, il faut a) charger ce package, b) définir un vecteur de couleurs tel que :

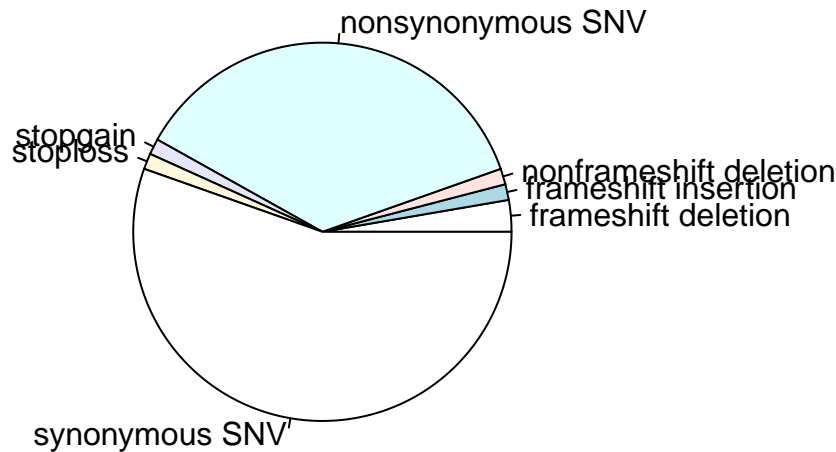
```
couleurs = brewer.pal(<NombreCouleursDeVotreChoix>, "<NomPaletteDeVotreChoix>")
```

- les tranches de certaines catégories sont si fines, que l'on a du mal à distinguer les noms. Il vaudrait peut-être mieux afficher une légende à côté de la figure. Pour cela, supprimer les labels dans la fonction `pie`, puis ajoutez une légende avec la commande suivante :

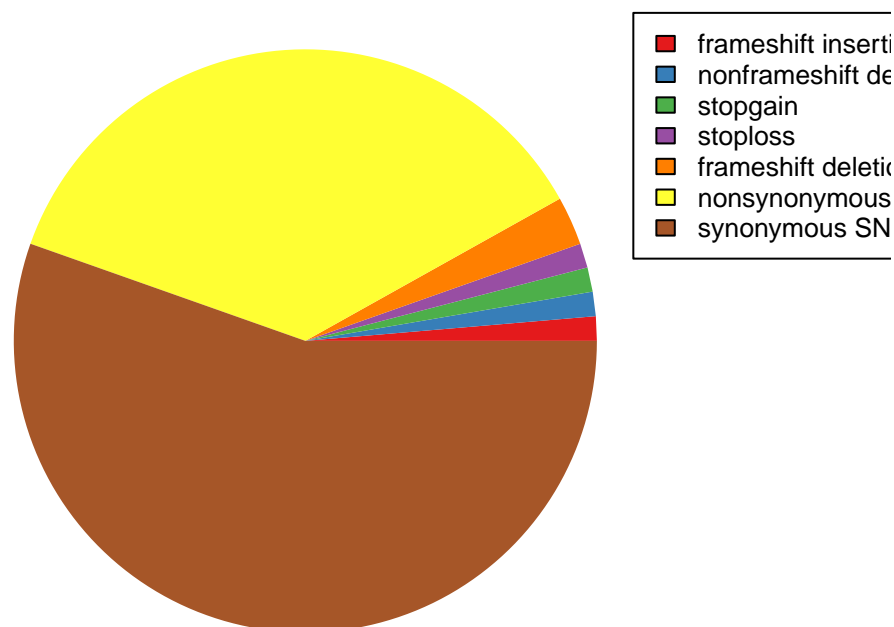
```
legend(0.9,0.9, legend=names(<NomObjet>), fill =brewer.pal(7, "<VotreCouleur>"), cex=0.8)
```

- le camembert paraît trop petit comparé à la légende ? Nous pouvons diminuer les marges de la figure avec la commande suivante : `par(mar=c(1,1,1,1))`. Pour résumer, dans l'ordre, diminuer les marges de la figure, plotter le pie chart, plotter la légende.

```
library(RColorBrewer)
data = read.table("exo1/VariantsTable.csv", sep="\t", header=TRUE)
datared = data[which(data$SampleID == "Sample1"),]
exonic = table(datared$ExonicFunc.refGene)
pie(exonic)
```



```
exonicsort = sort(exonic)
par(mar=c(1,1,1,1))
couleurs = brewer.pal(7, "Set1")
pie(exonicsort, border=FALSE, col=couleurs, labels=NA)
legend(0.9,0.9, legend=names(exonicsort), fill =brewer.pal(7, "Set1"), cex=0.8)
```



3 On souhaite créer un tableau contenant uniquement des variants d'intérêt :

3.1 Créer un vecteur `vec1` contenant uniquement les indices des variants des catégories suivantes pour les 4 échantillons : nonsynonymous SNV, stoploss, stopgain. Indice *which()*

3.2 Créer un vecteur `vec2` contenant uniquement les indices des variants dont le score CADD (CADD_phred) est supérieur à 12.37. Indice *which()*

3.3 Créer un vecteur `vec3` contenant les indices communs entre la question 6.1 et 6.2 Indice *intersect()*

3.4 Créer un nouveau tableau `tab` contenant uniquement les variants nonsynonymous SNV, stoploss, stopgain, dont le CADD_phred score est > 12.37. Vous pouvez visualiser ce tableau dans RStudio avec `View(tab)`.

3.5 Ecrire ce nouveau tableau sur votre ordinateur grâce à la fonction `write.table`.

```
vec1 = which(data$ExonicFunc.refGene == "nonsynonymous SNV" | data$ExonicFunc.refGene == "stopgain" | d
vec2 = which(data$CADD_phred > 12.37)
vec3 = intersect(vec1, vec2)
tab = data[vec3,]
write.table(tab, file="exo1/outputTable.txt", sep="t", quote=FALSE, row.names=FALSE)
```

Exercice 2 : Carte de chaleur (*Heatmap*)

Cet exercice a pour but de vous faire:

- lire des fichiers
- utiliser un package permettant de représenter des cartes de chaleurs, très utiles en génomique ([exemple](#))

Le fichier `counts_normalized.txt` contient les données d'expression, issues d'une expérience de RNASeq. Il y a 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). Ces données correspondent à une table de comptages avec en ligne les gènes et en colonnes les échantillons. Ci-dessous un aperçu du tableau :

```
count = read.table("exo2/counts_normalized.txt", sep="\t", header=TRUE, row.names=1)
knitr::kable(count[1:5,1:4])
```

	TNBC1	TNBC2	TNBC3	TNBC4
SGIP1	142.03539	236.39966	255.4641	143.75921
AZIN2	73.32584	116.83158	156.2464	259.95858
SLC45A1	19.08146	15.94601	36.0180	14.27993
NECAP2	585.03116	1402.18843	621.9858	1166.31359
CLIC4	3540.44581	4761.30416	5634.2282	5451.30335

Pour cet exercice nous aurons besoin du package `pheatmap`. Commencez par installer ce package et chargez le dans R.

1. Chargez en mémoire la table de comptage `counts_normalized.txt` en précisant que la première colonne doit correspondre aux `rownames` du tableau (pour cela regardez l'aide de la fonction `read.table`, option `row.names`). Appelez cette matrice `count`. Vous avez à présent l'habitude, vérifiez bien le tableau (`head`), les dimensions, stats de base etc ...

2. Transformez les données en \log_2 (fonction `log2`) dans une nouvelle matrice appelée `countLog2`.

```
countLog2 = log2(count)
```

3. Les lignes de commandes ci-dessous permettent de réaliser un t-test entre les condition HER2 et NBS, de corriger les p-values issues de ce test, puis de sélectionner les gènes dérégulés ($p\text{-value} \leq 0.05$ et $-2 < \text{fold-change} > 2$). Exécutez-les.

```
annot = read.delim("exo2/annot_sample.txt")

#création d'une fonction qui calcule la moyenne par groupe
computeMean = function( condition, count, label.grp){
  idx = which( condition == label.grp)
  if (length(idx) > 0){
    m = apply(count[,c(idx)], 1,mean)
    return(m)
  }
  else{
    warning(paste("Le label '",label.grp, "' n'est pas contenu dans le vecteur d'annotation"))
    return(NULL)
  }
}
```

```

    }
  }

#exécution de cette fonction sur nos 2 groupes d'intérêt
m_nbs    = computeMean(annot$condition, count, "NBS")
m_her2   = computeMean(annot$condition, count, "HER2")

M_HER2_vs_NBS = log2(m_her2 / m_nbs)

#t-test
idxHER2 = which(annot$condition == "HER2")
idxNBS  = which(annot$condition == "NBS")

pvHER2 = c()
for (i in 1:nrow(countLog2)){ # boucle pour faire le test sur tous les gènes
  ttHER2 = t.test( countLog2[i,idxHER2], countLog2[i,idxNBS])
  pvHER2 = c(pvHER2, ttHER2$p.value)
}

# correction des pvalues avec la méthode de Benjamini & Hochberg
p.adjHER2 = p.adjust(pvHER2, method = "BH")

# sélection des gènes dérégulés
idx = intersect( which(p.adjHER2 <= 0.05), which(abs(M_HER2_vs_NBS) >= 1) )
countRed = countLog2[idx,c(idxHER2, idxNBS)]

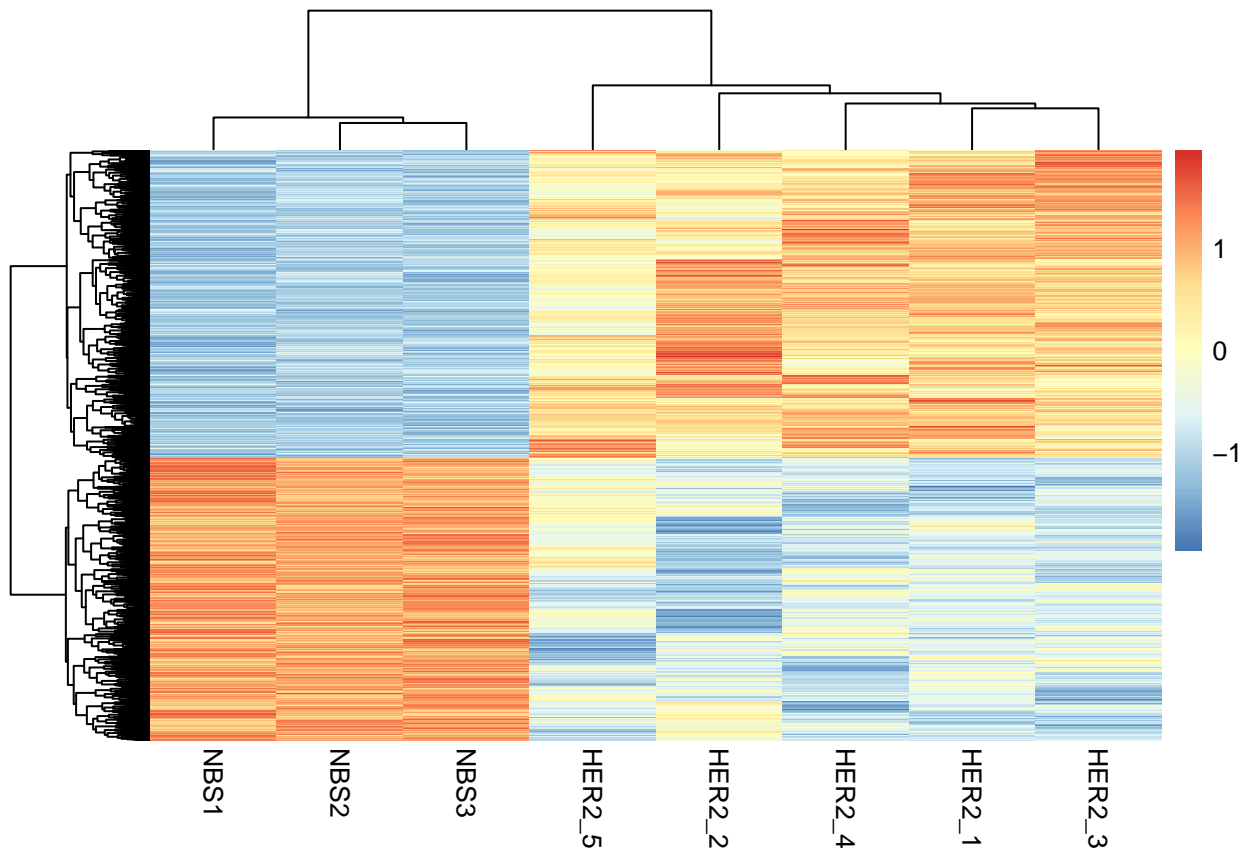
```

4. Représentez à l'aide de la fonction **pheatmap** une carte de chaleur des mesures d'expression de la matrice **countLog2**, **uniquement** pour les gènes dérégulés (les indices des gènes dérégulés correspondent à l'objet **idx** dans le bloc de code ci-dessus), et **uniquement** pour les conditions HER2 et NBS. En d'autres termes, créez une nouvelle matrice réduite sur les gènes dérégulés et sur les conditions HER2 et NBS. Une fois cette matrice créée, exécutez la fonction **pheatmap** dessus avec l'option **scale='row'**.

```

library(pheatmap)
countRed = countLog2[idx, c(idxHER2, idxNBS)]
pheatmap(countRed, show_colnames = TRUE, show_rownames = FALSE, scale='row')

```



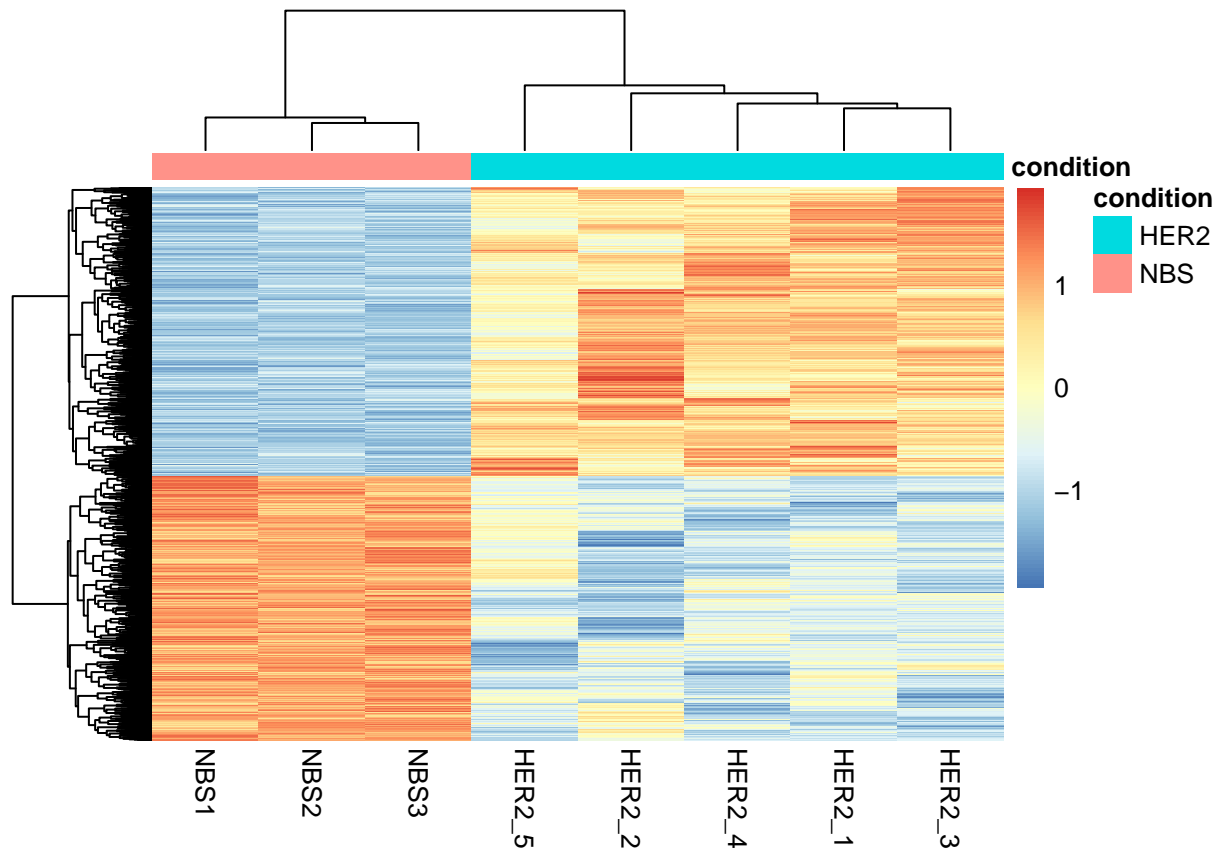
5. On peut ajouter une ou plusieurs lignes d'annotations d'échantillons et/ou gènes très facilement avec ce package. Par exemple, on va ajouter une ligne d'annotations des groupes sur notre heatmap. Pour cela :

5.1 On commence par créer la data frame d'annotations ; il est important que les rownames de cette dataframe soient les mêmes que les noms des échantillons de votre heatmap :

```
annotcols = data.frame(condition=annot$condition[c(idxHER2,idxNBS)])
rownames(annotcols) = annot$sampleName[c(idxHER2,idxNBS)]
```

5.2 Puis trouvez l'option de la fonction `pheatmap` qui permet d'ajouter l'annotation des échantillons.

```
pheatmap(countRed, show_colnames = TRUE, show_rownames = FALSE, scale='row',annotation_col = annotcols)
```



6 Pour finir, une astuce bien pratique en Rmarkdown. Vous avez dû remarquer que le t-test était assez long à s'exécuter. Ceci peut être le cas de certains de vos scripts. Si vous modifiez juste une virgule dans votre document Rmarkdown, vous n'avez pas envie de repasser x minutes (ou heures !) à exécuter votre code R que vous n'avez même pas touché ! Et pourtant, de base, c'est le comportement de Rmarkdown. Heureusement, une solution existe \emptyset ! Ca s'appelle le **cache** ([documentation](#)). Pour cela, dans les options des chunks, ajoutez `cache=TRUE`.

Faites un knit puis vous verrez apparaître dans votre dossier de travail un dossier appelé `***_cache`. Refaites un knit et voyez la différence de temps d'exécution. Bien entendu, si vous modifiez une ligne dans le chunk où il y a `cache=TRUE`, Rmarkdown ré-exécute votre code.