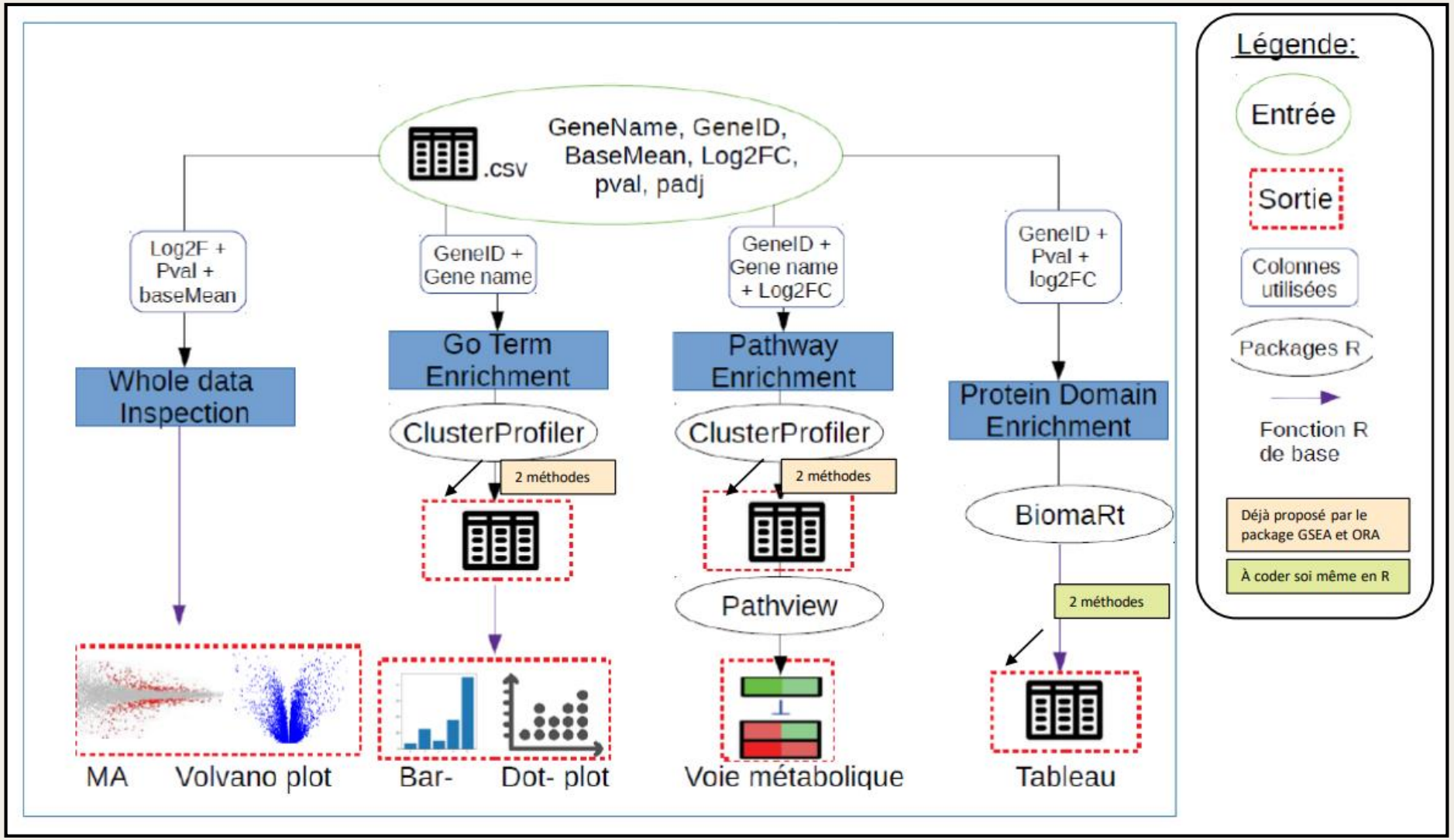
Projet d'Enrichissement Fonctionnel avec R Shiny

Solène PETY – Meije MATHE – Bryce LETERRIER - Louis OLLIVIER
Equipe EnF'R

UE 5 - Bioinformatique en sciences omiques 3
Master 2.1 mention Bioinformatique
Parcours BIMS
2021-2023

Université de Rouen-Normandie


.csv
GeneName, GeneID, BaseMean, Log2FC, pval, padj
Log2F + Pval + baseMean
GeneID + Gene name
GeneID + Gene name + Log2FC
GeneID + Pval + log2FC
Whole data Inspection
Go Term Enrichment
Pathway Enrichment
Protein Domain Enrichment
ClusterProfiler
ClusterProfiler
2 méthodes
2 méthodes
BiomaRt
Pathview
2 méthodes
MA
Volvano plot
Bar-
Dot- plot
Voie métabolique
Tableau
Légende:
Entrée
Sortie
Colonnes utilisées
Packages R
Fonction R de base
Déjà proposé par le package GSEA et ORA
À coder soi même en R

INTPUT

Matrice de comptage
(RNA-seq DEG)

→

Application Shiny

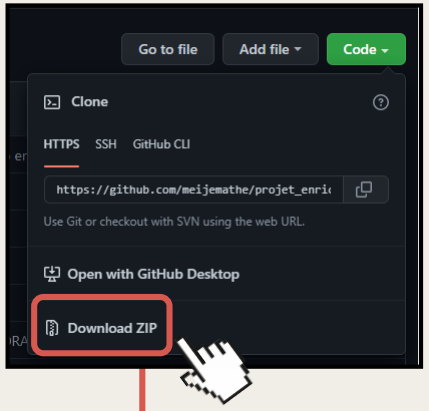
ui.R
server.R

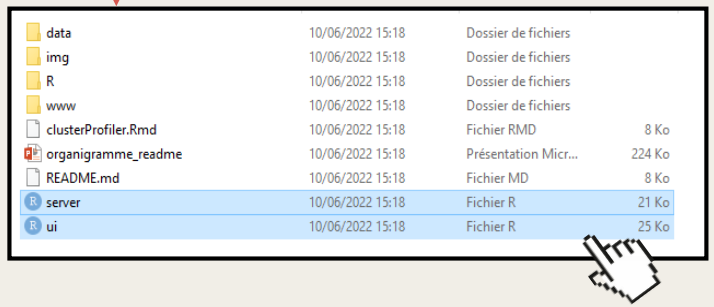
→

OUTPUT

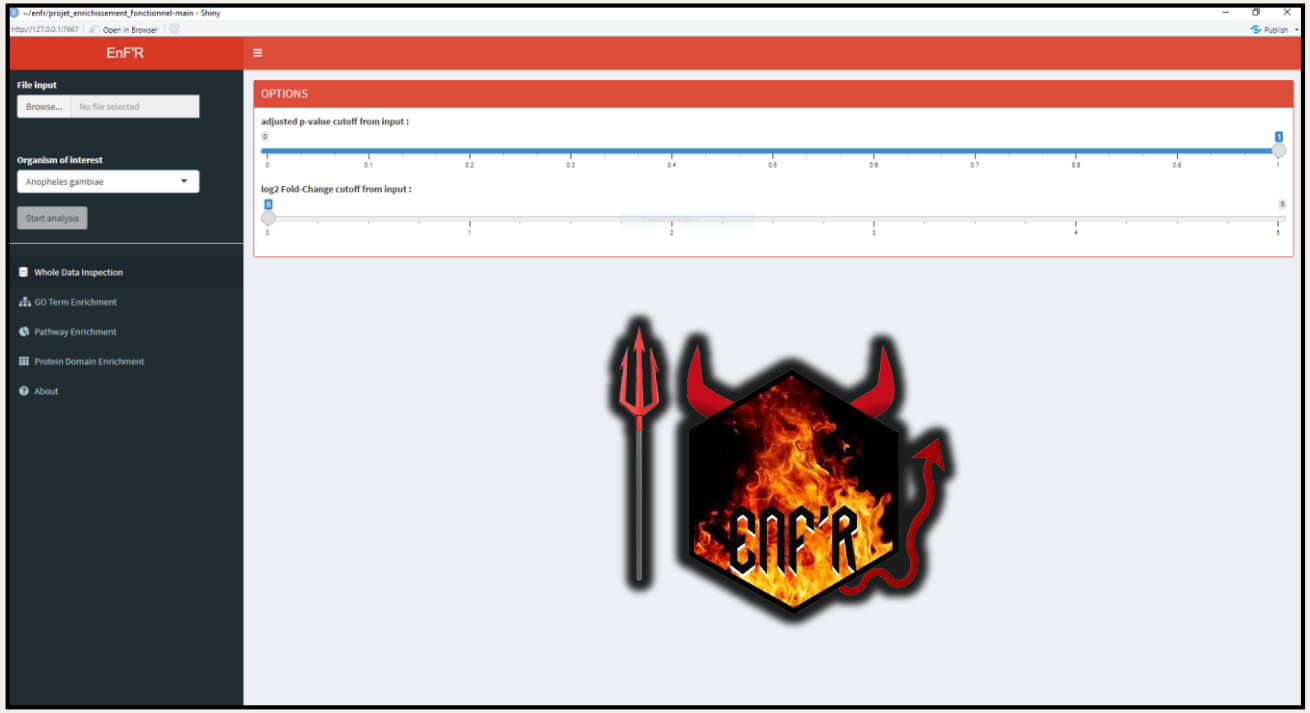
Résultats des différentes
analyses d'enrichissement

https://github.com/meijemathe/projet_enrichissement_fonctionnel.git





data	10/06/2022 15:18	Dossier de fichiers	
img	10/06/2022 15:18	Dossier de fichiers	
R	10/06/2022 15:18	Dossier de fichiers	
www	10/06/2022 15:18	Dossier de fichiers	
clusterProfiler.Rmd	10/06/2022 15:18	Fichier RMD	8 Ko
organigramme_readme	10/06/2022 15:18	Présentation Micr...	224 Ko
README.md	10/06/2022 15:18	Fichier MD	8 Ko
server	10/06/2022 15:18	Fichier R	21 Ko
ui	10/06/2022 15:18	Fichier R	25 Ko



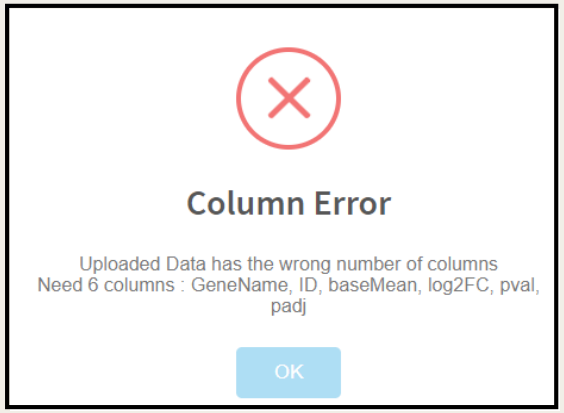
Lancement de la démonstration

```r
observeEvent(input$file, {
        req(input$file)
        #test extension
        ext <- tools::file_ext(input$file$datapath)
        validate(need(ext == "csv", "Please upload a csv file"))
        # Vector with good columns names
        good <-c("GeneName", "ID", "baseMean", "log2FC", "pval", "padj")
        # Get data from the uploaded file
        df <- read.csv(input$file$datapath, sep = ";")
        #Check data format, colnames and GeneID
        if(ncol(df)!=6)
        {
                shinyalert("Column Error","Uploaded Data has the wrong number of columns\n Need 6 columns : GeneName, ID,
                        baseMean, log2FC, pval, padj",
                type="error")
                returnValue()
        }
        else if(identical(tolower(good),tolower(colnames(df)))==FALSE)
        {
                shinyalert("Column names Error",paste0("Wrong format for column ",which(colnames(df) != good),", it must be : ",
                                        good[which(colnames(df) != good)],"\n",collapse=""),type = "error")
                returnValue()
        }
        else {
                enable("start")
        }
})
```

Vérification du format du fichier

→ Noms des colonnes

→ csv



Vérification du format des données

→ EnsemblID uniquement


```r
observeEvent(input$start, {
        req(input$file)
        # Get data from the uploaded file
        data_prev <- reactive({
                req(input$file)
                df <- read.csv(input$file$datapath, sep = ";")
                df["log2padj"] <- -log2(df["padj"])

                if(startswith(df$ID[1], "ENS")){
                        df
                }
                else{
                        shinyalert("Wrong ID format !","Need Ensembl ID", type="error")
                        return(NULL)
                }
        })
```

```r
gsego <- reactive({
        req(gene_list(), organism(), input$go_ontology, input$go_pvalue)
        return(get_gsego(gene_list(), organism(), input$go_ontology, input$go_pvalue))
})
```

```r
output$table_go_gsea <- DT::renderDataTable({
  req(gsego())
  df <- as.data.frame(gsego())
  df <-df[ , -which(names(df) %in% c("core_enrichment"))]
  Links <- paste0('<a href="https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=',df$ID,'">GO link</a>')
  df <- df %>% add_column(Links, .after ="ID")
  return(df)
},
```

```r
get_gsego <- function(gene_list, organism, process, pvalue){
  gsego <- gseGO(geneList=gene_list,
                 ont =process,
                 keyType = "ENSEMBL",
                 nPerm = 10000,
                 minGSSize = 3,
                 maxGSSize = 800,
                 pvalueCutoff = pvalue,
                 verbose = TRUE,
                 OrgDb = organism,
                 pAdjustMethod = "BH")
  return(gsego)
}
```

Liens cliquables pour GO

→ Utilisation d'une fonction codée à la main pour récupérer le tableau

→ Appel de cette fonction pour générer le tableau de résultat

→ Utilisation de ce tableau pour tous les plots ORA

ID	Links	Description
mmu05168	KEGG link	Herpes simplex virus 1 infection
mmu04140	KEGG link	Autophagy - animal
mmu05165	KEGG link	Human papillomavirus infection
mmu04150	KEGG link	mTOR signaling pathway

```r
domains_ORA_results <- reactive({
        req(data_domain(), organism())
        return(get_table_ORA_domains(data_domain(), organism(), input$domain_pvalue))
})
```

```r
get_table_ORA_domains <- function(data, organism, pvalue_lim){

  # Name vector with ENTREZ ids
  names(domain_gene_list) <- data3$Y

  # Omit any NA values
  domain_gene_list<-na.omit(domain_gene_list)

  # Sort the list in decreasing order (required for clusterProfiler)
  domain_gene_list = sort(domain_gene_list, decreasing = TRUE)

  # DOMAINS ANNOTATION FOR INTEREST LIST
  dataset = org_to_ensembldb(organism)
  ensembl = useMart(biomart = "ensembl", dataset = dataset)

  refseqids = names(domain_gene_list)
  domains = getBM(attributes = c("entrezgene_id", "refseq_mrna", "interpro", "interpro_description"),
                  filters = "refseq_mrna",
                  values = refseqids,
                  mart = ensembl)

  # REFERENCE GENE LIST
  gene_ref <- keys(org.Mm.eg.db, "ENTREZID")

  # DOMAINS ANNOTATION FOR REFERENCE LIST
  domain_ref_id <- keys(org.Mm.eg.db, "REFSEQ")
  domain_ref = getBM(attributes = c("entrezgene_id", "refseq_mrna", "interpro", "interpro_description"),
                     filters = "refseq_mrna",
                     values = domain_ref_id,
                     mart = ensembl)
  gene_ref <- keys(get(organism), "ENTREZID")

  # DATATABLE : Interpro ID, m, X, BgRatio, GeneRatio, pvalue, adjusted pvalue
  table <- data.frame(interproID = unique(domain_ref$interpro), domain = unique(domain_ref$interpro_description))
  k = length(gene_list) #total nb of genes in the interest list
  n = length(gene_ref) #total nb of genes in the reference list
  table$m <- table(domain_ref$interpro)[table$interpro] # nb of annotated genes in the reference list
  table$X <- table(domains$interpro)[table$interpro] # nb of annotated genes in the interest list
  table <- na.omit(table) # remove genes that are in the reference list but not in the interest one
  table$BgRatio <- signif(100*table$m/(table$m+n), 3) # compute background ratio for each domain
  table$GeneRatio <- signif(100*table$X/k, 3) # compute gene ratio for each domain
  table$pvalue <- signif(phyper(table$X-1, table$m, n, k, lower.tail = FALSE), digits = 6) # compute p-value for each domain
  table$padjust = signif(p.adjust(table$pvalue, method = "hochberg"), digits = 6) # compute adjusted p-value for each domain

  # FINAL RESULTS
  res <- table[c("interproID","pvalue","padjust","BgRatio","GeneRatio","X","domain")]
  res.signif <- res[res$padjust <= pvalue_lim ,]
  res.signif <- res.signif[order(res.signif$padjust),]

  return(res.signif)
}
```

Analyse ORA

→ Utilisation d'une fonction codée à la main pour récupérer le tableau

→ Appel de cette fonction pour tous les plots ORA

```r
box2 <- function(...){
        box(
                status = "danger",
                solidHeader = TRUE,
                width = 12,
                ...
        )
}
```

```r
box2(
        title = "Gene ontology settings",
        selectInput("go_ontology",
                    label = NULL,
                    choices = c("Biological process" = "BP", "Molecular function" = "MF",
                                "Cellular component" = "CC", "All" = "ALL")
                    )
    )
```

Création simplifiée de box

```r
download <- function(title,plotname){
        downloadHandler(
                filename = function() { title },
                content = function(file) {
                        ggsave(file, plot = plotname, device = "png")
                        }
                )
}
```

```r
output$download_go_barplot <- download(
        paste('barplotORA.png', sep=''),
        GO_ORA_barplot_input()
        )
output$download_go_dotplot <- download(
        paste('dotplotORA.png', sep=''),
        GO_ORA_goplot_input()
)
```

Création simplifiée de boutons de téléchargement

```r
renderPlotly2 <- function (expr, env = parent.frame(), quoted = FALSE){
        if (!quoted) {
                expr <- substitute(expr)
        }
        shinyRenderWidget(expr, plotlyOutput, env, quoted = TRUE)
}
```

```r
output$MA <- renderPlotly2({
        req(MAPlot)
        p <- MAPlot()
        as_widget(p) %>%
          onRender(addHoverBehavior) %>%
          config(modeBarButtons = list(list("zoomIn2d"), list("zoomOut2d"), list("select2d"), list("resetScale2d"), list("toImage")))

})
```

Création simplifiée de plots

Difficultés		Contournements
Conflits merge avec GitHub	→	Bonne organisation + merge à la main
Nouvelle version de R sur la fin (avril 2022)	→	Garder l'ancienne version pour l'application
Problème avec la sélection des organismes	→	Se limiter aux organismes annotés seulement

Points positifs et négatifs

- Travail en équipe qui permet de développer ses compétences en apprenant les uns des autres
- Confronter les différentes idées du groupes et trouver la méthode la plus optimale pour chaque partie du projet
- Assez de crénaux de travail perso pour pouvoir travailler ensemble

- Beaucoup (beaucoup) d'erreurs à gérer car multiples packages
- Dépendant de la surcharge des serveurs, de la connexion internet
- Manque de cours sur Shiny
- Pas de cahier des charges suffisamment précis

- Passer de GitHub à GitLab pour améliorer le travail collaboratif
- Déployer l'application sur un serveur web pour faciliter l'utilisation aux biologistes
- Accepter d'autres ID que EnsemblID (ENTREZID, …)
- Améliorer les performances, la gestion des erreurs, la robustesse des analyses
- Intégrer d'autres analyses en fonction des besoins
- Trouver de meilleurs jeux de données

Merci de votre attention !

Présentation de l'application