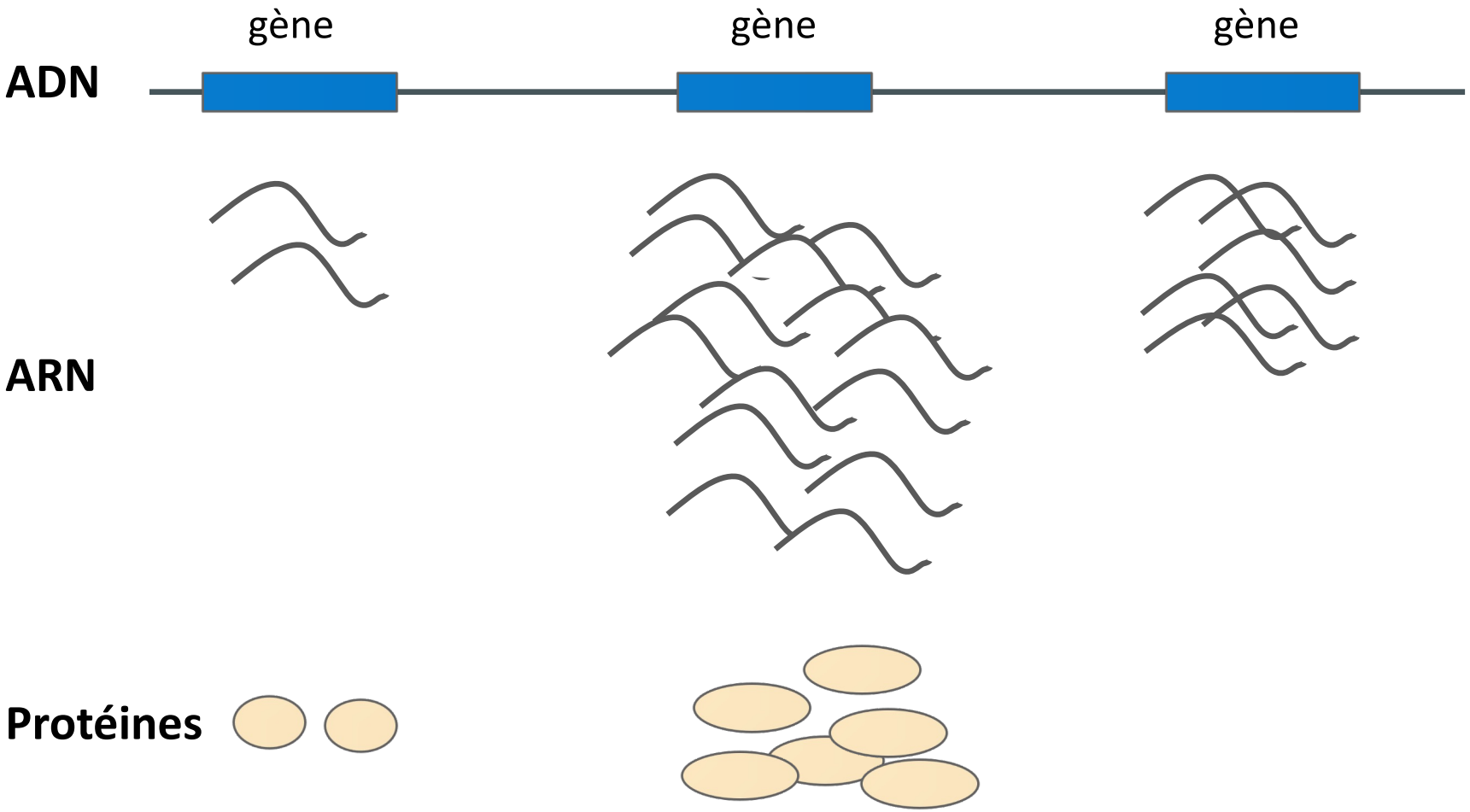
Quantification de l'expression des gènes et analyse de l'expression différentielle avec RNA-seq

Adil El Filali et Anamaria Necsulea

20/09/2023

UNIVERSITÉ DE LYON
Lyon 1
cnrs
LBBE
BIOMETRIE ET BIOLOGIE EVOLUTIVE

Comment mesurer le niveau d'expression des gènes ?



Comment mesurer le niveau d'expression des gènes ?

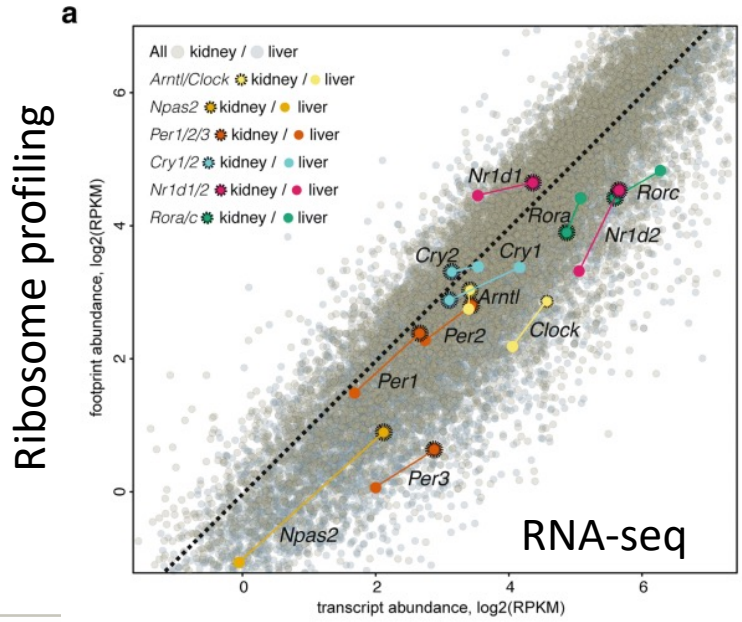
- L'activité du gène peut être mesurée à plusieurs niveaux : taux de transcription, quantité d'ARN produit (à l'état stable), quantité de protéines produites.

- Plusieurs niveaux de régulation de l'activité des gènes : régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle.

- Une définition usuelle du niveau d'expression du gène : **nombre de molécules d'ARNm produites par le gène**, par cellule, tous isoformes confondus.

Que peut-on mesurer avec la méthode RNA-seq ?

- RNA-seq classique : on ne mesure pas **le taux de transcription** !
- On a accès à la **quantité d'ARNs à l'état stable** = transcription + (modification post-transcriptionnelle) + dégradation.
- Approximation de l'abondance des protéines ?



Castelo-Szekely *et al.,* 2017

On mesure des niveaux d'expression **relatifs**

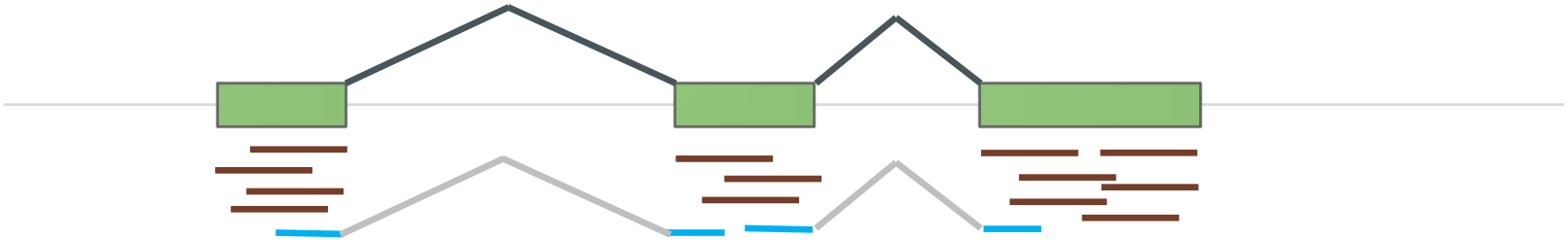
- Les niveaux d'expression obtenus avec des données de RNA-seq « classiques » sont toujours **relatifs** aux autres gènes exprimés dans l'échantillon analysé.

- On n'a pas directement accès aux nombres de molécules d'ARN.

- Comment faire pour s'approcher le plus possible des niveaux d'expression absolus ?
  - utilisation de « spike-in » RNAs : molécules en quantité contrôlée, rajoutées au pool d'ARN lors de la construction de la librairie
  - utilisation de « gènes de ménage » comme contrôle

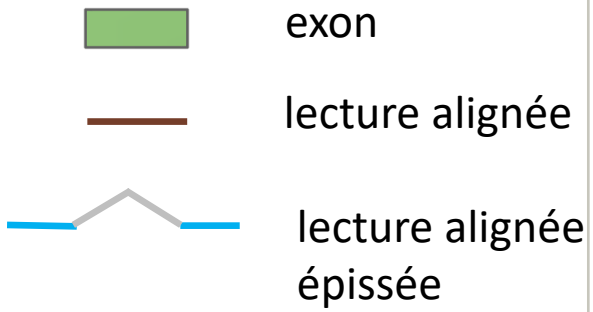
- Ces méthodes restent très approximatives !

Estimation du niveau d'expression des gènes avec RNA-seq

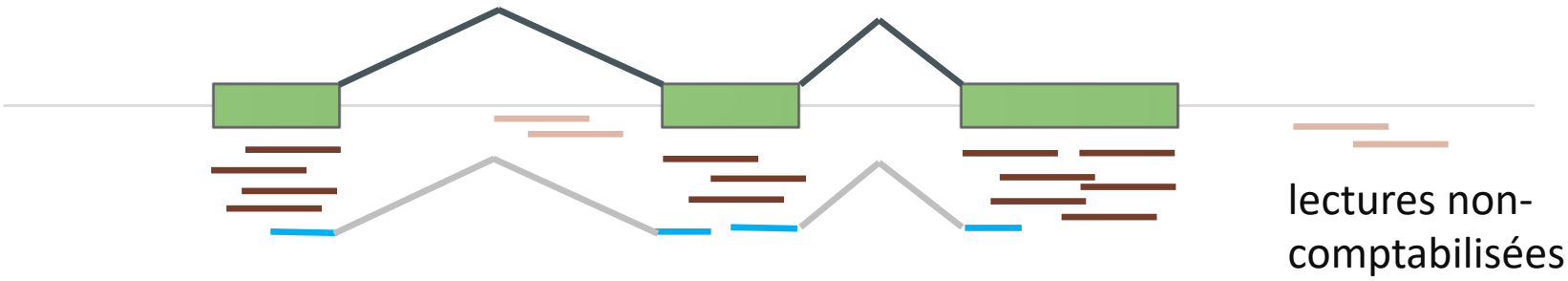


RNA-seq avec génome et annotation de référence :

- Alignement des lectures sur le génome avec un logiciel dédié (HISAT2, STAR, TopHat – identification de lectures alignées épissées)
- Comptage du **nombre de lectures** attribuées à chaque gène et/ou chaque isoforme (Rsubread, HTSeq, Cufflinks, Kallisto…)



Comment attribuer les lectures de RNA-seq aux gènes ?

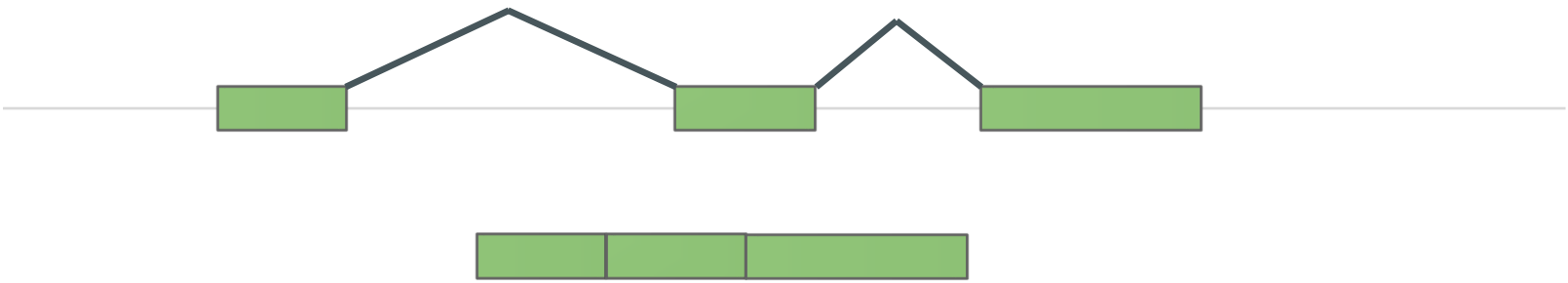


- Analyse du chevauchement des alignements des lectures de RNA-seq et des coordonnées des **exons** des gènes

- Problèmes :
  - alignements ambigus (ou multiples)
  - chevauchement des gènes
- Solutions :
  - comptage des lectures alignées de manière non-ambiguë (unique)
  - attribution des lectures ambiguës proportionnellement aux nombres de lectures uniques

Prise en compte de la longueur exonique des gènes

- Le protocole de RNA-seq comporte une étape de fragmentation ; on séquence des fragments d'ARN.
- Les molécules longues d'ARN vont être plus représentées dans la librairie de séquençage que les molécules courtes.
- Normalisation par la longueur **exonique** totale.

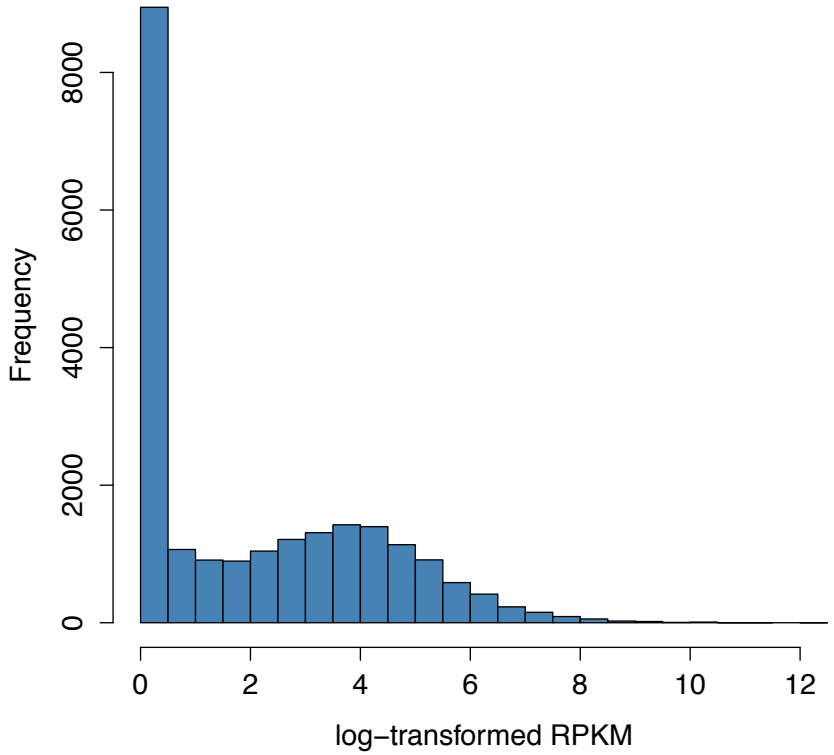


Prise en compte de la profondeur de séquençage

- Le nombre de lectures varie d'un échantillon à un autre.
- Normalisation par le nombre total de lectures (après filtrage pour éliminer les lectures de mauvaise qualité, si besoin) ou par le nombre total de lectures alignées.

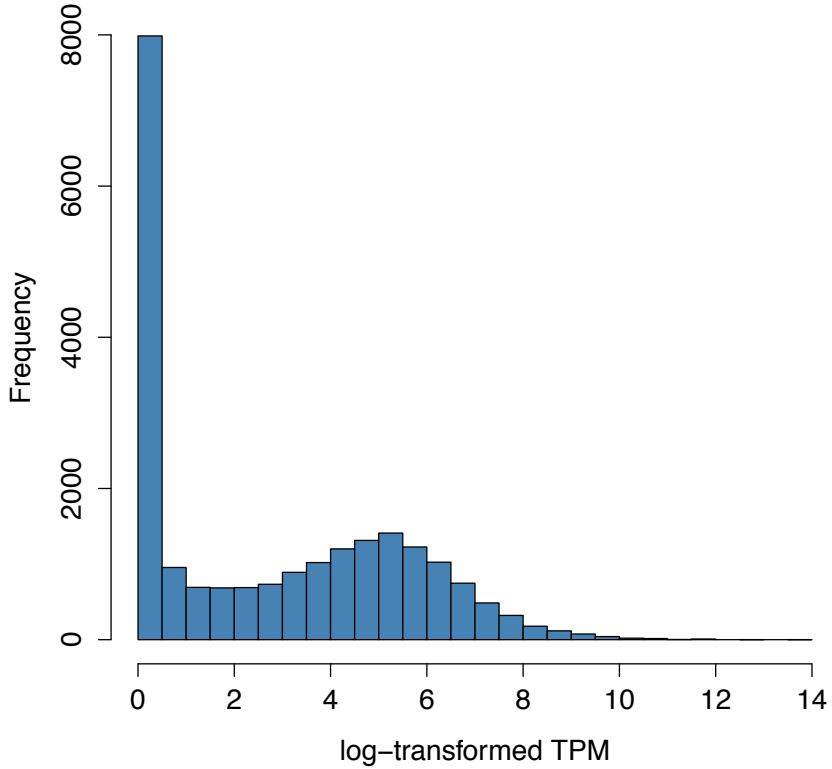
Estimations du niveau d'expression : RPKM (FPKM)

- Première mesure du niveau d'expression : RPKM
- RPKM = **R**eads per **K**ilobase of exonic sequence per **M**illion mapped reads
- On normalise par la longueur exonique et par la profondeur de séquençage.
- Pour les représentations graphiques : transformations logarithmiques



Estimations du niveau d'expression : TPM

- TPM = **T**ranscripts per **M**illion **T**ranscripts
- Moyen de calcul simple :
  - RPK = Reads per Kb of Exon
  - TPM= RPK/(somme RPK)/10^6
- On ne normalise pas directement par la profondeur de séquençage
- La somme de tous les TPM d'un échantillon est constante (10^6)



RPKM ou TPM : quelle mesure choisir ?

- Niveaux d'expression relatifs : la moyenne (ou la somme) doit être la même pour tous les échantillons.

Species	Tissue/cell type	Replicate	AvTPM	AvRPKM
Human	Differentiated decidual cells	1	46.518	15.94
		2	46.518	16.13
Human	Un-differentiated dec. cells	1	46.518	15.27
		2	46.518	15.22
Human	Myofibroblast cells	1	46.518	17.66
		2	46.518	17.65
Human	Chondrocyte cells	1	46.518	16.57
		2	46.518	16.57
Human	Myometrial cells	1	46.518	17.77
		2	46.518	17.79
Chicken	Forelimb digit 1 stage 28–29	–	65.527	28.35
Chicken	Forelimb digit 1 stage 31	–	65.527	28.56

- Le TPM satisfait cette condition, pas le RPKM

Wagner & Lynch, Theory Biosci, 2012

Seuil pour détection des gènes exprimés

- Présence de bruit transcriptionnel : comment dire si un gène est réellement exprimé ?

- Seuil proposé :
  - RPKM > 1
  - TPM > 1

Wagner et al, Theory Biosci, 2013

Logiciels pour la quantification de l'expression des gènes

- HTSeq (Anders et al., Bioinformatics, 2015)
  - calcule le nombre de lectures attribuées à chaque gène
  - essentiellement restreint aux lectures alignées de manière unique
- RSEM (Li & Dewey, BMC Bioinformatics, 2011)
  - peut utiliser un génome de référence ou un transcriptome de référence
  - comptages des lectures et valeurs TPM
- Rsubread (Liao et al., Nucleic Acids Res., 2019)
  - bibliothèque R
  - calcul très rapide pour l'alignement et la quantification

Logiciels pour la quantification de l'expression des gènes

- Cufflinks (Trapnell et al., Nat Biotechnol, 2010) :
  - calcule les valeurs RPKM/FPKM par gène et isoforme, et leurs intervalles de confiances
  - correction pour alignement multiple des lectures
  - correction pour biais de séquençage/fragmentation dans RNA-seq
  - expression différentielle avec cuffdiff
  - assemblage de transcrits/gènes avec génome de référence

- Kallisto (Bray et al, Nat Biotechnol, 2016)
  - pseudo-alignement des lectures sur un transcriptome de référence
  - calcule les valeurs TPM des transcrits et des gènes
  - expression différentielle avec sleuth (en cours de développement)
  - très rapide !

Logiciels pour la quantification de l'expression des gènes

- Pour les procaryotes : Rockhopper (McLure et al., Nucleic Acids Res, 2013)
  - alignement sur le génome
  - quantification de l'expression des gènes
  - expression différentielle
  - structure en opérons
  - visualisation des résultats

Analyse de l'expression différentielle des gènes

- Expression différentielle : est-ce que le niveau d'expression d'un gène change significativement entre deux (ou plusieurs) conditions ?

- H0 = il n'y a pas de différence entre conditions
- H1 = il y a une différence significative entre conditions

- Pour construire le test, on utilise **les comptages bruts (nombre de lectures)** par gène, et non pas le RPKM ou TPM

Logiciels pour l'analyse de l'expression différentielle

- Librairies (packages R) :
  - DESeq et DESeq2 (Anders et al, Genome Biology, 2010, Love et al., Genome Biology 2014)
  - edgeR (Robinson et al., Bioinformatics, 2010)
  - limma (Ritchie et al., Nucleic Acids Res, 2015)

- Pour l'analyse de l'épissage différentiel : DEXSeq (Anders et al., Genome Biology, 2012)

- On part toujours des comptages bruts, pas des valeurs RPKM/FPKM/TPM

Comment dire si un gène est différentiellement exprimé ?

Données :

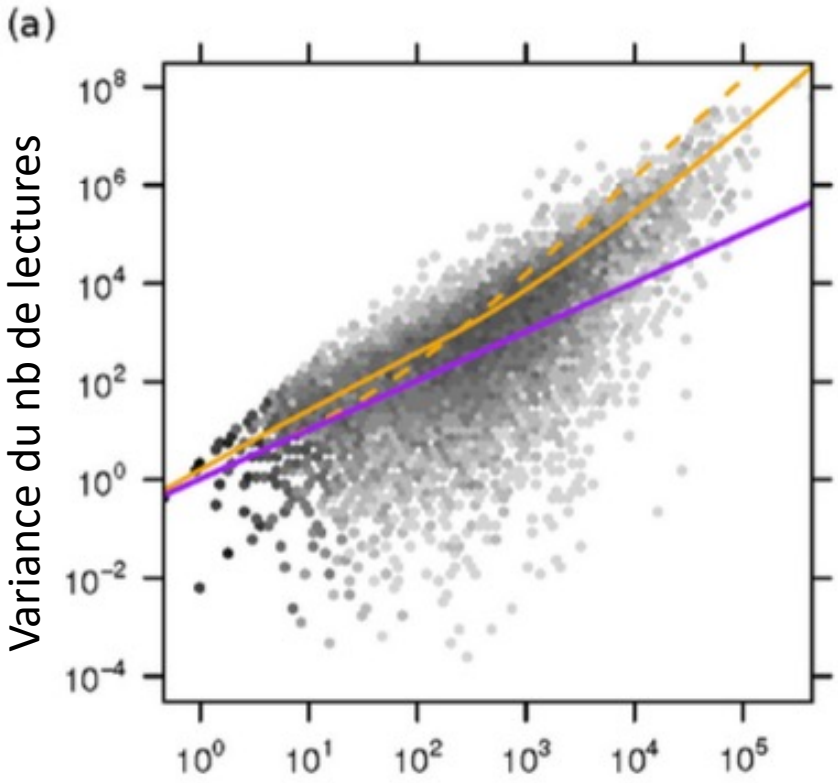
- Condition 1 : le gène est représenté par 100 lectures sur les 25,000,000 lectures alignées

- Condition 2 : le gène est représenté par 2500 lectures sur les 32,000,000 lectures alignées

Est-ce que les deux proportions sont différentes ?

Peut-on faire un simple test de Fisher ou Chi2 ?

Modélisation du nombre de lectures



Moyenne du nb de lectures, entre réplicats d'une même condition

Courbe violette : estimation faite en modélisant le nombre de lectures avec une loi de Poisson

- La loi de Poisson ne modélise pas suffisamment bien la variance : présence d'une sur-dispersion dans les données.

Anders & Huber, Genome Biol, 2010

Modélisation du nombre de lectures

- On modélise les comptages avec une loi binomiale négative :

$K_{ij} \sim \mathrm{NB}(\mu_{ij}, \alpha_i)$ K_{ij} = nb de lectures pour le gène i et l'échantillon j

$\mu_{ij} = s_j q_{ij}$ μ_{ij} = moyenne du nombre de lectures pour le gène i et l'échantillon j

α_i = paramètre de dispersion spécifique au gène i

- La variance du nombre de lectures dépend donc de ce paramètre de dispersion :

$$\mathrm{Var}(K_{ij}) = E[(K_{ij} - \mu_{ij})^2] = \mu_{ij} + \alpha_i \mu_{ij}^2$$

Anders & Huber, Genome Biol, 2010

Normalisation entre échantillons

$$K_{ij} \sim \mathrm{NB}(\mu_{ij}, \alpha_i)$$

$$\mu_{ij} = s_j q_{ij}$$

s_j= paramètre spécifique à l'échantillon j (size-factor)

S_j est estimé à partir de la médiane des nombres de lectures, sur tous les gènes dans l'échantillon j

S_j permet de normaliser pour la profondeur de séquençage

NB: il n'y a pas de normalisation pour la longueur exonique des gènes.

Analyse de l'expression différentielle avec DESeq2

1. Estimation des coefficients de taille (size-factors) S_j pour chaque échantillon
2. Estimation des paramètres de dispersion α_i pour chaque gène
3. Test statistique : test de Wald ou Likelihood Ratio Test (LRT)

- Pour estimer la variance (le paramètre α_i) il faut des réplicats biologiques. Plus on a de réplicats, mieux c'est !

Comment sélectionner les gènes différentiellement exprimés ?

Il y a deux paramètres importants :

- FDR (ou p-valeur ajustée) : proportion de faux positifs dans la liste de résultats.
- Log2 fold change : intensité du changement d'expression. Il représente le ratio (log2-transformé) du niveau d'expression des gènes entre deux conditions.

La correction pour tests multiples est absolument impérative !
On peut faire > 20,000 tests (un par gène) dans une seule analyse.

Comment interpreter les résultats ?

Analyse dans de l'expression différentielle dans une population de cellules (e.g., tissu disséqué *ex-vivo*, culture cellulaire, culture de micro-organismes) :

- On détecte des effets moyens au niveau de la population.
- Le gène peut changer d'expression dans toutes les cellules ou dans un sous-ensemble des cellules;
- La composition cellulaire de la population peut changer entre deux conditions (e.g., infiltration de cellules immunitaires etc.)

Quel est le mécanisme moléculaire ?

- Régulation transcriptionnelle
- Régulation post-transcriptionnelle (par ex., épissage alternatif)

Enrichissement en catégories fonctionnelles

Est-ce que les gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans un processus biologique particulier ?

Enrichissement en catégories fonctionnelles (annotation Gene Ontology, KEGG, etc.)

Principe :

- Chaque gène est associé avec 1 ou plusieurs catégories fonctionnelles.
- Pour chaque catégorie fonctionnelle, on teste si elle est plus fréquente parmi les gènes d'intérêt que parmi tous les gènes du génome (ou parmi une autre liste de référence)

Enrichissement en catégories fonctionnelles

- N gènes dans le jeu de référence
- K gènes associés avec la catégorie fonctionnelle dans le jeu de référence
- n gènes dans le jeu de gènes d'intérêt (différentiellement exprimés)
- k gènes associés avec la catégorie fonctionnelle dans le jeu de gènes d'intérêt

Si pas d'enrichissement : distribution hypergéométrique.

P-valeur : la probabilité d'observer k ou plus gènes associés avec cette catégorie fonctionnelle, étant donnés N, K et n.

Toujours faire la correction pour tests multiples !

Logiciels pour l'analyse fonctionnelle

- Gorilla (http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il)
- DAVID (https://david.ncifcrf.gov)

- Librairie R GOfuncR
- Librairie R GOstats