## Projet: ANOVA Phylogénétique

Présentation du Mardi 26 Mars 2024

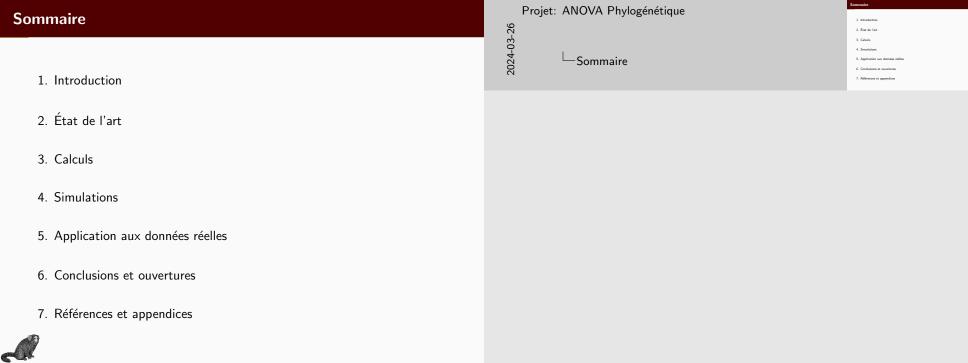
Alizée Geffroy, Louis Lacoste, encadrés par Mélina Gallopin et Paul Bastide

M2 MathSV Université Paris-Saclay

Projet: ANOVA Phylogénétique

Projet: ANOVA Phylogénétique Présentation du Mardi 26 Mars 2024

Allade Geffroy, Louis Lacoste, encadrés par Mélina Gallopin et Paul Basti MZ MakkSV Université Paircéaulay



#### Introduction

Projet: ANOVA Phylogénétique

Introduction

#### Contexte biologique

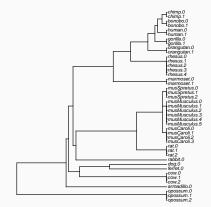


Figure 1: Arbre phylogénétique de Chen et al. 2019



Projet: ANOVA Phylogénétique \_\_Introduction

Contexte biologique



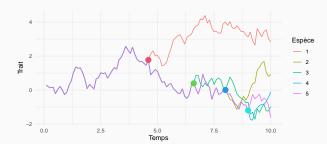
- Avec l'avènement des données "-omiques" de masses, on a accès à des données quantitatives très nombreuses pour plusieurs espèces.
- Le but derrière est de trouver les voies métaboliques et les gènes impliqués dans leur fonctionnement
- Problème : cela coûte cher de regarder tous les gènes.
- On veut alors trouver les gènes qui s'expriment différentiellement en utilisant des méthodes statistiques en contrôlant l'erreur de type I, c'est-à-dire les faux positifs.

#### article de Chen:

26

- En compilant plusieurs jeux de données pour plusieurs espèces avec parfois plusieurs individus *cf* l'arbre les auteurs regardent par exemple entre les espèces les gènes qui sont différentiellement exprimés dans le foie.
- Pour voir s'il y a une différence entre 2 groupes d'espèces ( $RatMus\ vs\ Autres$ ).  $\mu_1,\ \mu_2$  etc.

#### Mouvement brownien



**Figure 2:** Exemple d'un arbre phylogénétique dont le trait est généré selon un Mouvement Brownien

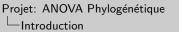


Figure 2: Exemple of an other phylogenistry and in test one global sales an interest Comment.

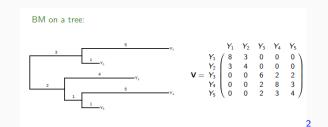
☐ Mouvement brownien

Pour un arbre phylo donné ça nous renseigne sur les instants de spéciation, donc moment de divergence entre 2 espèces représenté ici par les ronds. IMPORTANT : l'arbre phylogénétique est supposé connu, calibré<sup>1</sup> en temps et on n'y touche pas, nous.

- Ici représenté l'évolution d'un trait cad d'une valeur quantitaive qu'on considère : ex comptage du nombre d'ARN exprimé pour un gène donné.
- La valeur du trait peut diverger pour chaque espèce à partir du moment de spéciation.
- Processus stochastique utilisé comme support de modélisation le mouvement brownien.
- Finalement, on a juste accès aux observations aux feuilles, jamais à ce qu'il se passe jusqu'alors



26



Projet: ANOVA Phylogénétique
\_\_Introduction



- attention pas l'arbre correspondant au trait simulé dans la slide d'avant
- Une fois qu'on a les observations pour chaque, à partir du MB, on a cette covariance là
- expliciter avec l'exemple
- La matrice V ici porte alors l'information phylogénétique de l'arbre

# 2024-03

### État de l'art

% └─État de l'art

Projet: ANOVA Phylogénétique

. . .

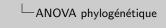
État de l'art

- On dispose des observations aux feuilles et de l'arbre, ou du moins de l'informtion phylo
- Une méthode classique c'est l'ANOVA mais ça ne s'applique pas à nos données car elles ne sont pas indépendantes
- Alors dans ce projet on va étudier et utiliser une méthode d'ANOVA phylogénétique que l'on va présenter

#### ANOVA phylogénétique

$$Y = X\beta + u, \ u \sim \mathcal{N}_n(0, \frac{\sigma_{phy}^2 K}{})$$
 (1)

où 
$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} Y_{11} \\ \vdots \\ Y_{1n_1} \\ Y_{21} \\ \vdots \\ Y_{2n_2} \end{bmatrix}$$
,  $\mathbf{X} = \begin{bmatrix} \mathbf{1} & \mathbf{1}_{n_1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ \vdots & \vdots \\ 1 & 1 \\ 1 & 0 \\ \vdots & \vdots \\ 1 & 0 \end{bmatrix}$ ,  $\beta = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \end{bmatrix}$ ,  $n = n_1 + n_2$ 





#### Rappel de l'ANOVA

- Pour rappel ici formule de 'ANOVA classique matricielle -¿ écrire au tableau
- Au tableau pas oublier de dire  $\beta 1 = \mu 1, \beta 2 = \mu 1 \mu 2$
- ullet ou  $\mu_1$  et  $\mu_2$  sont les moyennes du trait pour les groupes 1 et 2 que l'on considèrera

### ANOVA phylogénétique

- L'anova phylo consiste à inclure l'information de l'arbre
- Remarque, ici K correspond à la matrice V présentée quand on parlait de l'arbre, la covariance des  $Y_i, Y_i$

#### Statistique de test

Projet: ANOVA Phylogénétique État de l'art

 $\langle u, v \rangle_{V^{-1}} = u^T V^{-1} v.$ 

-Statistique de test

 $H_1: \beta_2 = 0 \Leftrightarrow \ell^T \beta = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ , les 2 groupes ont la même moyenne  $F_{ANO(N)phylos} = \frac{\|\hat{Y} - \tilde{Y}\|_{K-1}^2 (n-2)}{\|Y - \tilde{Y}\|_{K-1}^2} \underset{ir}{\sim} \mathcal{F} inher(1, n-2) \qquad (2)$ 

Pour  $\ell = \begin{bmatrix} 0 \\ \cdot \end{bmatrix}$ 

Pour  $\ell = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix}$ :

$$H_0: \beta_2 = 0 \Leftrightarrow \ell^T \beta = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$
, les 2 groupes ont la même moyenne

 $H_1: \beta_2 \neq 0$ , les 2 groupes ont des moyennes différentes

On a alors la statistique de test suivante :

$$F_{ANOVAphylo} = \frac{||\hat{Y} - \bar{Y}||_{K^{-1}}^2 (n-2)}{||Y - \hat{Y}||_{L^2}^2} \underset{\mathcal{H}_0}{\sim} \mathcal{F} isher(1, n-2)$$
 (2)

la matrice des temps de coévolution.

cela revient à projeter l'écart à la moyenne et les erreurs sur l'inverse de K

• H0 : les 2 groupes ont la même moyenne, c'est à dire pour notre exemple que le gène n'est pas diff exprimés le gène a le même niveau d'expression • On peut noter ici par rapport à la stat de test pour l'anova classique, que

- Pour la démo voir les slides en appendices. (Mettre slide 39 et 46 Bastide
- and Clavel 2022) • Donc c'est la projection orthogonale par rapport au produit scalaire
- Pourquoi les dl de la loi de Fisher : 1 = K 1 ici K = 2 et n 2 = n K.

données: erreur intraspécifique

$$Y = X\beta + u + \epsilon, \quad u \sim \mathcal{N}_n(0, \sigma_{nhv}^2 K), \quad \epsilon \sim \mathcal{N}_n(0, \sigma_{err}^2 I_n)$$
 (3)

En posant  $\lambda=\frac{\sigma_{phy}^2}{\sigma_{err}^2}$  et  $E=u+\epsilon$ , on peut obtenir une nouvelle forme pour Y

$$Y = X\beta + E$$
, où  $Var(E) = V(\theta) = \sigma_{phy}^2(K - \lambda I_n) = \sigma_{phy}^2 V_\lambda$  (4)  
 $E \sim \mathcal{N}_n(0, \sigma_{phy}^2 V_\lambda)$ 

Problème:  $\lambda$  n'est en général pas connu et il faut l'estimer. Dans ce cas, le test n'est pas exact et F ne suit plus la même loi de Fisher.

Projet: ANOVA Phylogénétique

LÉtat de l'art

ANOVA phylogénétique et erreur de mesure

- On spate we error de ensure qui consepad misse à la initial des demons en moi interploifique  $Y=X\delta+s+\epsilon,\quad s-N_{c}(0,\sigma_{po}^{s}(K),\quad s-N_{c}(0,\sigma_{po}^{s}(L)))$  En passe  $\lambda=\frac{n^{2}}{2}$  et  $E=s+\epsilon$ , un part deteir un ensuelle forme par Y  $Y=KE, \ ch \ Ver(E)=V(\theta)=\sigma_{po}^{s}(K-\lambda L)=\sigma_{po}^{s}(V,V)$  (c)  $E=N_{c}(0,\sigma_{po}^{s}(K))$  and  $E=N_{c}$
- Erreur intra-spécifique : variabilité entre les observations
- Donc on ne sait pas comment l'estimation de λ fait évoluer les degrés de libertés et l'idée est donc ici d'utiliser l'approximation de Satterthwaite pour estimer les degrés de liberté.
- Remarque : il est toujours possible de réaliser le test avec cette statistique mais l'on s'attend à ce que le test puisse se tromper.



Calculs

-Calculs

Projet: ANOVA Phylogénétique

• Jusqu'ici nous avons étudier le modèle d'ANOVA phylo, ça a été un apprentissage. A partir d'ici ce sont nos calculs avec pour but leur implémentation.

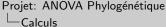
#### **Calculs**

$$F_{approx} = \frac{||\hat{Y} - \bar{Y}||_{V_{\lambda}^{-1}}^{2} df_{approx}}{||Y - \hat{Y}||_{V_{\lambda}^{-1}}^{2}} \underset{\mathcal{H}_{0}}{\sim} \mathcal{F} isher(1, df_{approx})$$
 (5)

Avec 
$$df_{approx} = \frac{2(f(\hat{\theta}))^2}{[\nabla f(\hat{\theta})]^T A [\nabla f(\hat{\theta})]}$$
 (6)

où  $f(\theta) = \ell^T C(\theta) \ell$  et A matrice de variance-covariance de  $\hat{\theta} = (\hat{\sigma}_{phy}^2, \hat{\sigma}_{err}^2)$ 

$$C(\theta) = (Cov(\beta_i, \beta_j))_{i,j}$$
  
=  $(X^T V(\theta)^{-1} X)^{-1} = (X^T (\sigma_{phv}^2 K + \sigma_{err}^2 I_n)^{-1} X)^{-1}$ 



Calcul avec approximation de Satterthwaite



- On obtient alors des degrés de liberté approximés, qui nous permettent d'obtenir une stat de test elle aussi approximée.
- A partir de la doc du package ImerTest, en considérant le contexte de modèle mixte on a une formule approximée des degrés de liberté et donc nous avons calculé des formules explicites du gradient de f et de A. Et voilà.
- Et nous les avons implémentées pour pouvoir réaliser les tests à partir de cette nouvelle statistique.

# 2024-03-2

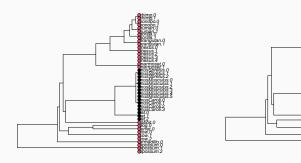
# Projet: ANOVA Phylogénétique

Simulations

Après avoir implémenté, nous avons donc réalisé des simulations afin de regarder comment se comporte les méthodes : ANOVA classique, ANOVA phylogénétique et ANOVA phylogénétique avec approximation de Satterthwaite.

#### **Simulations**

#### Modalités de simulations



- (a) Groupes Mus et rats contre les autres
- (b) Groupes sélectionnés sans respect de la phylogénie.

Figure 3: Arbre et groupes pour les simulations





Modalités de simulations

- Afin d'avoir une idée des performances des méthodes, nous avons choisis de les comparer dans un contexte proche des cas d'application réels.
- Nous reprenons l'arbre de Chen et al. 2019
- Et nous allons tester deux situations
- 1. RatMus contre les autres espèces Figure 3a, donc l'information phylogénétique joue un rôle.
  - 2. ET les espèces réparties en deux groupes sans lien avec la classification phylogénique
- Ce à quoi on s'attend **LE DESSIN**: un trait évoluant selon un processus stochastique, aboutissant à 2 valeurs différentes, l'ANOVA dit qu'il y a un saut, mais l'ANOVA phylogénétique connaissant la matrice K dit que c'est normal c'est la dérive, on a divergé il y a longtemps.

26

Modalités de simulations

Nous re-paramétrisons :

$$v_{tot} = \sigma_{phylo}^2 + \sigma_{err}^2 = 1$$

Et alors les paramètres du modèle s'expriment :

$$\sigma_{phylo}^2 = h \times v_{tot},$$

$$\sigma_{phylo}^2 = h \times v_{tot},$$
 $\sigma_{prr}^2 = (1 - h) \times v_{tot}$ 

2024-03-26

-Simulations

variance totale,  $v_t$  ot la formule.

Projet: ANOVA Phylogénétique

-Modalités de simulations

paramètre à faire varier, h, l'héritabilité. Qui se base sur le fait que la

Nous re-resembleisers



 $\sigma_{absta}^2 = h \times v_{tot}$ 

Et nous avons réalisé des simulations pour h ∈ (0.3.0.5.0.7.0.9)

 $\sigma^2 = (1-h) \times v_{tot}$ 



Ainsi, 
$$h = 0$$
 signifie qu'il y a seulement du bruit, et  $h = 1$  seulement de

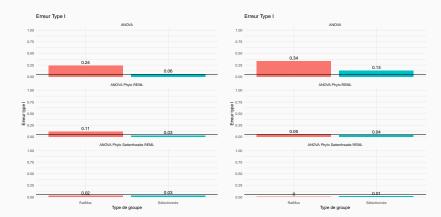
Ainsi, 
$$h = 0$$
 signifie qu'il y a l'information phylogénétique.

Ainsi, 
$$h = 0$$
 signifie qu'il y a seul



Et nous avons réalisé des simulations pour  $h \in \{0.3, 0.5, 0.7, 0.9\}$ .

#### Résultats: Erreur de type I



- (a) Erreur de type I pour les simulations avec h = 0.3
- **(b)** Erreur de type I pour les simulations avec h = 0.9

**Figure 4:** Erreurs de type I pour  $h \in \{0.3; 0.9\}$ 



Projet: ANOVA Phylogénétique

 $\square$ Simulations

26

2024-03-

Résultats: Erreur de type I

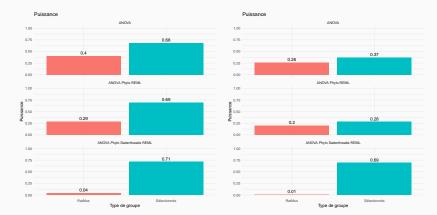


- Pour comparer les méthodes nous nous intéressons à deux métriques, l'erreur de type I et la puissance.
- L'erreur de type I est particulièrement importante à contrôler car comme nous en avons parlé plus haut, des faux-positifs impliqueraient donc des expériences inutiles et particulièrement coûteuses.
- A noter ici que nous ne regardons que les méthodes qui minimisent le critère REML (Restricted Maximum Likelihood) car ce sont elles qui fournissent une estimation de la variance non biaisée. Ce critère améliore sensiblement l'estimation de la variance.
- Remarque: l'ANOVA telle qu'implémentée dans R utilise directement le REML.

#### Analyse :

- erreur type I pour groupe phylogénétique: h 0.3 l'ANOVA classiques trompe bcp, l'ANOVA phylo se trompe, seule ANOVA phylo
   Satter est sous la barre des 0.5 = controle bien les faux positifs
- h=0.9: ANOVA classque se trompe toujours et plus, ANOVA phylo est au seuil 5 % pas étonnant il y a plus d'info phylogénétique, avec Satterthwaite on a aucune erreur
- au global l'ANOVA phylo avec Satterthaite controle dans les 2 cas l'erreur de type I, et comme on s'y attend l'ANOVA phylo fait mieux que l'ANOVA classique
- groupe pas phylo: h=0.3 l'ANOVA se trompe legerement, elle depasse le seuil, les autres sont en dessous à 0.03
- pour h =0.9 l'ANOVA se trompe plus, elle depasse le seuil, les autres sont en dessous
- touk, avec faible héritabilité on est dasn un résultat proche de l'attendu : l'ANOVA se trompe à peine, avec forte héritabilité l'erreur est plus marquée ce qui est étonnant au vu des groupes selectionnes
- Tout d'abord nos données ne respectent les hypothèses de l'ANOVA. On suspecte que la manière dont on a constitué les groupes n'a pas suffisamment cassé la phylogénie.

#### Résultats: puissance



- (a) Puissances pour les simulations avec h = 0.3
- (b) Puissances pour les simulations avec h = 0.9

**Figure 5:** Puissances pour  $h \in \{0.3; 0.9\}$ 



Projet: ANOVA Phylogénétique Simulations

Résultats: puissance



- puissance statistique: quantifie les vraies positifs il faut qu'elle soit grande
- Situation groupe avec info phylogénétique: Revers de la médaille mauvaises puissances voire très mauvaises: CATASTROPHIQUE
- $\bullet$  h = 0.3 + groupes selectionnes: on a des puissance correctes ce qui nous rassure sur l'implémentation des Méthodes
- ullet h= 0.9 + groupes selectionnes : ANOVA et ANOVA phylo pas très bonne puissances, c'est inquiétant : toujours meme hypothèse il reste ude l'info phylo
- pour SAtterthwaite ca parait bien c'est la meme chose

2024-03-26

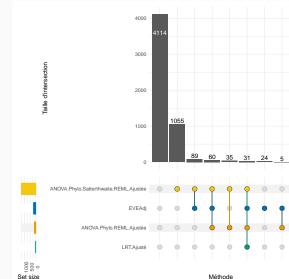
#### Application aux données réelles

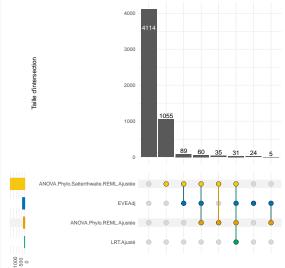
Projet: ANOVA Phylogénétique
Application aux données réelles

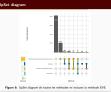
Application aux données réelles

- On a des données pour environ 5400 genes pour 17 especes toujours selon le meme arbre
- On passe a un test multiple sur tous les genes : on fait un test par gene et on corrige par la technique de Benjamini et Hochberg
  - Nous allons appliquer les différentes méthodes aux données compilées par Chen et al. 2019. Il s'agit de données de RNA-seq chez 17 espèces et de l'arbre phylogénétique présenté figure 1.

#### **UpSet diagram**







- ANOVA phylo Satterthwait REML surselectionne des genes
- mais il y a des recoupements

Projet: ANOVA Phylogénétique

Application aux données réelles

-UpSet diagram

• Lrt sous selectionne

2024-03-26

• la méthode EVE (Expression Variance and Evolution) c'est l'état de l'art basé sur Irt



**Figure 6:** UpSet diagram de toutes les méthodes en incluant la méthode EVE  $_{13/17}$ 

#### **Conclusions et ouvertures**

#### Conclusions

- La méthode d'ANOVA phylogénétique avec Satterthwaite parait intéressante, notamment pour le contrôle de l'erreur de type I. Mais il faudra creuser pour essayer de comprendre la dégradation de la puissance.
- Au début nous utilisions une approximation de l'hessienne, remplacée par la forme analytique une fois celle-ci obtenue.

Projet: ANOVA Phylogénétique

Conclusions et ouvertures

La nation é ANOVA phylogénétique are factorituants paraît intensants, requirement par la mention de paraît intensants, requirement para la mention de paraît intensants, requirement paraît la different de paraît la fill particular paraît intensants, requirement paraît la different de paraît la fill paraîte de formation de fo

 Approximation Hessienne : calculée par approximation numérique, méthode de Richardson.

26

2024-03-

Ouvertures

- 26
- Projet: ANOVA Phylogénétique Conclusions et ouvertures

-Ouvertures

· Changer de processus stochastique ? Le processus · Comprendre pourquoi avec l'approximation de Satterthwaite sur le données réelles il y a eu une sur-sélection.

d'Ornstein-Uhlenbeck.

- . Changer les conditions de simulations : prendre un autre arbre.
- autres données, ou ré-échantillonner les groupes. · Ces méthodes test gène par gène quis corrige pour faire un test multiple. On pourrait développer des méthodes qui font sur tous les pines en même temps (adaptation phylopénétique de la méthode

- Changer de processus stochastique ? Le processus d'Ornstein-Uhlenbeck.
- Comprendre pourquoi avec l'approximation de Satterthwaite sur les données réelles il y a eu une sur-sélection.
- Changer les conditions de simulations : prendre un autre arbre, autres données, ou ré-échantillonner les groupes.
- Ces méthodes test gène par gène puis corrige pour faire un test multiple. On pourrait développer des méthodes qui font sur tous les gènes en même temps (adaptation phylogénétique de la méthode LIMMA).



#### Remerciements

Merci pour votre attention.

leur gentillesse.

Merci à nos encadrants pour leur accompagnement, leur disponibilité et

Projet: ANOVA Phylogénétique

Conclusions et ouvertures

-Remerciements



Merci pour votre attention.









#### Références et appendices

Références et appendices

#### References

- Bastide, Paul and Julien Clavel (Dec. 2022). "Continuous Trait
- Evolution". Chen, Jenny et al. (Jan. 2019). "A Quantitative Framework for Characterizing the Evolutionary History of Mammalian Gene Expression". In: *Genome Res* 29.1, pp. 53–63. ISSN: 1549-5469. DOI:
- 10.1101/gr.237636.118. pmid: 30552105. Kuznetsova, Alexandra, Per B. Brockhoff, and Rune H. B. Christensen (2017). "ImerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models". In: J. Stat. Soft. 82.13, ISSN: 1548-7660. DOI: 10.18637/jss.v082.i13. URL:

http://www.jstatsoft.org/v82/i13/ (visited on 03/01/2024).

Expression", In: Genome Res 29.1, pp. 53-63, 1881; 1549-5469, pp. -References Rune H. B. Christensen (2017). "InnerTest Package: Tests in Linea Mixed Effects Models\*. In: J. Stat. Soft. 82.13, 1880: 1548-7660. DOI: 10.18637/1mm.v082.113.URL: http://www.jstatsoft.org/v82/113/ (visited on 03/01/2024).



#### **Code pour les simulations**

Le code pour les simulations, nos implémentations, le rapport et cette présentation est disponible sur notre dépôt GitHub :

#### https:

//github.com/Polarolouis/anova-phylogenetique-projet-msv/

Projet: ANOVA Phylogénétique

La colle pour les aimulations. de region de cette princetion, en implimentation, le region de cette princetion ent dispublic err non definic Girls.

Code pour les simulations

Altyr.

//gatab.com/Praisatelata/Anousy phylogenetaque yeazer.

2024-03-26

#### **Concernant les fautes d'orthographes**

Après relecture du rapport, nous avons pu constater que celui-ci contenait de nombreuses coquilles. Nous vous présentons nos excuses.

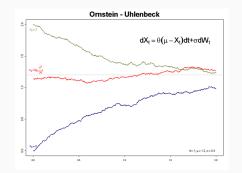
Projet: ANOVA Phylogénétique

Aph relation de regard, tous even pe condair ou orde d' critical de conference capolle. Note sons pérantien no recons

#### **Ornstein-Uhlenbeck**

Une autre possibilité de processus stochastique est le processus d'Ornstein-Uhlenbeck (*mean-reverting process*) décrit par l'EDS suivante:

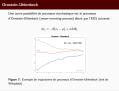
$$\mathrm{d}r_t = -\theta(r_t - \mu) + \sigma \mathrm{d}W_t$$



**Figure 7:** Exemple de trajectoires de processus d'Ornstein-Uhlenbeck (tiré de Wikipédia)

Projet: ANOVA Phylogénétique

└─Ornstein-Uhlenbeck



- Ce processus tend avec le temps vers la valeur  $\mu$  et peut donc modéliser l'existence d'un optimum pour le trait considéré.
- C'est le processus qui sous-tend le modèle EVE
- Et l'idée derrière que ce n'est pas le processus qui saute, mais l'optimum et il modélise donc deux niches différentes.

#### Lien modèle mixte

TODO Ajouter la formule canonique du modèle mixte

Lien modèle mixte

Projet: ANOVA Phylogénétique

#### Obtention des estimateurs

En connaissant l'arbre et le processus stochastique, le modèle s'écrit:

$$Y = X\beta + \sigma E, E \sim \mathcal{N}(0_n, K)$$

De là par les formules classiques on 
$$K = LL^T \hspace{1cm} \text{a les estimateurs} :$$

$$Var[L^{-1}E] = L^{-1}V[L^{-1}]^T = I$$
  $\hat{\beta} = (X^TV^{-1}X)^{-1}X^TV^{-1}Y$ 

Et on peut alors écrire la régression  $\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n-p} (Y - X\hat{\beta})^T V^{-1} (Y - X\hat{\beta})$  décorrélée :

Projet: ANOVA Phylogénétique

Obtention des estimateurs

 $Y = X\beta + cE_c E - N(0_m K)$ De its par less formules classiques on  $K = LL^T$ als a satirations:  $N_{eff}(-1)^2 = L^{-1}V[L^{-1}]^T = I$   $\beta = (X^TV - X^2) - X^2V - V$ on pout dion sionie la rigression  $c^2 = \frac{1}{n} = \frac{1}{n}(Y - X_0^2)^{T-1}(Y - X_0^2)^{T-1}$ 

La F stat

2024-03-26

$$F = \frac{\text{variance entre groupes}}{\text{variance intra-groupes}}$$
 
$$\text{variance extra} = \frac{\sum_{i=1}^{p} n_i (\bar{Y_{i,.}} - \bar{Y})^2}{p-1}$$
 
$$\text{variance intra} = \frac{\sum_{i=1}^{p} \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{i,j} - \bar{Y_{i,.}})^2}{n-p}$$