Atelier prédiction génomique : premiers pas

Vincent Segura (INRAE)

d'après 'premiers-pas.Rmd' de Timothée Flutre (INRAE)

Introduction

R, rmarkdown, RStudio

- Cette présentation a été générée à partir d'un fichier texte au format Rmd utilisé par le logiciel libre R
- La fonction `render` du package rmarkdown permet de générer le fichier html à partir du fichier Rmd

```
library(rmarkdown)
render("premiers-pas-slides.Rmd")
```

- Il est généralement plus simple pour faire ça d'utiliser le logiciel RStudio
- Le format Rmd permet également d'utiliser le language LaTeX pour écrire des équations

Packages

- Cette présentation nécessite par ailleurs le chargement des packages MASS et stats4 qui sont généralement inclus par defaut dans R

```
library(MASS)
library(stats4)
```

Notation et vocabulaire

- L'inférence avec un modèle statistique consiste généralement à **estimer les paramètres**, puis à s'en servir pour **prédire de nouvelles données**
- Lorsqu'on propose un modèle, on commence par expliquer les **notations**
- **Conventions** :
  - **lettres grecques** pour les **paramètres** (non-observés), par exemple θ
  - **lettres romaines** pour les **données observées**, y
  - **lettres romaines** surmontées d'un **tilde** pour les **données prédites**, $\tilde{y}$
  - les **ensembles** de données ou de paramètres sont généralement notés en **majuscule**, $\mathcal{D} = \{y_1, y_2, y_3\}$ ou $\Theta = \{\theta_1, \theta_2\}$
  - s'il y a plusieurs paramètres ou données, ils se retrouvent mathématiquement dans des **vecteurs**, en **gras**, $\boldsymbol{\theta}$ et $\boldsymbol{y}$
  - les vecteurs sont en **colonne**

La notion de vraisemblance

- Une fois les notations établies, on écrit la **vraisemblance** (*likelihood*), souvent présentée comme étant la *"probabilité des données sachant les paramètres"*
- Si les données sont des **variables continues**, c'est la densité de probabilité des données sachant les paramètres, notée $p(y|\theta)$
- La vraisemblance est une fonction des **paramètres**, d'où le fait qu'on la note $\mathcal{L}(\theta)$ ou $\mathcal{L}(\theta|y)$
- la méthode du **maximum de vraisemblance** cherche à identifier la valeur du paramètre, notée $\hat{\theta}$ par convention, qui maximise la vraisemblance

$$\hat{\theta} = \text{argmax}_\theta \, \mathcal{L} \quad \Leftrightarrow \quad \frac{\partial \mathcal{L}}{\partial \theta}(\hat{\theta}) = 0$$

Comprendre la vraisemblance

- Supposons que l'on étudie une quantité physique dont la valeur résulte de la **somme** d'une **très grande quantité** de **facteurs indépendants**, **chacun ayant un faible impact** sur la valeur finale
- On prend trois mesures de cette quantité d'intérêt
- Comme il y a de la variation, on choisit d'introduire une **variable aléatoire** Y correspondant à la quantité d'intérêt, et on dénote par y_1, y_2 et y_3 les trois observations, vues comme des réalisations de cette variable aléatoire :

$$y_1 = 4.374,\ y_2 = 5.184,\ y_3 = 4.164$$

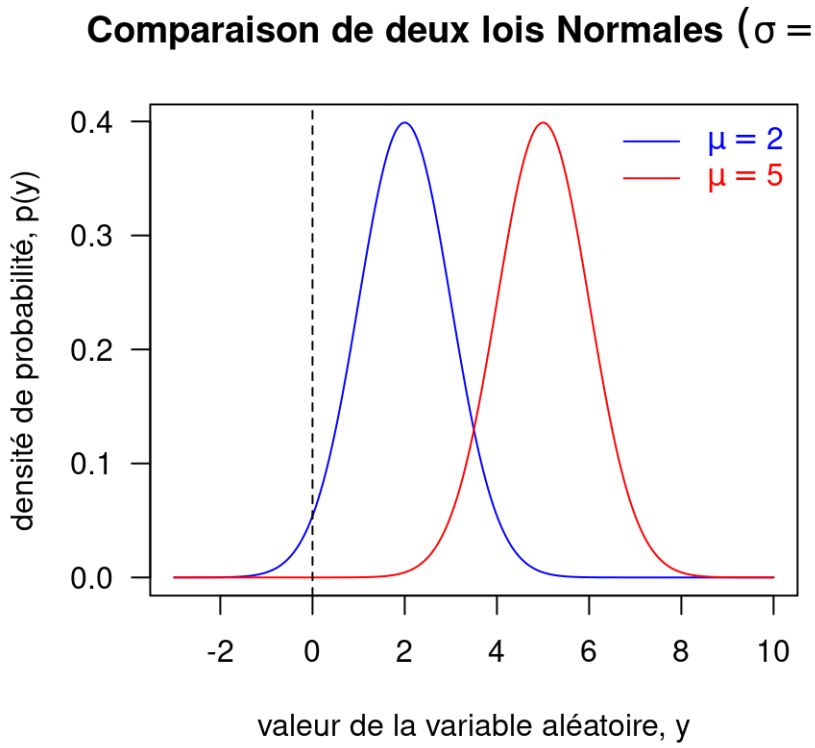
- Etant donné les caractéristiques du phénomène, il est raisonnable de supposer que la variable Y suit une **loi Normale** (c.f. le théorème central limite

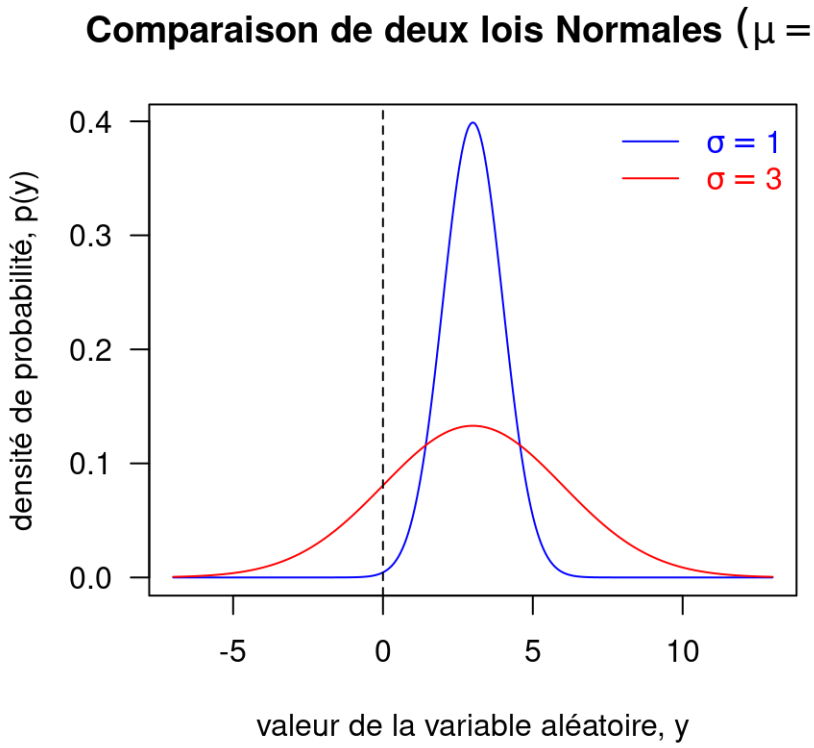
- Cette distribution de probabilité est caractérisée par deux paramètres, sa **moyenne** que l'on note généralement μ, et sa **variance** que l'on note généralement σ^2 (σ étant l'écart-type)
- En terme de notation, on écrit $Y \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$, et la densité de probabilité de la réalisation y de Y s'écrit :

$$Y \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2) \quad \Leftrightarrow \quad p(Y = y \mid \mu, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(y-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)$$

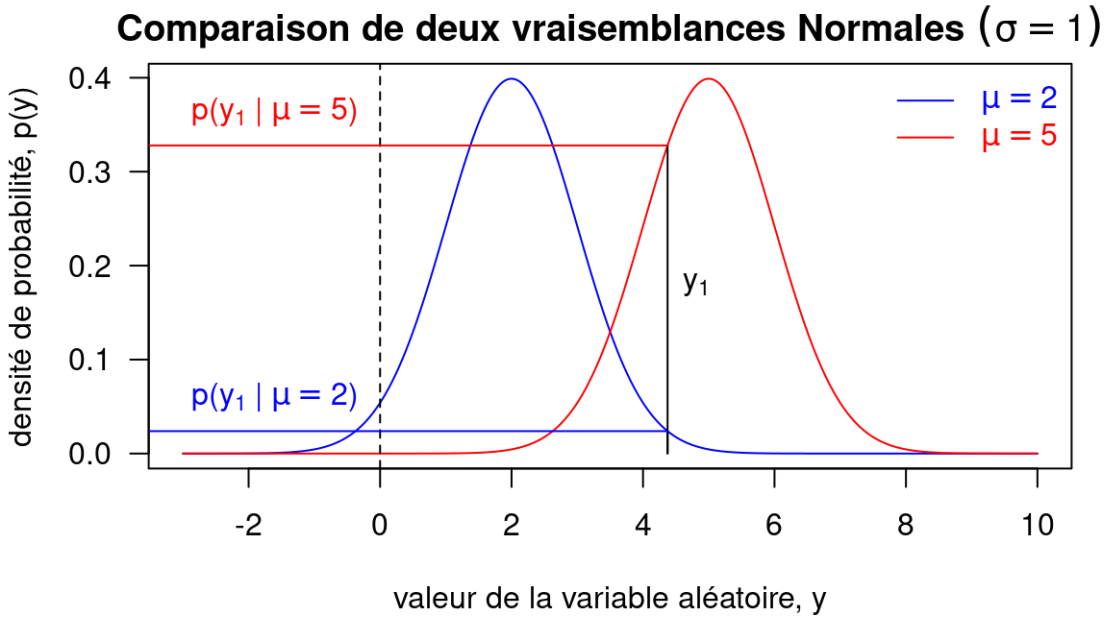
- L'intérêt de ce **modèle paramétrique** est de pouvoir **"résumer"** les données, par exemple un million de mesures, par seulement **2 valeurs**, les **paramètres**

- Mais, nous ne connaissons pas les valeurs de paramètres !
- La moyenne μ peut prendre toutes les valeurs entre $-\infty$ et $+\infty$, et la variance σ^2 n'a pour seule restriction que d'être positive
- La loi Normale peut être assez différente selon les valeurs de ces paramètres





- Revenons à nos trois mesures : 4.374, 5.184, 4.164
- Parmi toutes les valeurs possibles des paramètres, quelles sont celles pour lesquelles la loi Normale est une bonne description du mécanisme qui a généré ces données ?
- Pour simplifier, supposons que l'on connaisse déjà la variance : $\sigma^2 = 1$, il ne nous reste plus qu'à trouver la moyenne : μ.
- Pour la première observation, y_1 = 4.374 :



- D'après le graphique précédent :
  $p(y_1 \mid \mu = 5, \sigma = 1) > p(y_1 \mid \mu = 2, \sigma = 1)$
- Cela se vérifie si l'on fait le calcul avec la formule :
  - $p(y_1 \mid \mu = 5, \sigma = 1)$ = 0.328
  - $p(y_1 \mid \mu = 2, \sigma = 1)$ = 0.024
- Au final, nous pouvons conclure pour la première observation, que la vraisemblance $\mathcal{L}(\mu = 5, \sigma = 1)$ est plus grande que $\mathcal{L}(\mu = 2, \sigma = 1)$

- Comme on dispose de **plusieurs observations**, $\{y_1, y_2, y_3\}$, et qu'on suppose qu'elles sont toutes des réalisations de la même variable aléatoire, Y, il est pertinent de calculer la **vraisemblance** de toutes ces observations **conjointement** plutôt que séparément :

$$\mathcal{L}(\mu, \sigma) = p(y_1, y_2, y_3 \mid \mu, \sigma)$$

- Si l'on fait aussi l'hypothèse que ces observations sont **indépendantes**, cela se simplifie en :

$$\begin{aligned}\mathcal{L}(\mu, \sigma) &= p(y_1 \mid \mu, \sigma) \times p(y_2 \mid \mu, \sigma) \times p(y_3 \mid \mu, \sigma) \\ &= \prod_{i=1}^{3} p(y_i \mid \mu, \sigma)\end{aligned}$$

- Il n'est pas très pratique de maximiser la vraisemblance directement, on préfère passer au log (qui est monotone, donc le maximum de l'un est aussi le maximum de l'autre) :

$$
\begin{aligned}
l(\mu, \sigma) &= \log \mathcal{L}(\mu, \sigma) \\
&= \sum_{i=1}^{3} \log p(y_i \mid \mu, \sigma) \\
&= \sum_{i=1}^{3} \log \left[\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(y_i - \mu)^2}{2\sigma^2} \right) \right] \\
&= -3 \log \sigma \; - \frac{3}{2} \log(2\pi) \; - \frac{1}{2\sigma^2} \sum_{i=1}^{3} (y_i - \mu)^2
\end{aligned}
$$

- En pratique, on écrit une **fonction** qui calcule la **log-vraisemblance**, et on cherche le **maximum** de cette fonction

```
compute.log.likelihood <- function(parameters, data){
  mu <- parameters[1]
  sigma <- parameters[2]
  y <- data
  n <- length(y)
  log.lik <- - n * log(sigma) - (n/2) * log(2 * pi) - sum(((y - mu)^2) / (2 * sigma^2))
  return(log.lik)
}

compute.log.likelihood(c(5,1), y)
```

```
## [1] -3.32
```

```
compute.log.likelihood(c(2,1), y)
```

```
## [1] -13
```

- Dans le cas de la **loi Normale**, il existe déjà dans R des fonctions implémentant la densité de probabilité, ce qui nous permet de vérifier que nous n'avons pas fait d'erreur

```
sum(dnorm(x=y, mean=5, sd=1, log=TRUE))
```

```
## [1] -3.32
```

```
sum(dnorm(x=y, mean=2, sd=1, log=TRUE))
```

```
## [1] -13
```

Ecrire le modèle

Notations

- n : nombre d'individus (diploïdes, supposés non-apparentés)
- i : indice indiquant le i-ème individu, $i \in \{1, \ldots, n\}$
- y_i : phénotype de l'individu i pour la caractère d'intérêt
- μ : moyenne globale du phénotype des n individus
- f : fréquence de l'allèle minoritaire au marqueur SNP d'intérêt
- x_i : génotype de l'individu i à ce SNP, codé comme le nombre de copie(s) de l'allèle minoritaire, $\forall i \; x_i \in \{0, 1, 2\}$
- β : effet additif de chaque copie de l'allèle minoritaire en unité du phénotype

Notations (suite)

- ϵ_i : erreur pour l'individu i
- σ^2 : variance des erreurs
- Données : $\mathcal{D} = \{(y_1 \mid x_1), \ldots, (y_n \mid x_n)\}$
- Paramètres : $\Theta = \{\mu, \beta, \sigma\}$

Vraisemblance

- On suppose que le génotype au SNP d'intérêt a un effet additif sur la moyenne du phénotype, ce qui s'écrit généralement :

$$\forall i \quad y_i = \mu + \beta x_i + \epsilon_i \text{ avec } \epsilon_i \overset{\text{i.i.d}}{\sim} \mathcal{N}(0, \sigma^2)$$

- Une autre façon équivalente de l'écrire :

$$\forall i \quad y_i \mid x_i, \mu, \beta, \sigma \overset{\text{i.i.d}}{\sim} \mathcal{N}(\mu + \beta x_i, \sigma^2)$$

Simuler des données

- **Initialisation** :

  On utilise un générateur de nombres pseudo-aléatoires qui peut être initialisé avec une graine (seed), ce qui est très utile pour la reproductibilité des analyses

```
set.seed(1866) # année de parution de l'article de Mendel fondant la génétique
```

- **Nombre d'individus** :

```
n <- 200
```

- **Moyenne générale** :

```
mu <- 50
```

- **Génotypes** (on suppose que la population est à l'équilibre d'Hardy-Weinberg) :

```r
##' Genotype frequencies
##'
##' Calculate the genotype frequencies at a locus assuming the Hardy-Weinberg equilibrium
##' (https://en.wikipedia.org/wiki/Hardy%E2%80%93Weinberg_principle).
##' @param maf frequency of the minor allele, a
##' @return vector of genotype frequencies
##' @author Timothee Flutre
calcGenoFreq <- function(maf){
  stopifnot(is.numeric(maf), length(maf) == 1, maf >= 0, maf <= 0.5)
  geno.freq <- c((1 - maf)^2,
                 2 * (1 - maf) * maf,
                 maf^2)
  names(geno.freq) <- c("AA", "Aa", "aa")
  return(geno.freq)
}
f <- 0.3
genotypes <- sample(x=c(0,1,2), size=n, replace=TRUE, prob=calcGenoFreq(f))
```

```r
head(genotypes)
```

```
## [1] 2 0 1 0 1 1
```

```r
table(genotypes)
```

```
## genotypes
##   0   1   2
## 102  80  18
```

```r
sum(genotypes) / (2 * n) # estimate of the MAF
```

```
## [1] 0.29
```

```r
var(genotypes) # important for the estimate of beta
```

```
## [1] 0.426
```

- **Effet du génotype sur le phénotype, β :**

```
(beta <- rnorm(n=1, mean=2, sd=1))
```

```
## [1] 2.45
```

- **Erreurs, ϵ** (par simplicité, on fixe σ à 1) :

```
sigma <- 1
errors <- rnorm(n=n, mean=0, sd=sigma)
```

- Nous avons maintenant tout ce qu'il faut pour **simuler les phénotypes**, $\boldsymbol{y}$, via l'**équation** précédente : $y_i = \mu + \beta x_i + \epsilon_i$

```
phenotypes <- mu + beta * genotypes + errors
```

- Il est habituel dans R d'organiser les données dans un **tableau**

```
dat <- data.frame(x=genotypes, y=phenotypes)
head(dat)
```

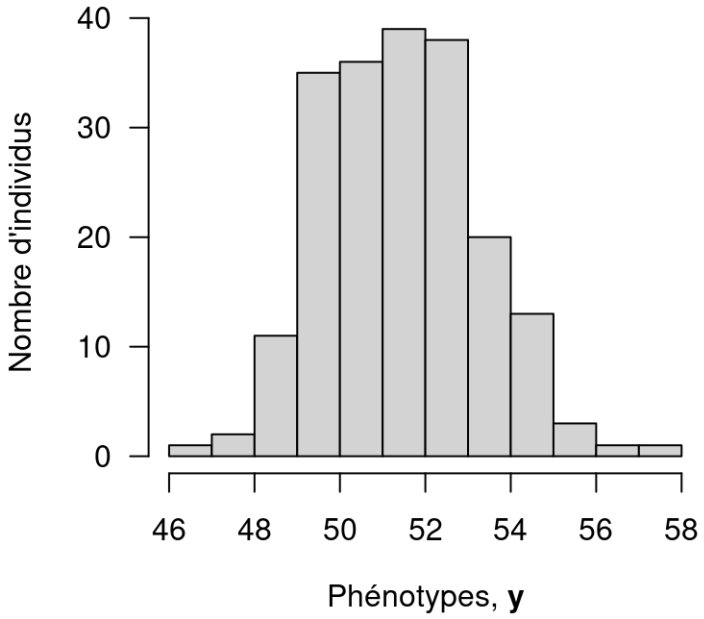
```
##   x    y
## 1 2 52.7
## 2 0 50.2
## 3 1 53.6
## 4 0 49.1
## 5 1 51.7
## 6 1 52.9
```

Réaliser l’inférence

Visualisation graphique

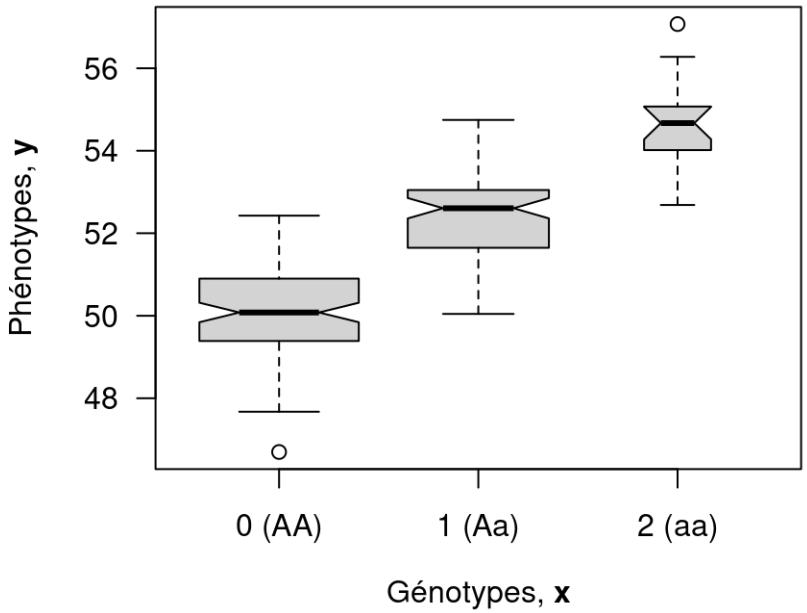
- **Distribution** du phénotype

```
par(mar = c(4, 4, 1, 1))
hist(phenotypes, las = 1, main = "",
     xlab = expression(paste("Phénotypes, ", bold(y))),
     ylab = "Nombre d'individus")
```



Relation génotypes - phénotypes

```
par(mar = c(4, 4, 1, 1))
boxplot(phenotypes ~ genotypes,
        xlab = expression(paste("Génotypes, ", bold(x))),
        ylab = expression(paste("Phénotypes, ", bold(y))),
        varwidth = TRUE, notch = TRUE, las = 1, xaxt = "n", at = 0:2)
axis(side = 1, at = 0:2, labels = c("0 (AA)", "1 (Aa)", "2 (aa)"))
```



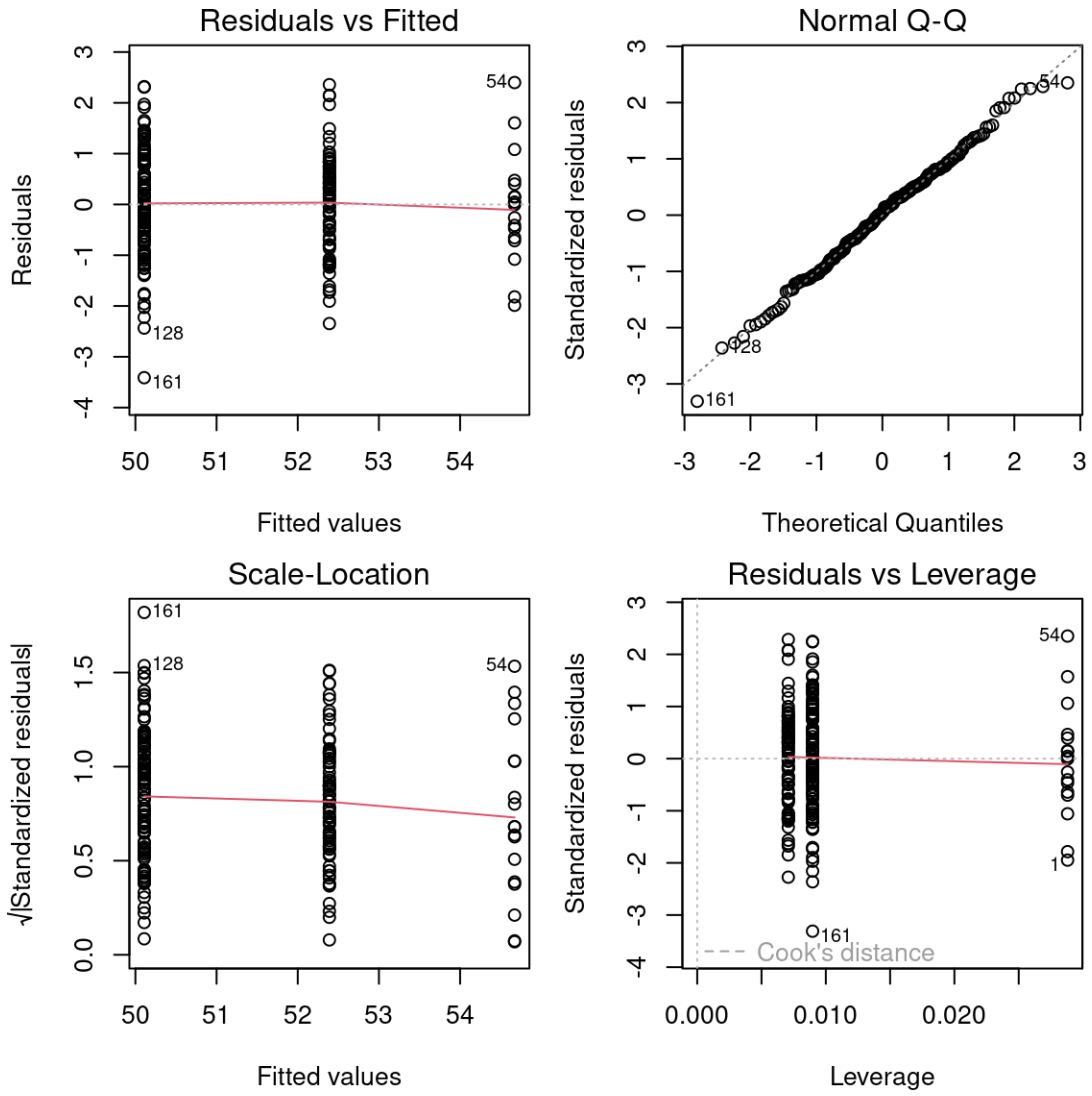
Implémentation (facile)

- Sous R, la fonction `lm` implémente l'estimation par maximum de vraisemblance

```
fit <- lm(y ~ x, data=dat)
```

- Vérification des hypothèses du modèle (homoscédasticité, normalité, indépendance)

```
par(mfrow=c(2, 2), mar = c(4, 4, 2, 1))
plot(fit)
```

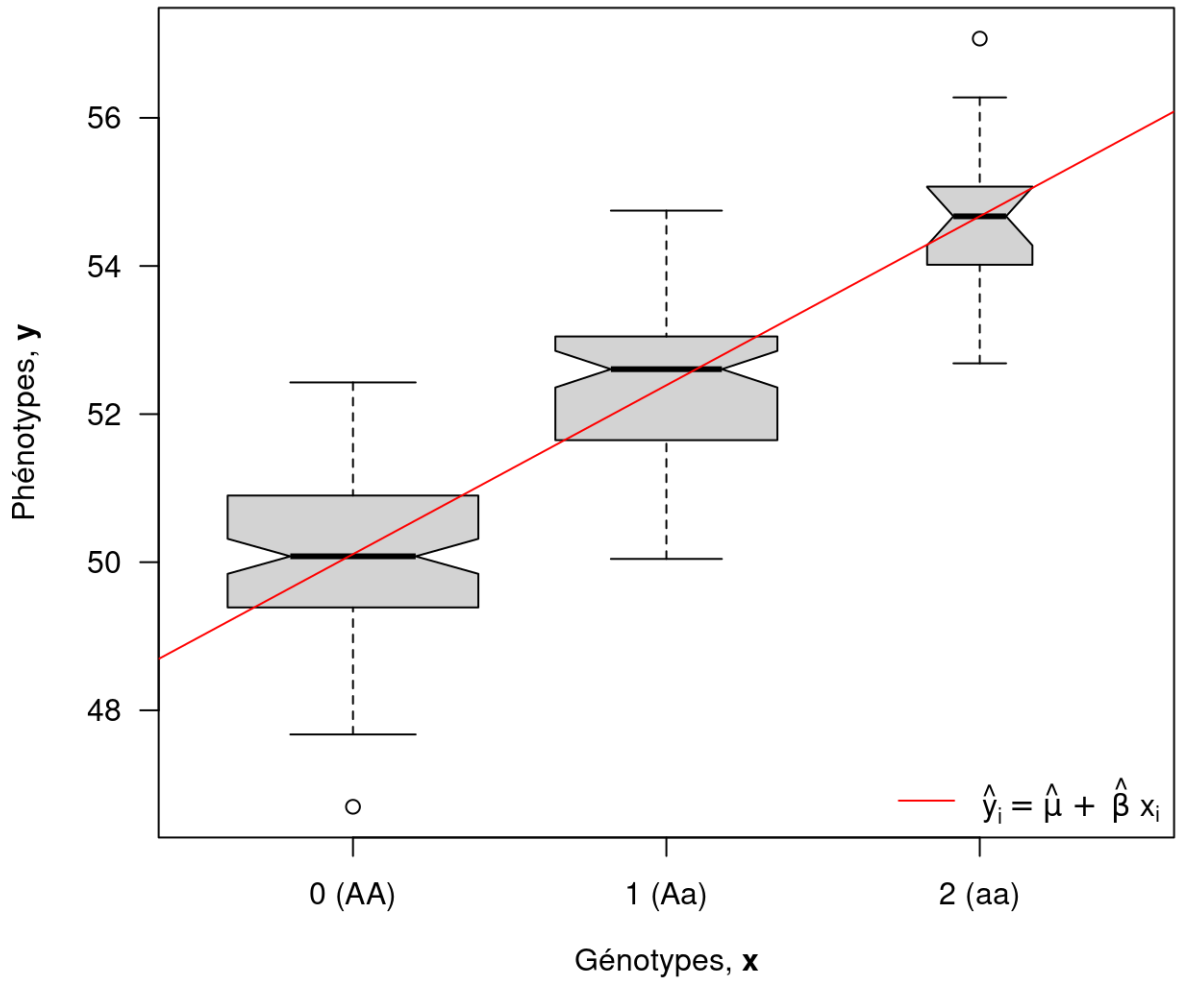

Residuals vs Fitted
Residuals
Fitted values
128
161
54
Normal Q-Q
Standardized residuals
Theoretical Quantiles
128
161
54
Scale-Location
√|Standardized residuals|
Fitted values
161
128
54
Residuals vs Leverage
Standardized residuals
Leverage
Cook's distance
54
161

```
summary(fit)
```

```
##
## Call:
## lm(formula = y ~ x, data = dat)
##
## Residuals:
##    Min     1Q Median     3Q    Max
## -3.411 -0.701  0.055  0.688  2.399
##
## Coefficients:
##             Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  50.1085     0.0981   511.0   <2e-16 ***
## x             2.2814     0.1125    20.3   <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.04 on 198 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.675,  Adjusted R-squared:  0.673
## F-statistic:  411 on 1 and 198 DF,  p-value: <2e-16
```

- Représentation graphique du modèle

```
par(mar = c(4, 4, 1, 1))
boxplot(phenotypes ~ genotypes,
        xlab=expression(paste("Génotypes, ", bold(x))),
        ylab=expression(paste("Phénotypes, ", bold(y))),
        varwidth=TRUE, notch=TRUE, las=1, xaxt="n", at=0:2)
axis(side=1, at=0:2, labels=c("0 (AA)", "1 (Aa)", "2 (aa)"))
abline(a=coefficients(fit)[1], b=coefficients(fit)[2], col="red")
legend("bottomright",
       legend=expression(hat(y)[i]==hat(mu)~+~hat(beta)~x[i]),
       col="red", lty=1, bty="n")
```


56
54
52
50
48
Phénotypes, y
0 (AA)
1 (Aa)
2 (aa)
Génotypes, x
$\hat{y}_i = \hat{\mu} + \hat{\beta}\, x_i$

Implémentation (plus difficile)

- Il faut d'abord écrire une fonction calculant l'opposé de la log-vraisemblance

```
negLogLik <- function(mu, beta, sigma){
  - sum(dnorm(x=dat$y, mean=mu + beta * dat$x, sd=sigma, log=TRUE))
}
```

- Puis demander à la fonction `mle` de la maximiser (en spécifiant que le paramètre σ ne peut pas être négatif ou nul)

```
fit2 <- mle(negLogLik, start=list(mu=mean(dat$y), beta=0, sigma=1),
            method="L-BFGS-B", nobs=nrow(dat),
            lower=c(-Inf,-Inf,10^(-6)),
            upper=c(+Inf,+Inf,+Inf))
```

```
summary(fit2)
```

```
## Maximum likelihood estimation
##
## Call:
## mle(minuslogl = negLogLik, start = list(mu = mean(dat$y), beta = 0,
##     sigma = 1), method = "L-BFGS-B", nobs = nrow(dat), lower = c(-Inf,
##     -Inf, 10^(-6)), upper = c(+Inf, +Inf, +Inf))
##
## Coefficients:
##       Estimate Std. Error
## mu       50.11     0.0976
## beta      2.28     0.1119
## sigma     1.03     0.0515
##
## -2 log L: 579
```

Evaluer les résultats

Sélection de modèles

- Evaluation de l'ajustement du modèle aux données
- Dans notre cas de régression linéaire simple, on peut utiliser le coefficient de détermination R^2

```
summary(fit)$r.squared
```

```
## [1] 0.675
```

- On peut facilement vérifier que cette valeur renvoyée par la fonction `lm` correspond à la formule :

$$R^2 = \frac{\hat{\beta}^2 \; Var(\boldsymbol{x})}{\hat{\beta}^2 \; Var(\boldsymbol{x}) + \hat{\sigma}^2},$$

```
(coefficients(fit)[2]^2 * var(dat$x)) /
  (coefficients(fit)[2]^2 * var(dat$x) + summary(fit)$sigma^2)
```

```
##     x
## 0.674
```

Estimation des paramètres

- Prenons l'exemple de β, comme nous avons simulé les données, nous connaissons sa vraie valeur

```
beta
```

```
## [1] 2.45
```

- Après avoir ajusté le modèle avec la fonction `lm`, nous pouvons récupérer l'estimation de ce paramètre ($\hat{\beta}$)

```
(beta.hat <- coefficients(fit)[2])
```

```
##    x
## 2.28
```

- Pour comparer les deux, on définit une **fonction de perte** (*loss function*) reliant le **paramètre** (β) à **son estimation** ($\hat{\beta}$)
- On utilise une fonction quadratique, dont on prend l'espérance, ce qui donne l'**erreur quadratique moyenne** (*mean squared error*)

$$MSE = E\left((\hat{\beta} - \beta)^2\right)$$

- On calcule sa racine carrée pour que le résultat soit dans la même unité que le paramètre

```
(rmse.beta <- sqrt((beta.hat - beta)^2))
```

```
##     x
## 0.172
```

Prédiction de données

- On peut aussi calculer l'**erreur quadratique moyenne** avec les **phénotypes** déjà **observés** (on parle de *in-sample predictions*)

```
y <- phenotypes
y.hat <- (coefficients(fit)[1] + coefficients(fit)[2] * genotypes)
errors <- y - y.hat
(rmse.y <- sqrt(mean(errors^2)))
```

```
## [1] 1.03
```

- On peut aussi utiliser la fonction `predict`

```
errors <- phenotypes - predict(fit)
(rmse.y <- sqrt(mean(errors^2)))
```

```
## [1] 1.03
```

- Le vecteur *errors* correspond aux **résidus** du modèle

```
head(errors)
```

```
##       1       2       3       4       5       6
## -1.9859  0.0643  1.2021 -0.9601 -0.6865  0.5462
```

```
head(resid(fit))
```

```
##       1       2       3       4       5       6
## -1.9859  0.0643  1.2021 -0.9601 -0.6865  0.5462
```

```
(rmse.y <- sqrt(mean(resid(fit)^2)))
```

```
## [1] 1.03
```

- De façon plus intéressante, on souhaiterait évaluer les **prédictions** phénotypiques sur n_{new} **nouveaux individus**
- Pour cela, on commence par simuler de nouvelles données, $\mathcal{D}_{\text{new}} = \{(y_{i,\text{new}} \mid x_{i,\text{new}})\}$, toujours avec les *mêmes* "vraies" valeurs des paramètres, $\Theta = \{\mu, \beta, \sigma\}$

```
set.seed(1944) # année de découverte de l'ADN comme support des gènes
n.new <- 100
x.new <- sample(x=c(0,1,2), size=n.new, replace=TRUE, prob=calcGenoFreq(f))
y.new <- mu + beta * x.new + rnorm(n=n.new, mean=0, sd=sigma)
```

- Puis on utilise les **estimations** des paramètres obtenues précédemment pour **prédire** les **nouveaux phénotypes** à partir des **nouveaux génotypes**, $\tilde{\mathcal{D}}_{\text{new}} = \{(\tilde{y}_{i,\text{new}} = \hat{\mu} + \hat{\beta}\, x_{i,\text{new}})\}$ (*out-of-sample predictions*)

```
y.new.tilde <- (coefficients(fit)[1] + coefficients(fit)[2] * x.new)
```

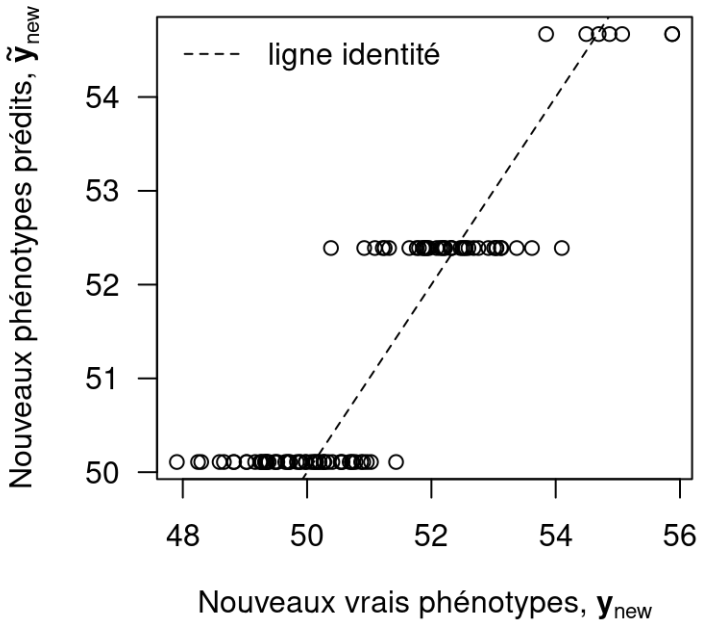
- Enfin, on calcule l'**erreur quadratique moyenne** de prédiction

```
errors.tilde <- y.new - y.new.tilde
(rmspe <- sqrt(mean(errors.tilde^2)))
```

```
## [1] 0.8
```

Graphiquement :

```
par(mar = c(4, 4.5, 1, 1))
plot(x=y.new, y=y.new.tilde, las=1,
     xlab=expression(paste("Nouveaux vrais phénotypes, ", bold(y)[new])),
     ylab=expression(paste("Nouveaux phénotypes prédits, ", bold(tilde(y))[new])))
abline(a=0, b=1, lty=2)
legend("topleft", legend="ligne identité", lty=2, bty="n")
```



Perspectives

Explorer les simulations possibles

- La simulation est un outil particulièrement utile pour explorer **comment un modèle répond** à des **changements** dans les **données** et les **paramètres**
- On pourrait par exemple avoir envie de savoir ce qui se passe si la taille de l'échantillon (n) varie
- Idem, que se passe-t-il si, à n et σ fixés, on modifie β ?

Annexe

```
print(sessionInfo(), locale=FALSE)
```

```
## R version 4.2.1 (2022-06-23)
## Platform: x86_64-pc-linux-gnu (64-bit)
## Running under: Ubuntu 22.04.1 LTS
##
## Matrix products: default
## BLAS:   /usr/lib/x86_64-linux-gnu/blas/libblas.so.3.10.0
## LAPACK: /usr/lib/x86_64-linux-gnu/lapack/liblapack.so.3.10.0
##
## attached base packages:
## [1] stats4    stats     graphics  grDevices utils     datasets  methods
## [8] base
##
## other attached packages:
## [1] MASS_7.3-58
##
## loaded via a namespace (and not attached):
##  [1] digest_0.6.31   R6_2.5.1        jsonlite_1.8.4  evaluate_0.20
##  [5] highr_0.10      cachem_1.0.6    rlang_1.0.6     cli_3.6.0
##  [9] rstudioapi_0.14 jquerylib_0.1.4 bslib_0.4.2     rmarkdown_2.20
## [13] tools_4.2.1     xfun_0.37       yaml_2.3.7      fastmap_1.1.0
## [17] compiler_4.2.1  htmltools_0.5.4 knitr_1.42      sass_0.4.5
```