TP Initiation à Galaxy

Exemple d’analyse différentielle d’expression de gènes

Introduction

L’objectif de ce TP est de réaliser une analyse différentielle d’expression de gènes, à partir de données de puces à ADN en utilisant la suite d’outil SMAGEXP sous Galaxy. SMAGEXP est une suite d’outil d’analyses et de meta-analyses de données d’expression qui repose sur les packages R limma, metaMA et metaRNAseq.

Ce TP aborde uniquement la partie analyse et laisse de côté la partie méta-analyse.

Récupération des données

Les données sont accessibles à l’emplacement suivant : https://drive.google.com/open?id=0B9hFq8t-2MSlTjd4OUJha19xeDQ

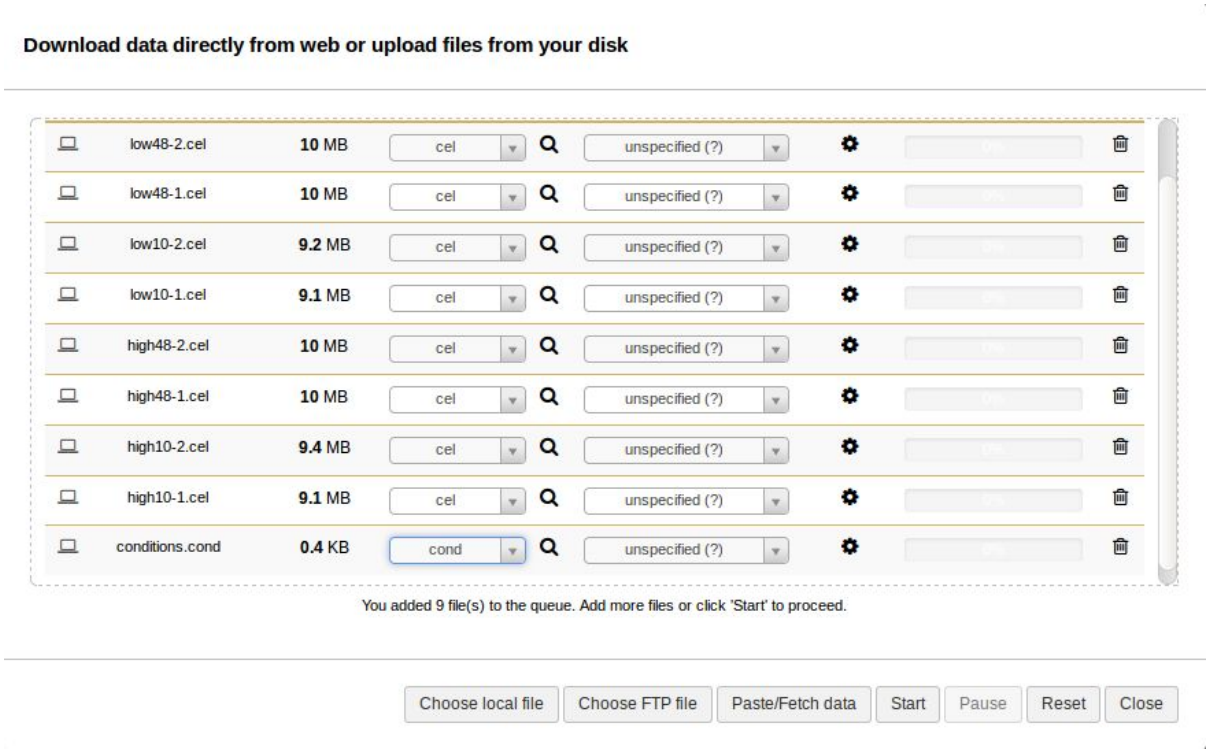
Décompressez le fichier .zip. Il contient 8 fichiers .cel et 1 fichier .cond.

Ces données proviennent d’une expérience liée au cancer du sein réalisée à l’aide de puces à ADN Affymetrix HGU95av2. Les facteurs de cette expérience sont la présence ou non d'oestrogènes (présent ou absent) et la longueur de l’exposition (10h ou 48h).

Analyse depuis les fichiers .cel

Upload des données

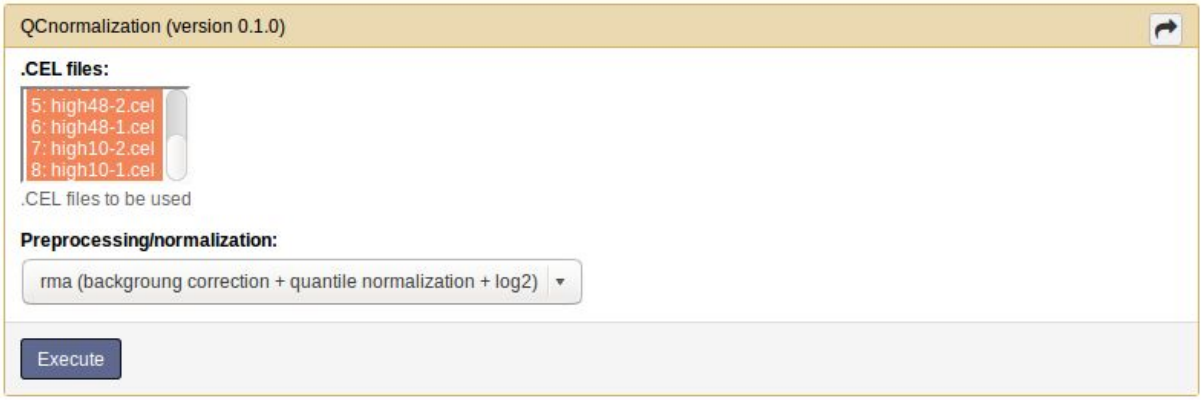
- Créer un nouvel historique en cliquant sur l'icône  en haut à droite du panel History
- Uploader les fichiers .cel et .cond sur Galaxy en prenant soin de bien de préciser le type de chaque fichier uploadé (8 fichiers cel ou 1 fichier cond)



Contrôle qualité et normalisation

Objectif : Réaliser une normalisation et s'assurer que les données normalisées sont de bonne qualité.

- Cliquer sur SMAGEXP - > QCnormalization
- Choisir la normalisation RMA



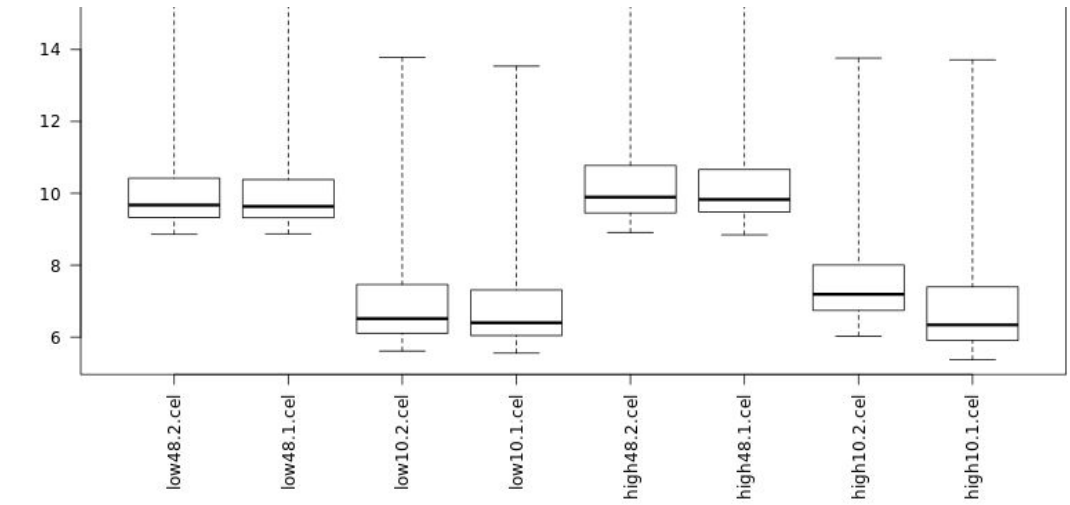
- Cliquer sur Execute

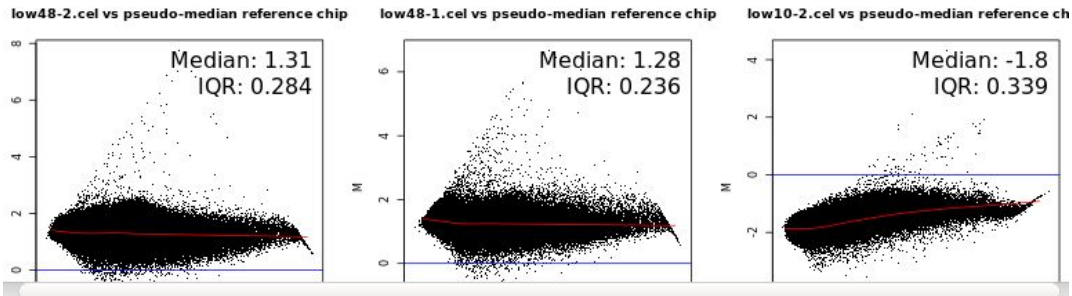
L'outils génère 2 fichiers en sortie :

- Un fichier de Type Rdata (export normalized expressionSet)
- Un rapport html, résumant les figures liées au contrôle qualité et à la normalisation (QC_result)

En cliquant sur le dataset "QC_result" on retrouve 3 type de visualisation :

- Les images des puces
- les boxplots
- les MA-plots



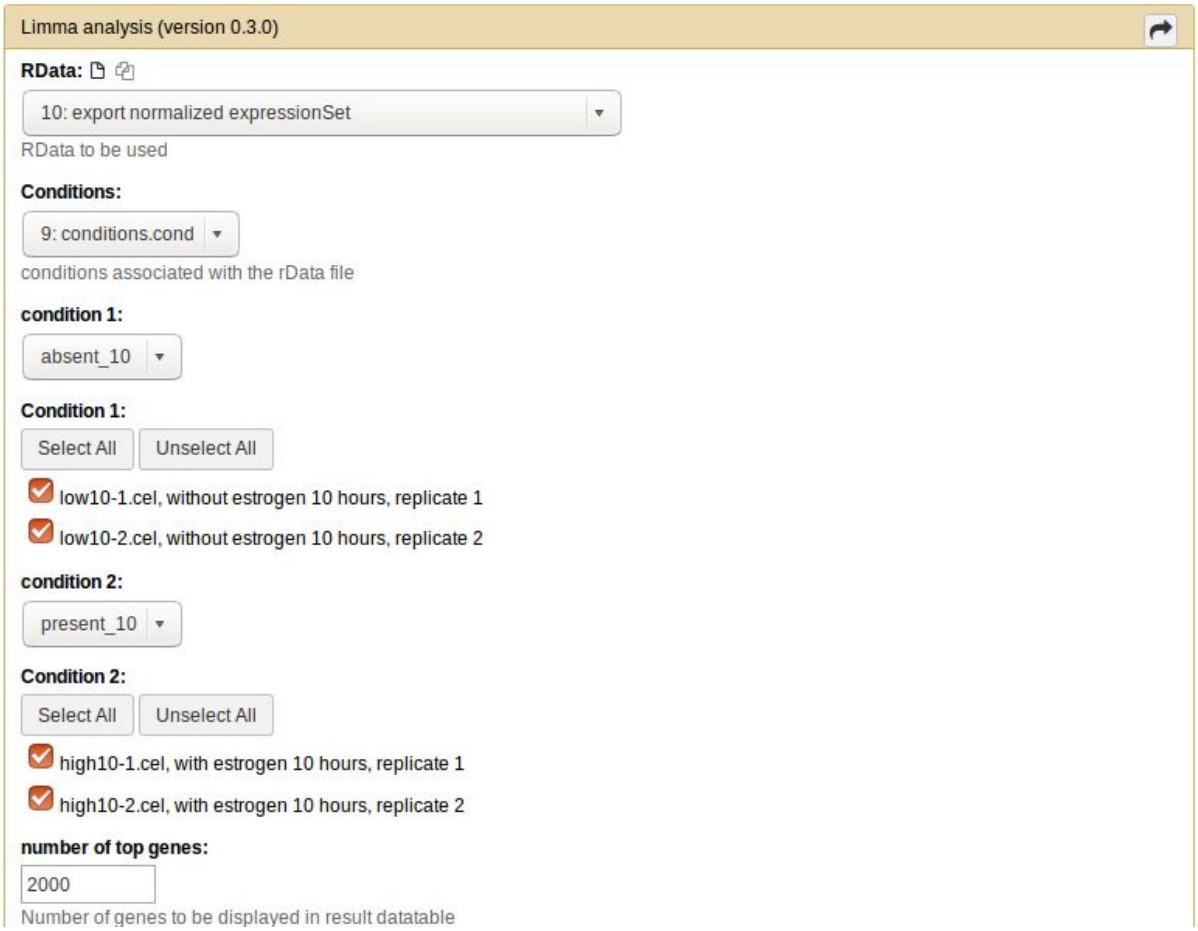


On remarquera que la normalisation a bien eu pour effet de normaliser la distribution des données (boxplots devenus quasiment identiques). De plus les MA-plots sont désormais centrés et symétriques autour de 0 et la ligne rouge s'est rapproché de la ligne bleue.

Analyse différentielle

L'analyse différentielle permet, à partir des données normalisées, de déterminer quels sont les gènes différentiellement exprimés entre 2 conditions. Par exemple dans le jeu de données normalisé précédemment, regardons quels sont les gènes différentiellement exprimés entre la condition low10 et high10.

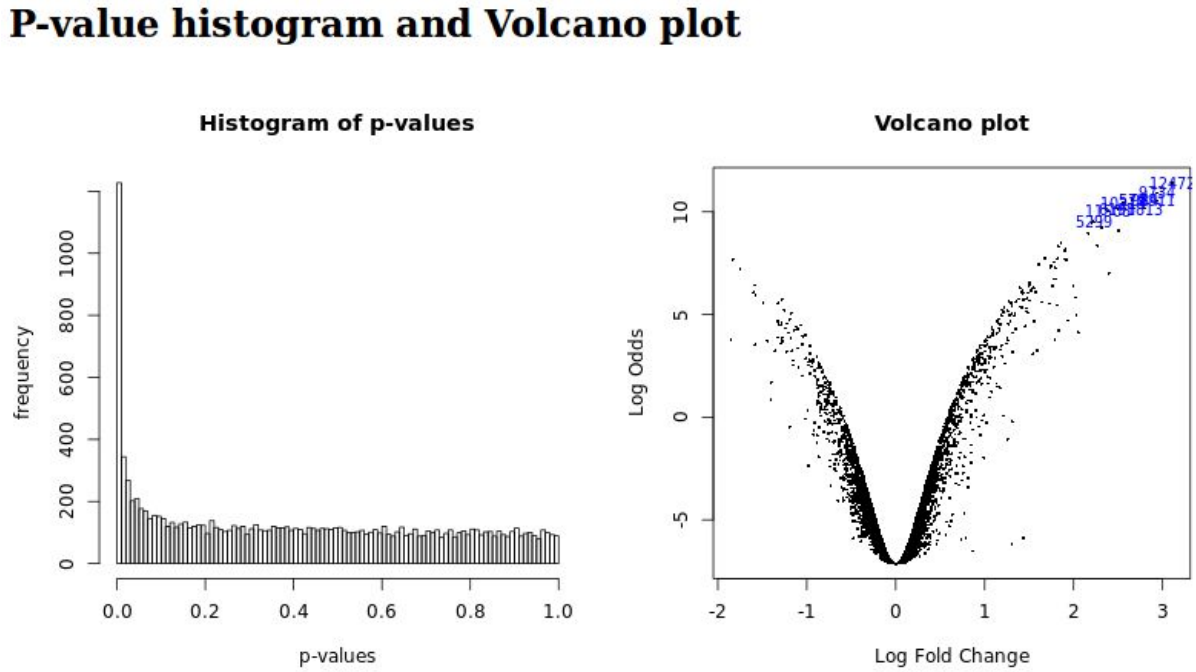
- Dans le panel "Tools", cliquer sur SMAGEXP -> limma analysis
- Sélectionner le fichier "export normalized expressionSet"
- Sélectionner le fichier .cond et les conditions associées
- Renvoyer les 2000 premiers gènes



L'outil renvoie 2 fichiers :

- 1 fichier RData qui peut servir pour une meta-analyse future
- 1 rapport html présentant les résultats de l'analyse.

Le rapport html contient quelques figures : boxplots, histogramme de p-values et volcano plot.



Un tableau présente les valeurs statistiques ainsi que les annotations des 2000 “meilleures” (au sens de la p-value) sondes de la puce.
Les colonnes du tableau sont triables et le champ search permet de réaliser des requêtes.

De plus chaque ligne peut-être déployée à l’aide de l’icône ⊞ donnant ainsi accès aux liens vers les annotations du site ncbi et gene ontology.
Enfin, il est possible d’exporter ces données au format csv ou au format Excel.

Copy CSV Excel Search:

	ID	adj_P_Val	P_Value	t	B	logFC	Gene_symbol	Gene
⊖	910_at	2.1e-05	2.5e-09	29.49	11.410	3.11	TK1	thymidine k
	Gene Symbol:	TK1						
	Gene Title:	thymidine kinase 1						
	GO Function ID:	GO:0005524, GO:0042802, GO:0019206, GO:0005515, GO:0004797, GO						
⊕	39642_at	2.1e-05	5.0e-09	26.96	10.933	2.94	ELOVL2	ELOVL fatt
⊕	1884_s_at	2.1e-05	8.3e-09	25.28	10.570	2.80	PCNA	proliferatin
⊕	1536_at	2.1e-05	8.3e-09	25.27	10.569	2.66	CDC6	cell division
⊕	38827_at	2.1e-05	8.5e-09	25.20	10.551	2.93	AGR2	anterior gr
⊕	40117_at	2.1e-05	9.9e-09	24.72	10.440	2.56	MCM6	minichrom
⊕	31798_at	2.3e-05	1.4e-08	23.57	10.158	2.80	TFF1	trefoil fact
⊕	36134_at	2.3e-05	1.4e-08	23.53	10.149	2.49	OLFM1	olfactomed
⊕	41400_at	2.4e-05	1.7e-08	23.06	10.027	2.38	TK1	thymidine k
⊕	35249_at	3.5e-05	3.2e-08	21.28	9.527	2.22	CCNE2	cyclin E2

Show 10 entries

Showing 1 to 10 of 997 entries Previous 1 2 3 4 5 ... 100 Next

Exercice (mode difficile)

- Quels sont les gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée < 0.05 et abs(logFC) > 2) communs entre les analyses “absent_10 vs present_10” et “absent_48 vs present_48”

Exercice (mode progressif)

- Quels sont les gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée < 0.05 et abs(logFC) > 2) communs entre les analyses “absent_10 vs present_10” et “absent_48 vs present_48”

1) Sur le même modèle que précédemment, réaliser l’analyse différentielle entre les conditions absent_48 et present_48
2) Pour les 2 analyses, sélectionner les gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée < 0.05 abs(logFC) > 2)
3) Comparer les 2 listes de gènes ainsi obtenus pour retrouver les gènes communs