Identification et Quantification de métabolites dans un spectre RMN

R. Servien, P. Tardivel, C. Canlet, L. Debrauwer, M. Tremblay-Franco, D. Concordet

UMR 1331 Toxalim,
INRA - ENVT,
Toulouse

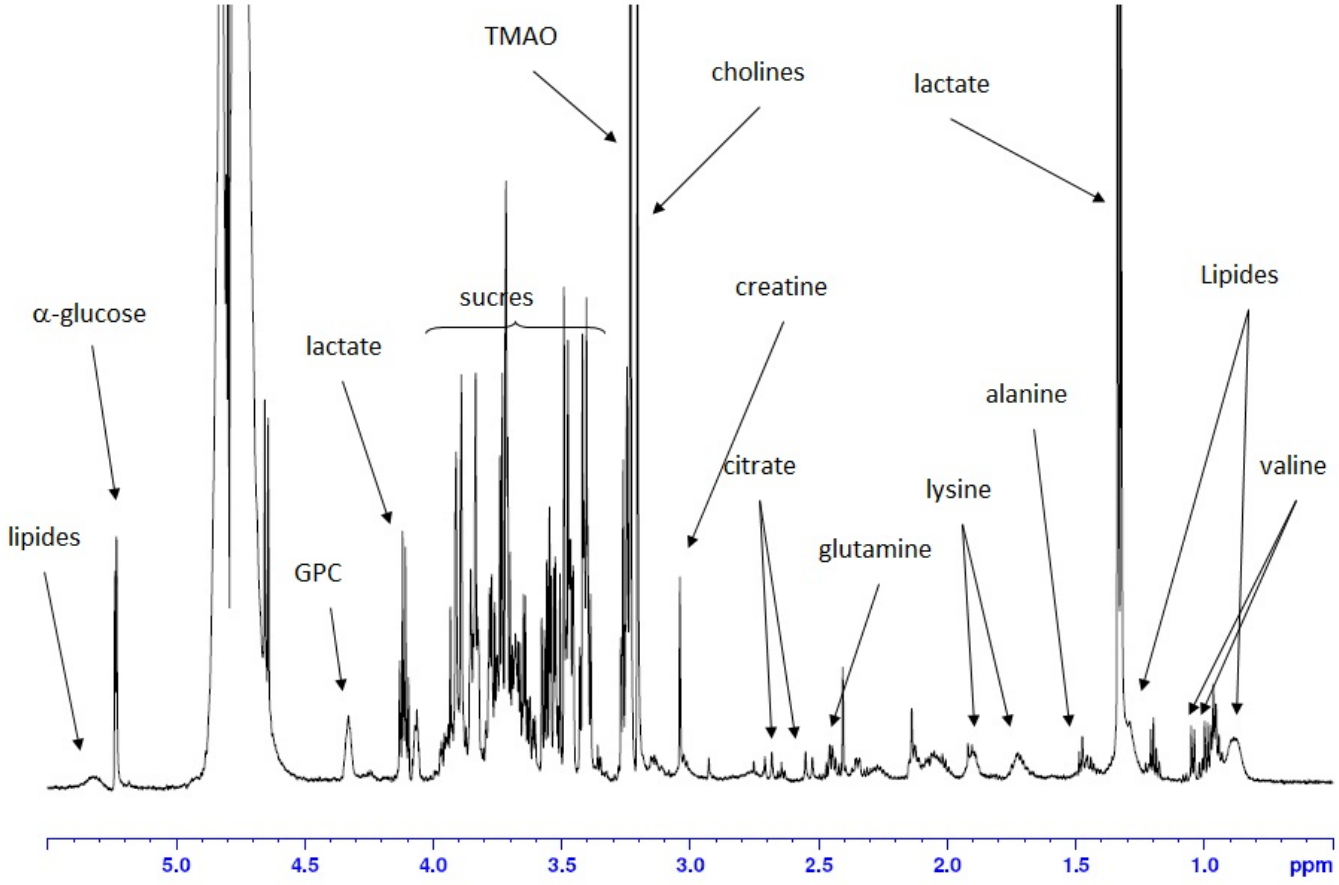
Séminaire du C.N.A.M.
11 Décembre 2014

Plan de la présentation

Contexte

- Métabolomique : Domaine en plein essor.
- Applications en biologie, en médecine ...
- Deux groupes d'étude (traité/non traité) et on procède à l'étude des métabolites participant aux réactions métaboliques d'un organisme.

Spectre RMN


TMAO
cholines
lactate
α-glucose
lactate
sucres
creatine
Lipides
alanine
citrate
valine
lysine
lipides
GPC
glutamine
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm

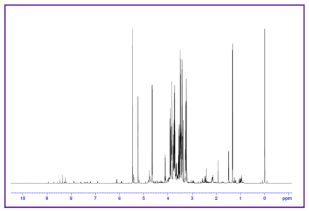
Empreintes Métaboliques : Stratégie actuelle

Groupes à comparer (Urine, plasma, tissus, cellules…)

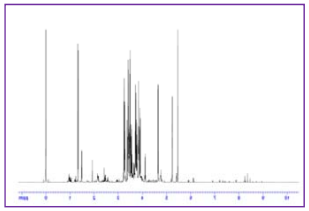
Identification des métabolites discriminants

Glucose
Taurine
Glycine
Glutamate
Lactate
Lysine
Leucine

Technique analytique (RMN, MS…)

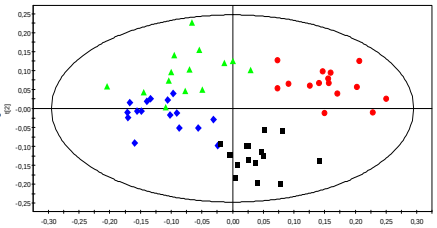


Spectres RMN (ou MS)



Discrétisation des spectres (bucketting): Tableau de données

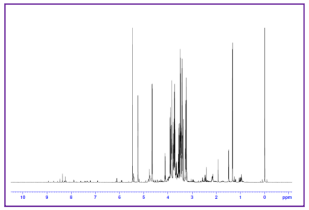
Analyses statistiques multivariées : Comparaison AUC après discrétisation



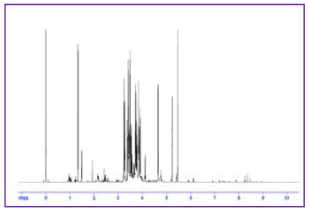
Stratégie proposée

Groupes à comparer (Urine, plasma, tissus, cellules…)

Technique analytique (RMN, MS…)



Spectres RMN (ou MS)

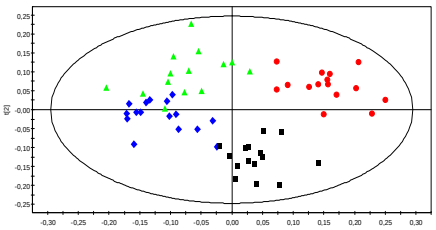


Identification des métabolites et de leur quantité dans chaque spectre

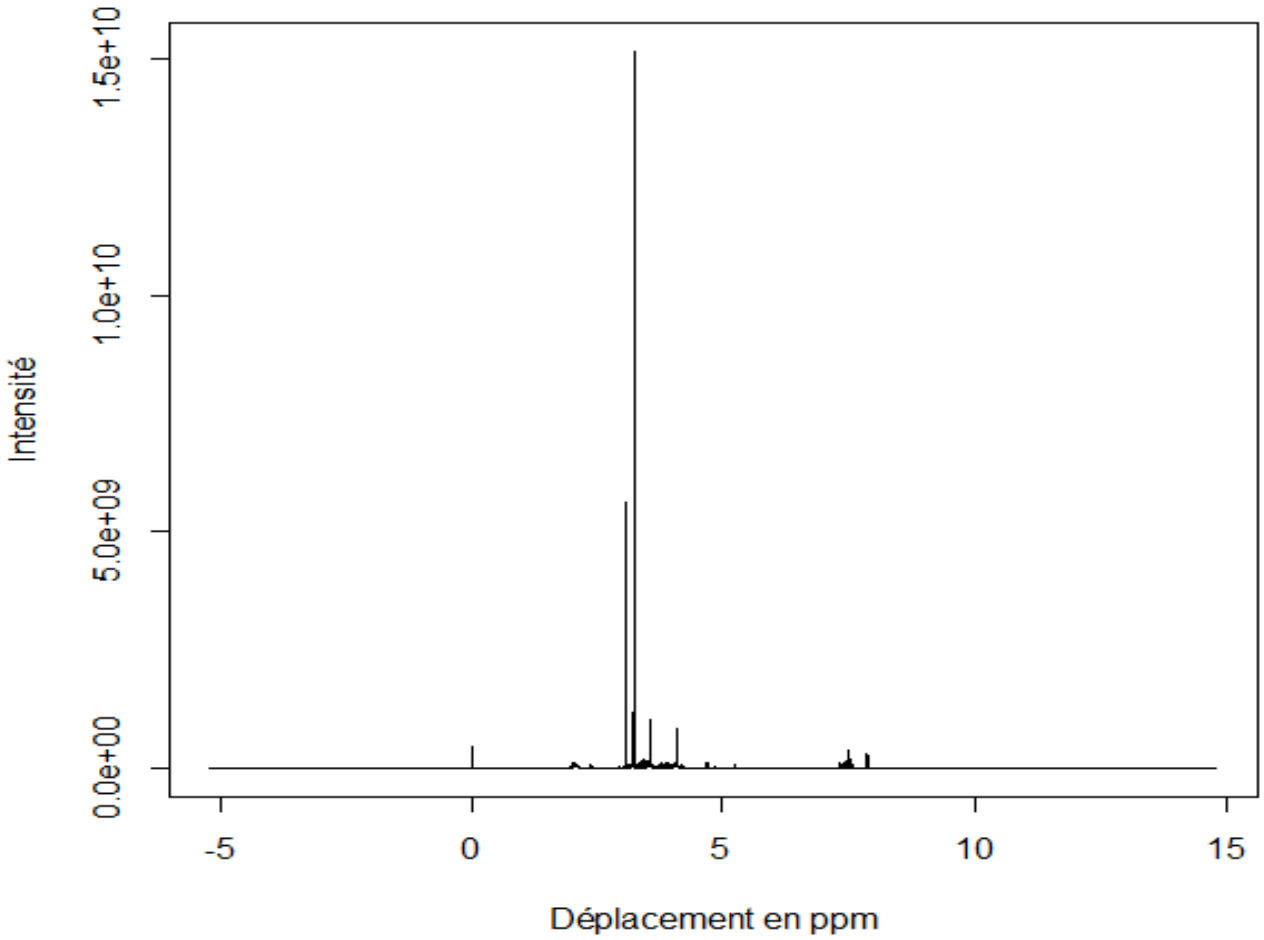
Glucose
Taurine
Glycine
Glutamate
Lactate
Lysine
Leucine

Glucose
Taurine
Glycine
Glutamate
Lactate
Lysine
Leucine

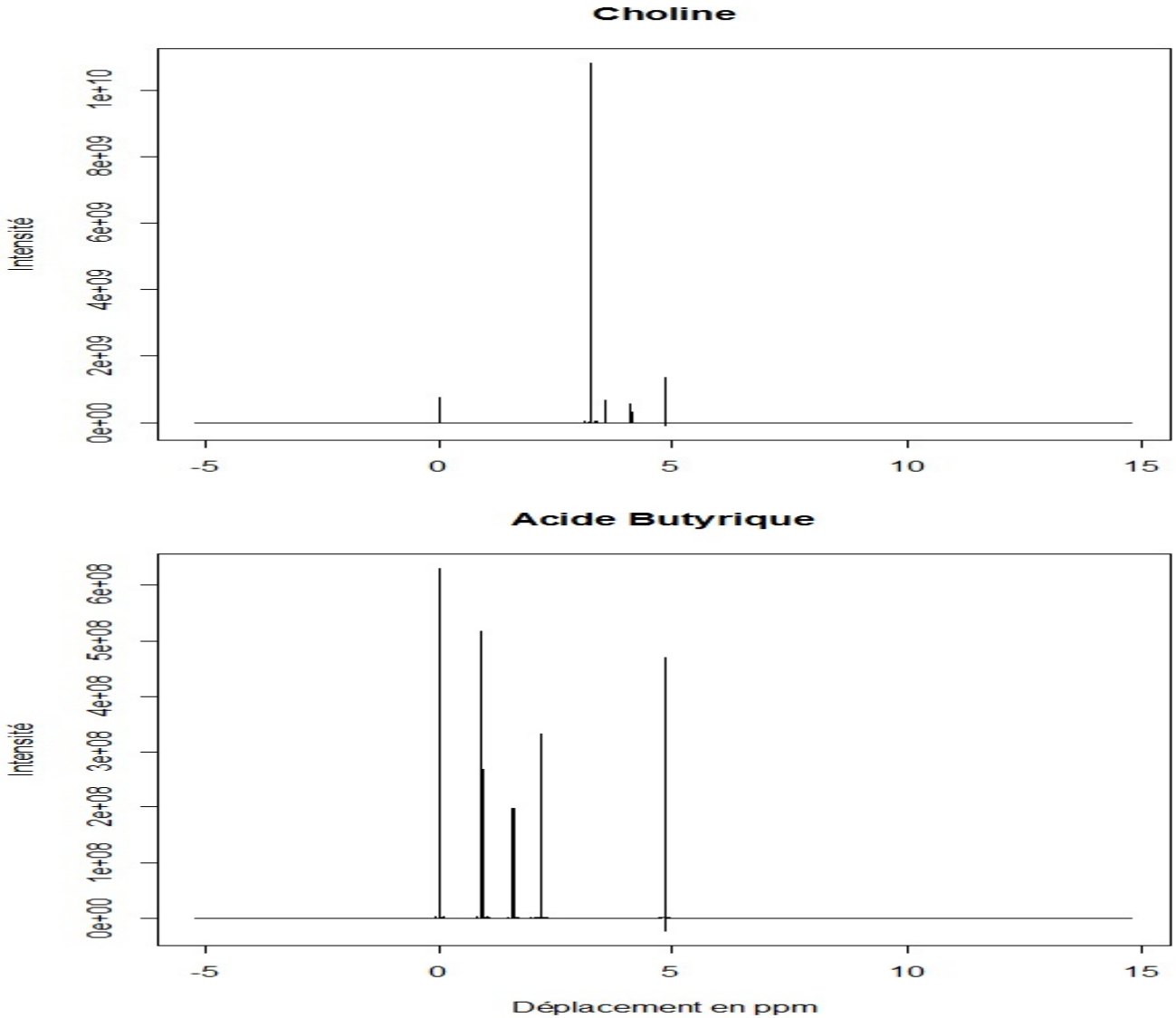
Analyses statistiques multivariées : Comparaison des compositions



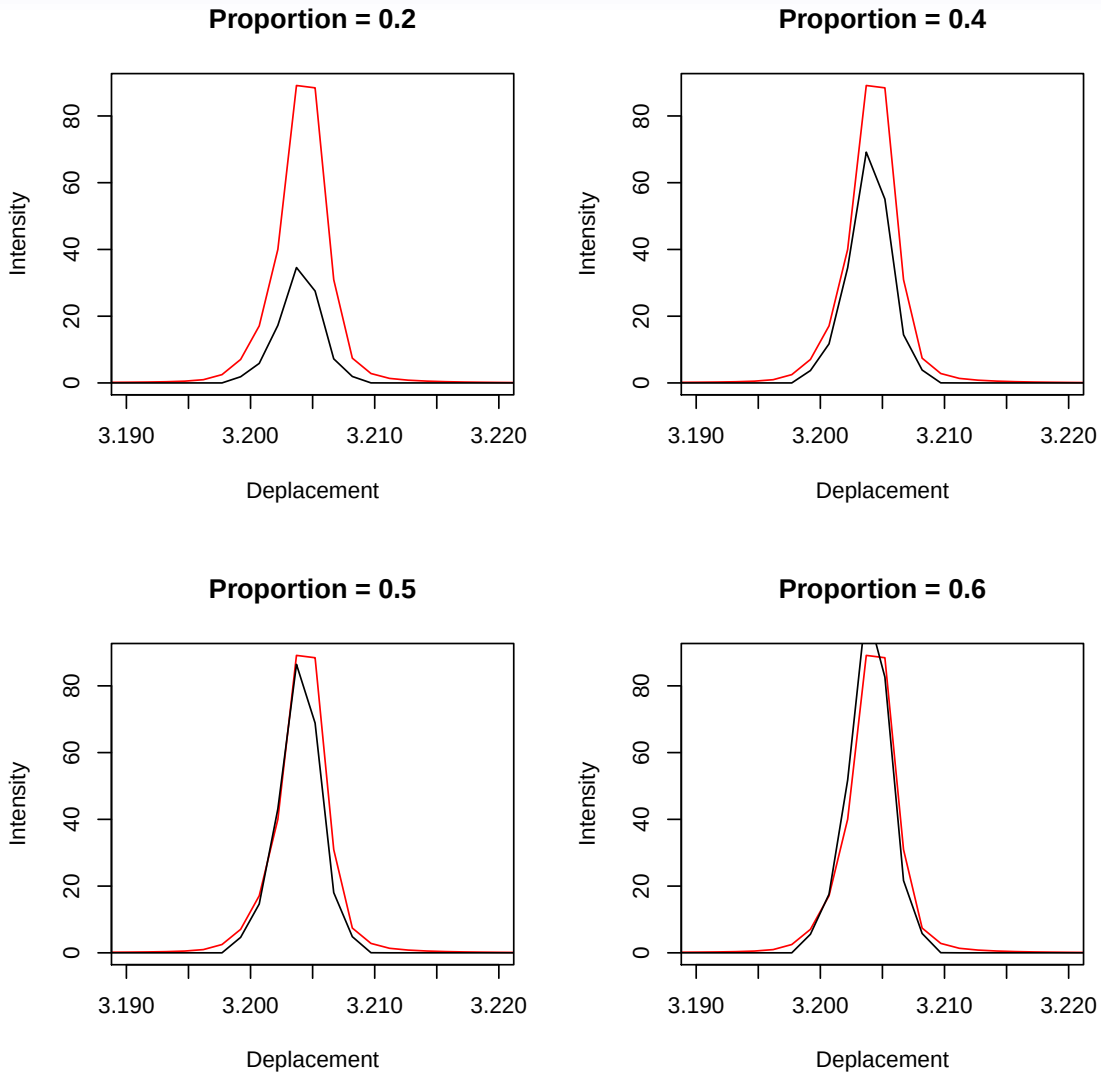
Exemple de mélange à analyser



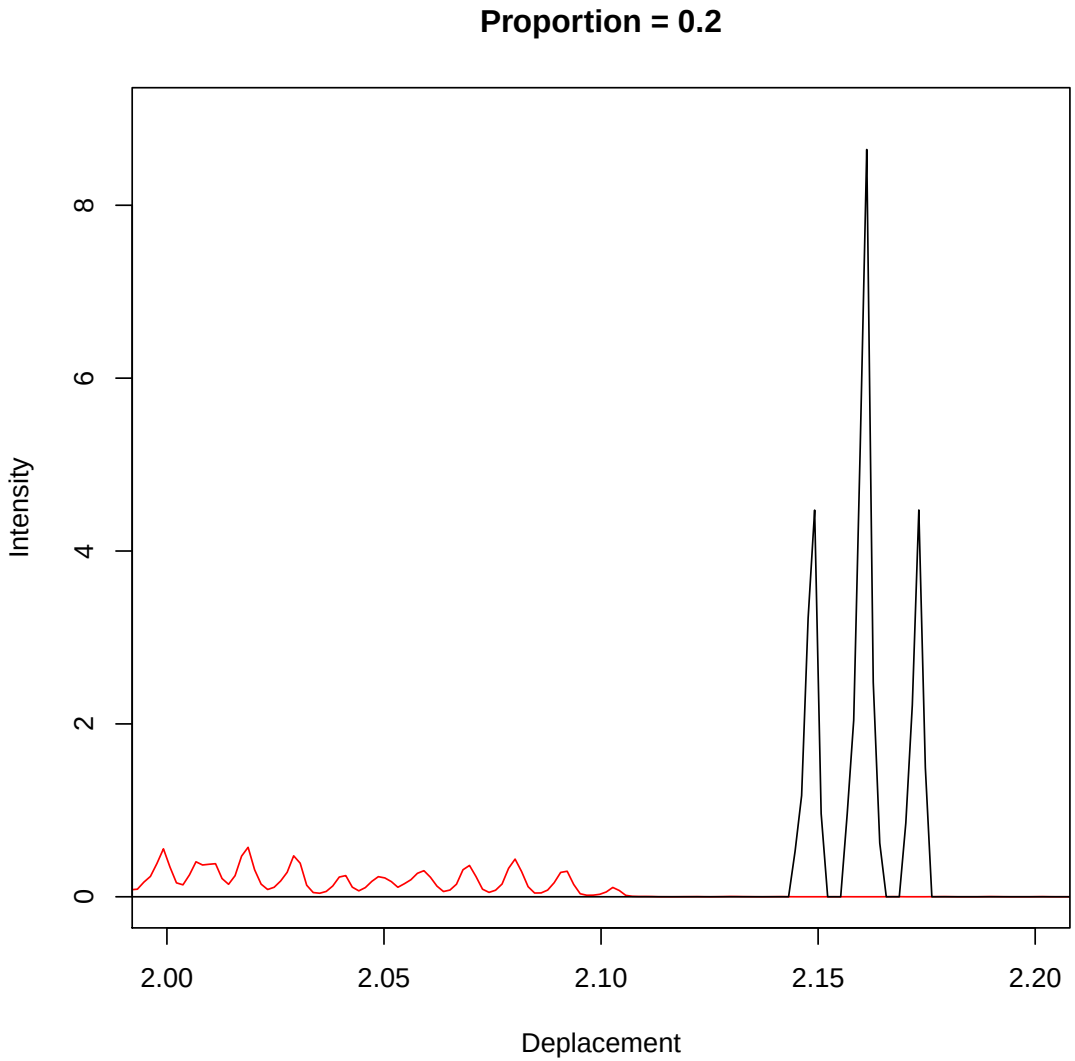
Exemples de métabolites



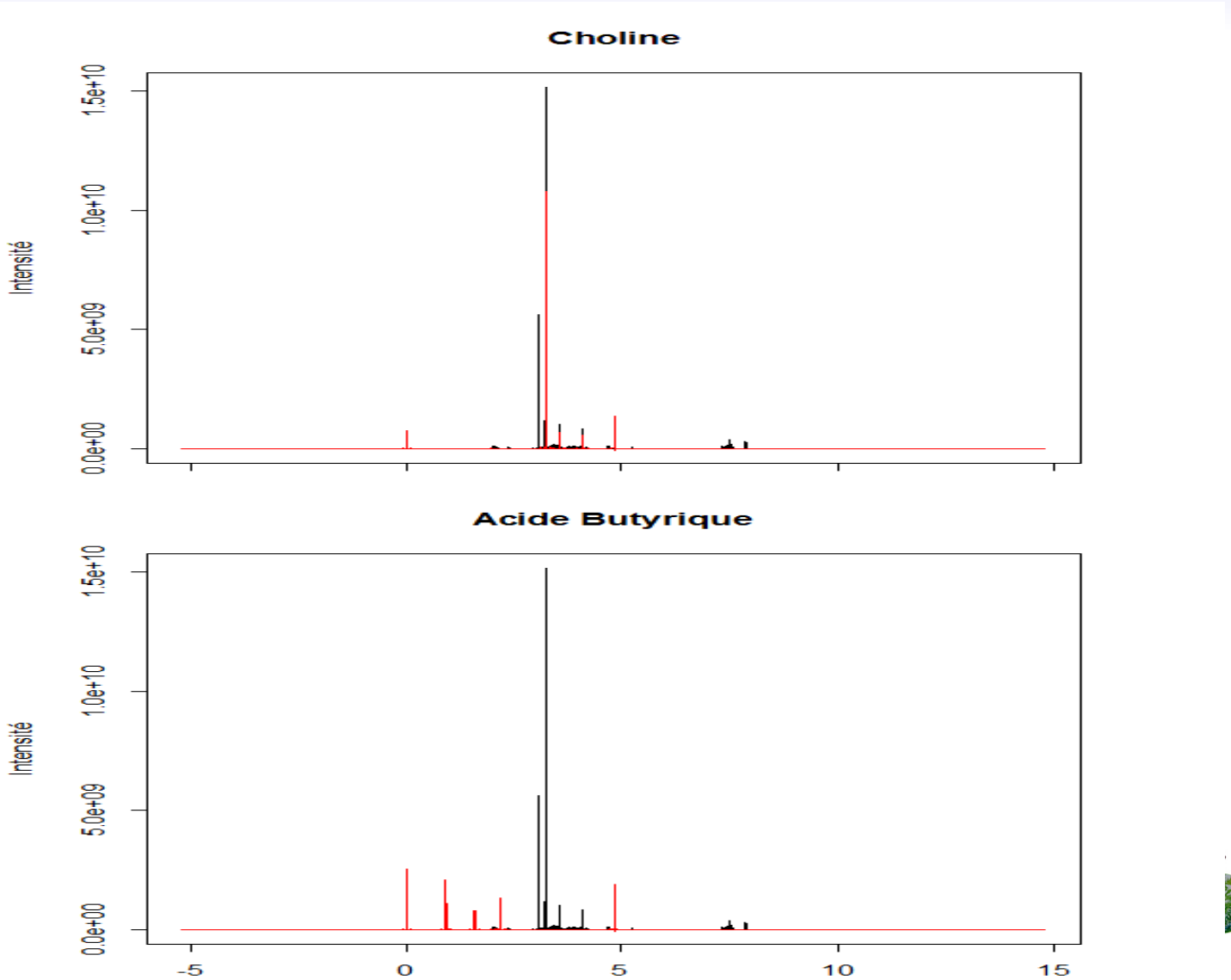
Choline


Proportion = 0.2
Proportion = 0.4
Proportion = 0.5
Proportion = 0.6
Intensity
Deplacement
0
20
40
60
80
3.190
3.200
3.210
3.220

Acide Butyrique



Tests préliminaires



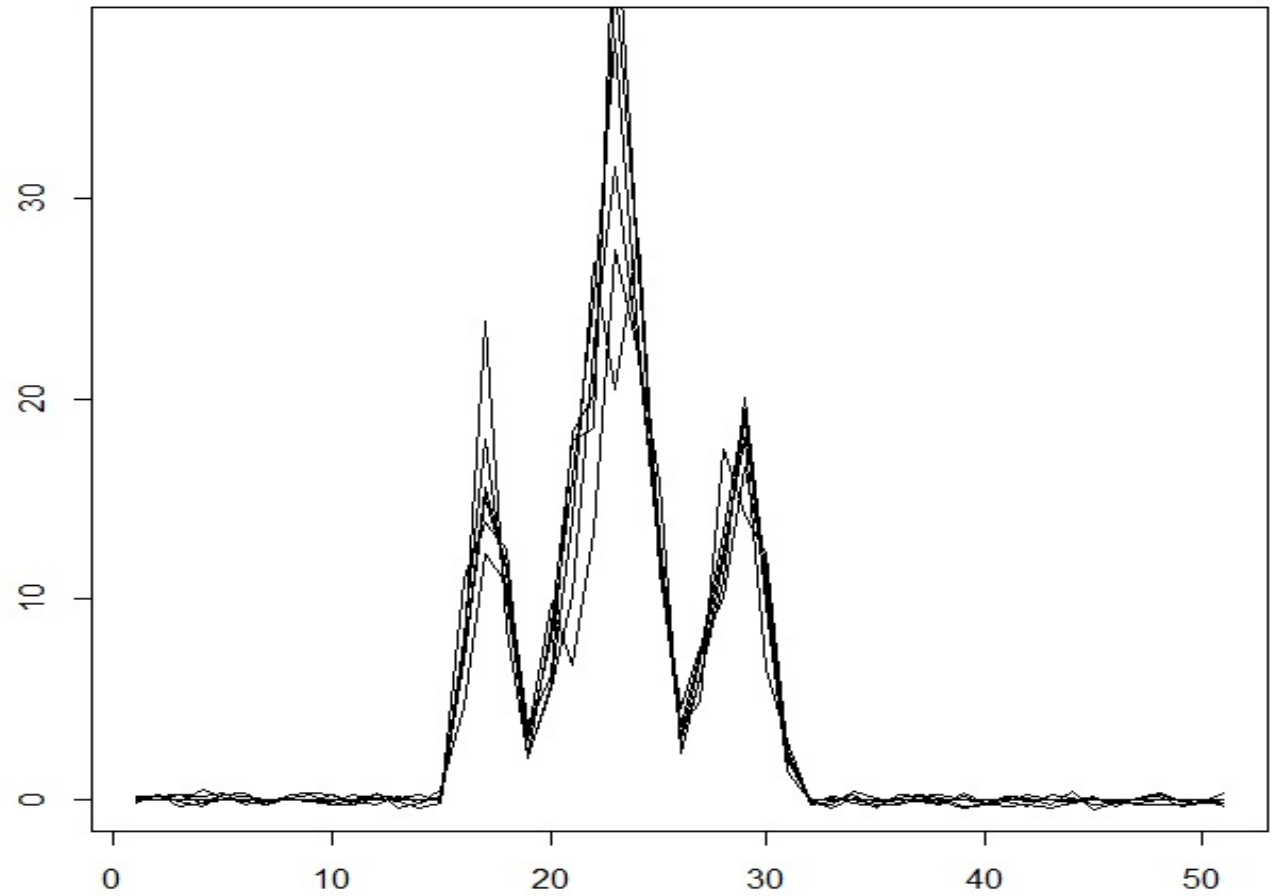
Modélisation naïve

- Un mélange est modélisé comme une fonction $f(x) \geq 0$.
- On dispose d'une bibliothèque de spectres de K métabolites purs représentables par des fonctions $(U_i(x))_{i=1,\ldots,K}$ positives.
- Nous allons décomposer la fonction f de la façon suivante :

$$f(x) = \sum_{i=1}^{K} \alpha_i U_i(x) + R(x)$$

  - f et les $(U_i(x))_{i=1,\ldots,K}$ sont normalisés i.e. pour tout i, $\int U_i(x)dx = 1$
  - $\alpha_i \in [0, 1]$ représente l'abondance du $i^{ème}$ métabolite dans le mélange et on a $\sum_{i=1}^{K} \alpha_i \leq 1$,
  - $R(x) \geq 0$ est la part du spectre non identifiable à l'aide des spectres des métabolites de la bibliothèque.

Les signaux sont bruités



Modélisation statistique

- Un mélange est modélisé comme une fonction **aléatoire** $Y(x) \geq 0$.
- On dispose d'une bibliothèque de spectres de K métabolites purs représentables par des fonctions **aléatoires** $(U_i(x))_{i=1,\dots,K}$ positives.
- Les bruits blancs ε_x et $(\varepsilon_x^i)_{i=1,\dots,K}$ ont un écart-type constant et sont indépendants.
- Nous allons décomposer la fonction Y de la façon suivante :

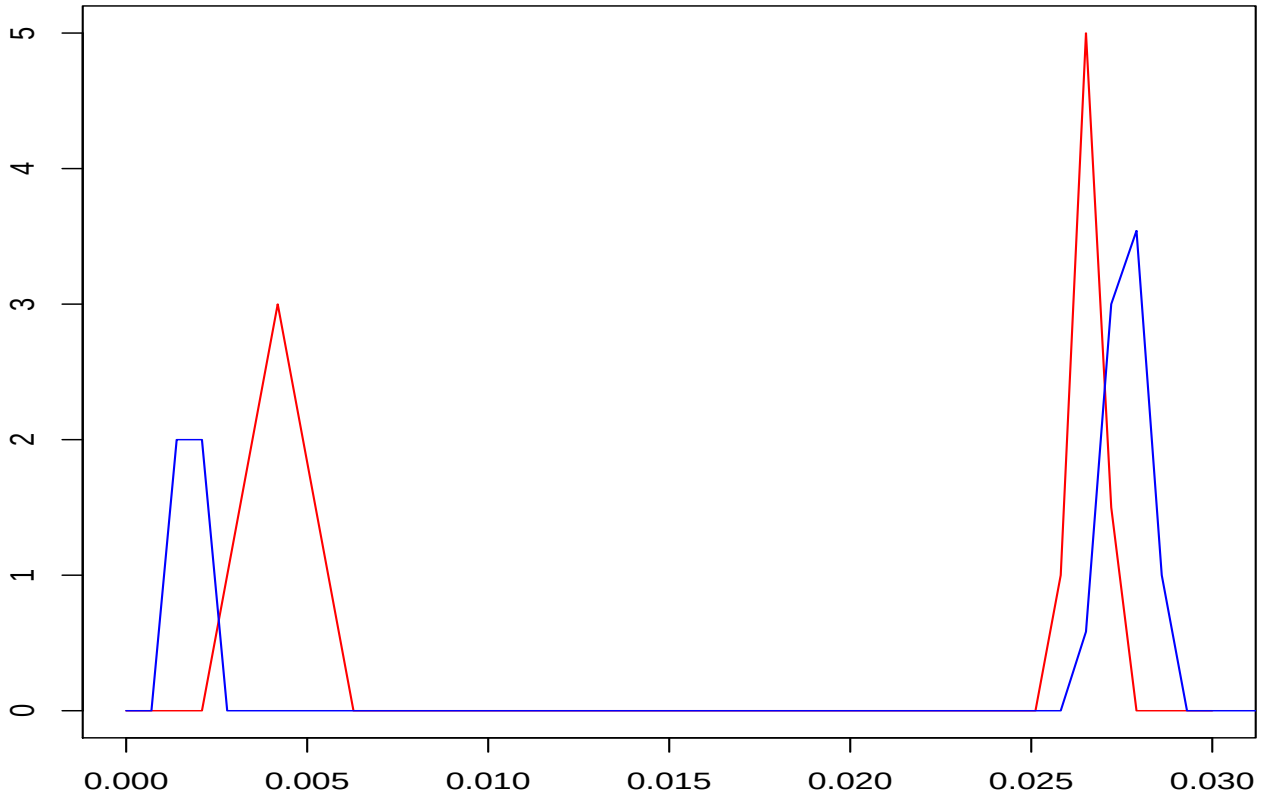
$$Y(x) = \left(\sum_{i=1}^{K} \alpha_i U_i(x) + R(x)\right)(1+\varepsilon_x)$$

$$\begin{cases} V_1(x) = U_1(x)(1+\varepsilon_x^1) \\ \vdots \\ V_K(x) = U_K(x)(1+\varepsilon_x^K) \end{cases}$$

Problèmes de déformation

- Il n'y a pas la même concentration du métabolite entre le métabolite pur et le mélange : les pics n'ont pas forcément la même forme.
- Il n'y a pas les mêmes conditions expérimentales (pH, produits, expérimentateur ...) : les pics peuvent être décalés.

Exemple



Déformation

- Ce n'est pas simplement une translation uniforme sur le spectre.
- Les déformations sont locales.
- Le spectre peut être translaté mais également dilaté ou contracté.
- Déformation maximale fixée par l'expertise (0.01 ppm).

Modélisation des déformations

- Un mélange est modélisé comme une fonction aléatoire $Y(x) \geq 0$.
- On dispose d'une bibliothéque de spectres de K métabolites purs représentables par des fonctions aléatoire $(U_i(x))_{i=1,\dots,K}$ positives.
- Nous allons décomposer la fonction Y de la façon suivante :

$$Y(x) = \left(\sum_{i=1}^{K} \alpha_i U_i\left(\varphi_i^y(x)\right) + R(x)\right)(1+\varepsilon_x)$$

$$\begin{cases} V_1(x) = U_1(\varphi^1(x))(1+\varepsilon_x^1) \\ \vdots \\ V_K(x) = U_K(\varphi^K(x))(1+\varepsilon_x^K). \end{cases}$$

Modèle final

$$Y(x) = \left(\sum_{i=1}^{K} \alpha_i U_i \left(\varphi_i^y(x) \right) + R(x) \right) (1 + \varepsilon_x)$$

$$\begin{cases} V_1(x) = U_1(\varphi^1(x))(1 + \varepsilon_x^1) \\ \vdots \\ V_K(x) = U_K(\varphi^K(x))(1 + \varepsilon_x^K) \end{cases}$$

Hypothèse implicite **d'identifiabilité** : il n'existe pas de métabolite dont le signal peut s'exprimer comme le mélange de signaux d'autres métabolites à une déformation près.

Estimation des proportions α_i

Contraintes :

- Il faut que tous les métabolites soient traités simultanément,
- Il faut une méthode parcimonieuse,
- Il faut que le calcul soit très rapide.

$$\sum_{i=1}^{K} \alpha_i \text{ est maximum sous } \begin{cases} \sum_{i=1}^{K} \alpha_i & \leq 1 \\ Y(t) & \geq \sum_{i=1}^{K} \alpha_i Z_i \circ \varphi_i(t). \end{cases} \quad (1)$$

Problème

Pour identifier les métabolites présents dans le mélange, il faut donc estimer

- la variance des ε_x^K,
- les déformations φ_i^y et φ^i ou une composition des deux,
- les α_i : si $\alpha_i > 0$, le i^e métabolite est présent dans le mélange.

Contraintes :

- Temps de calcul le plus faible possible,
- Doit permettre de gérer la “compétition" entre les métabolites : tout doit être estimé simultanément.

Stratégie d'estimation

- Soit le couple $(\hat{\varphi}_i, \hat{\alpha}_i)_{i=1,\dots,K}$ solution de (1).
- Soit le couple $(\varphi_i^*, \alpha_i^*)_{i=1,\dots,K}$ obtenu en testant les métabolites un par un.
- Soit le couple $\left(\varphi_i^*, \hat{\hat{\alpha}}_i\right)_{i=1,\dots,K}$ obtenu en optimisant les déformations une par une, puis en optimisant avec compétition les α_i.

Proposition

Pour chaque i, on a

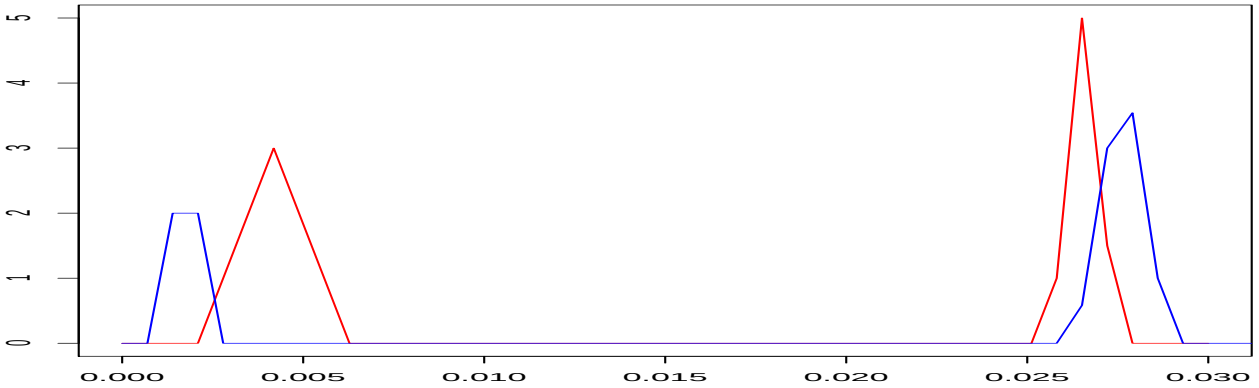
$$\alpha_i^* \geq \hat{\alpha}_i \geq \hat{\hat{\alpha}}_i.$$

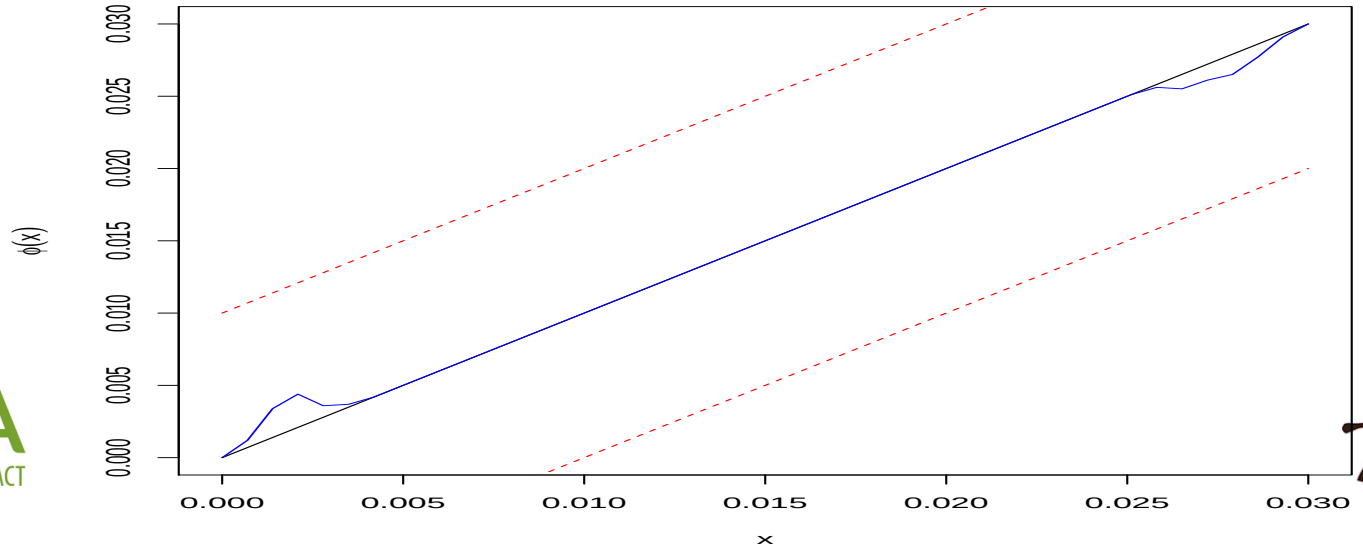
Modélisation des déformations

Hypothèses minimales sur les fonctions de déformation $(\varphi^i)_{i=1,\dots,K}$ et $(\varphi_i^y)_{i=1,\dots,K}$:

- les fonctions sont continues (les déformations ne sont pas trop violentes),
- les fonctions sont strictement monotones (elles ne peuvent pas intervertir l'ordre des pics),
- les déformations ont une amplitude maximale fixée par l'expertise.

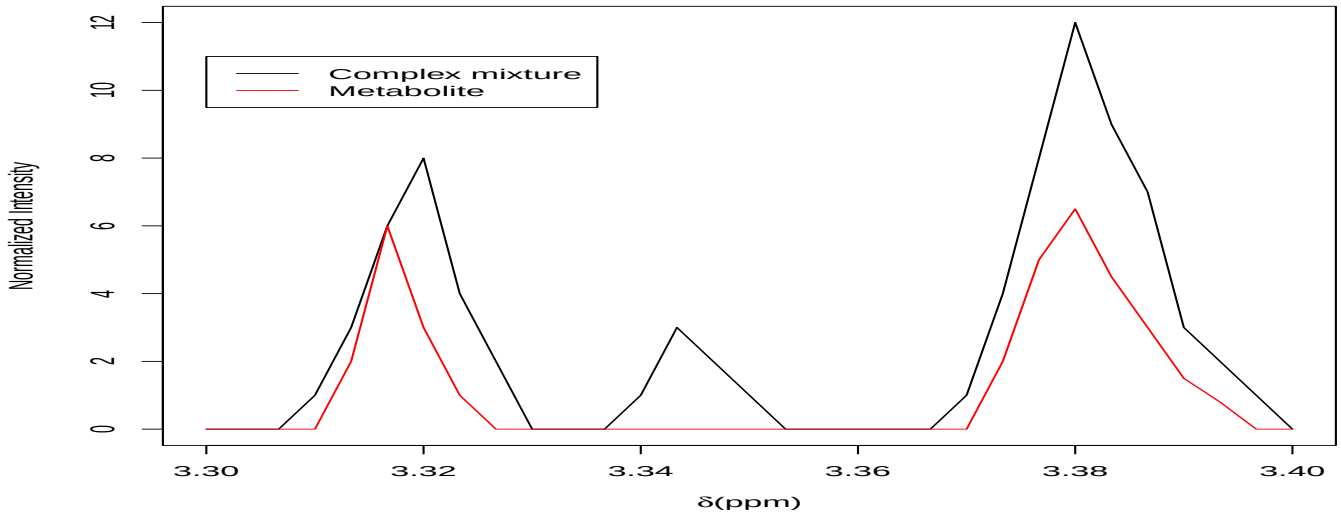
Déformations φ





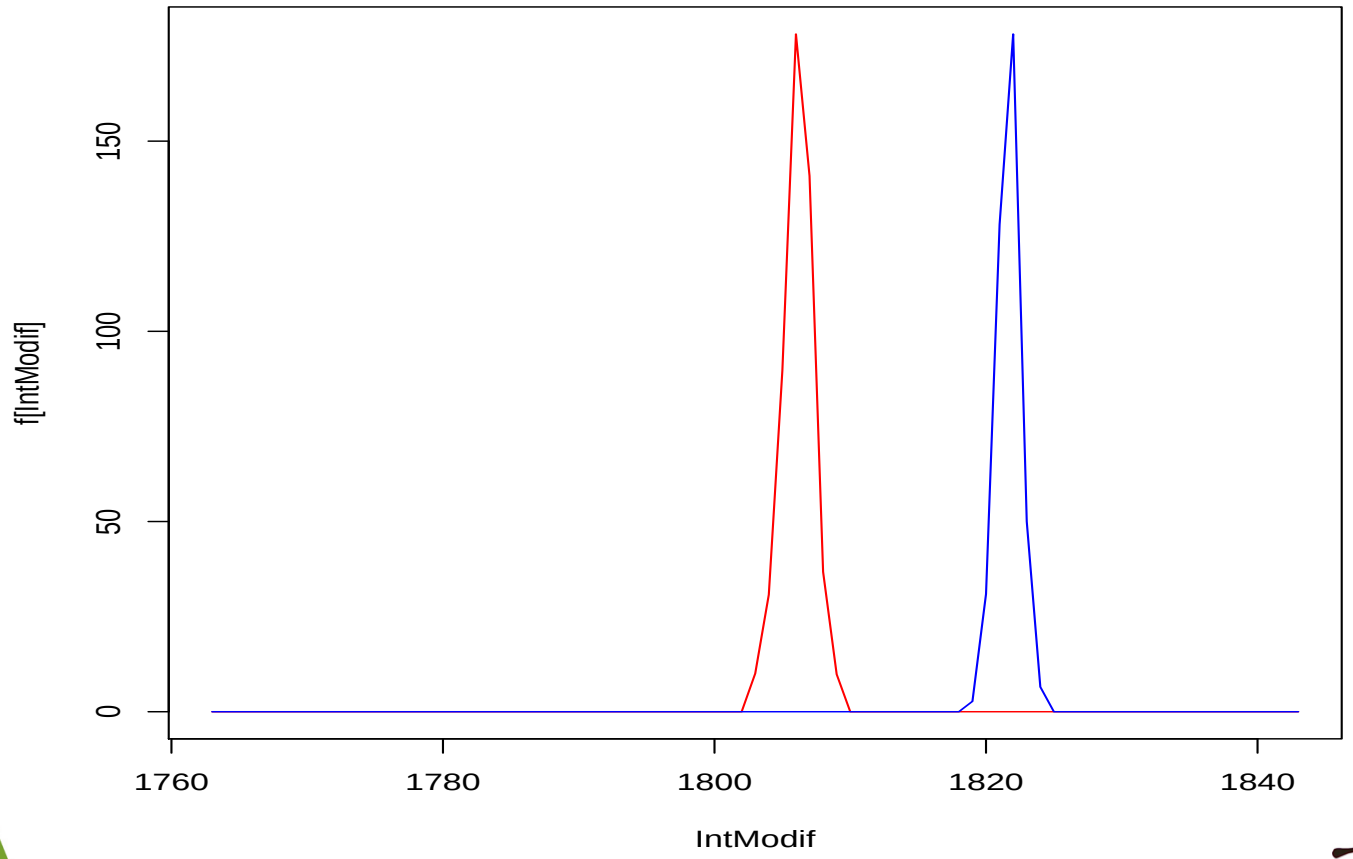
Algorithme itératif

- On prend un métabolite.
- On estime α_i en utilisant uniquement ce métabolite.
- On cherche le point de "contact".

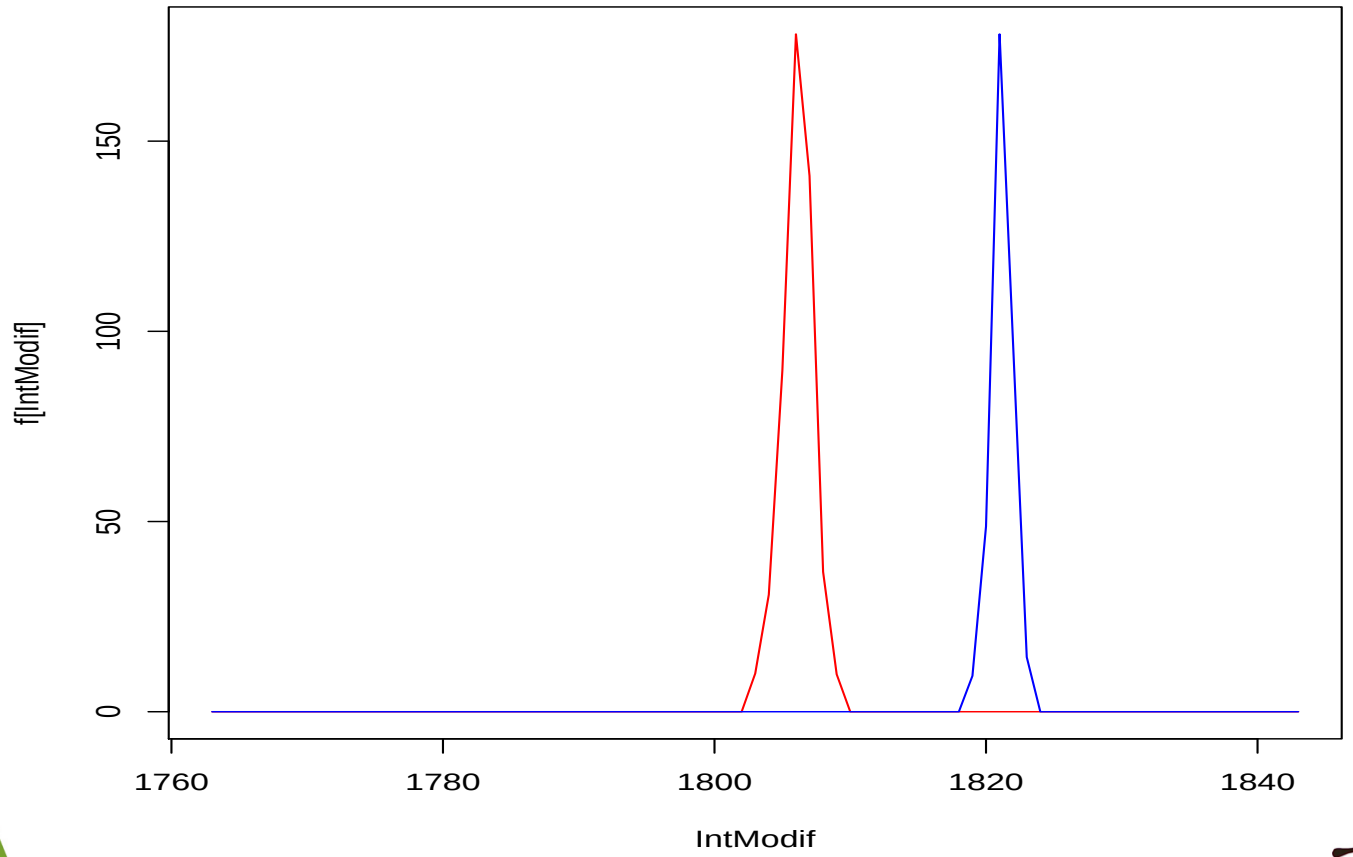


- On sélectionne sa composante connexe et on essaie de la recaler en utilisant la méthode de la page précédente.

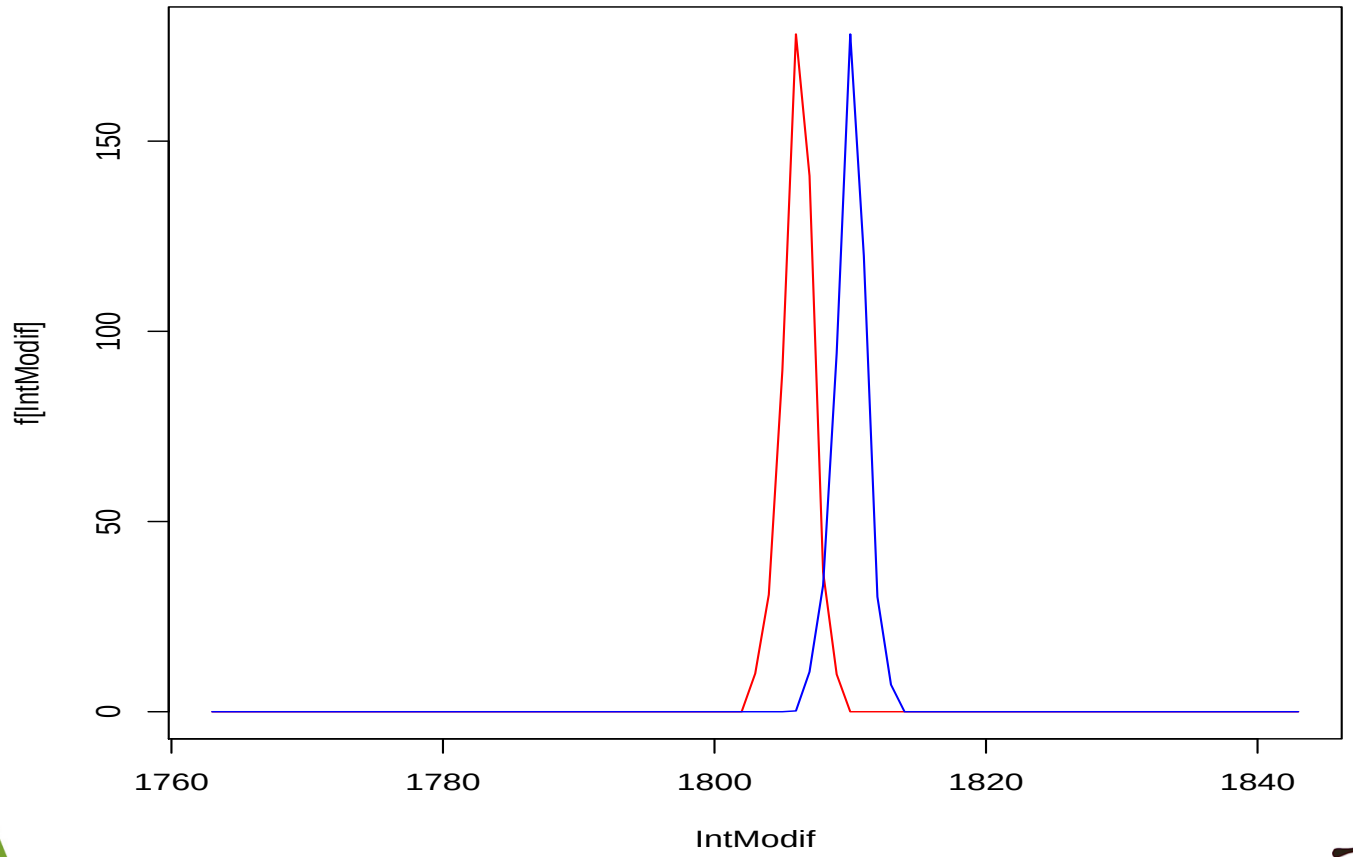
Exemple



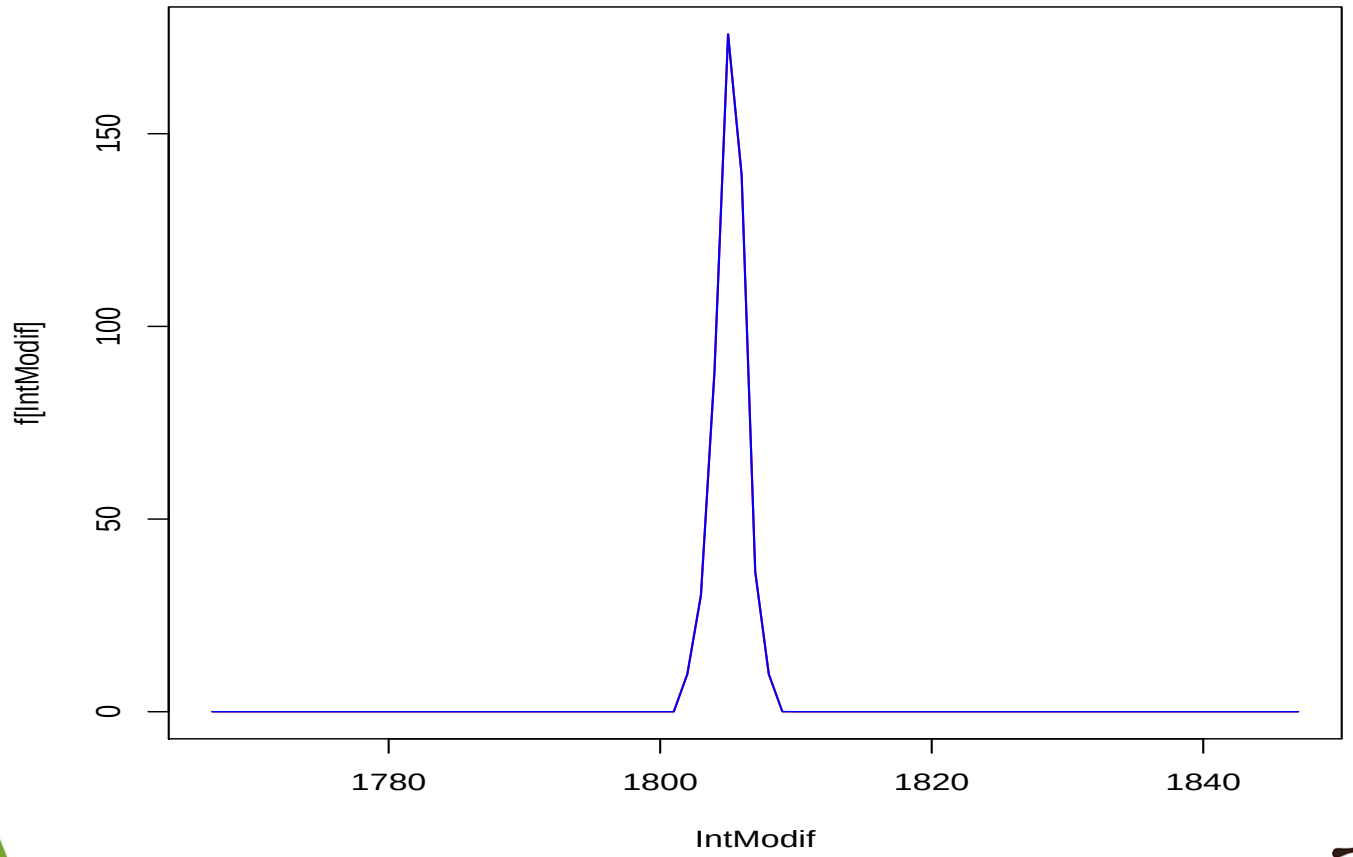
Exemple



Exemple



Exemple



Algorithme itératif

- A l'aide de l'étape précédente, on a fait augmenter le α_i de ce métabolite.
- On réitére les étapes précédentes jusqu'à ce qu'aucune nouvelle déformation ne permette de faire augmenter le α_i.
- On fait ça pour tous les métabolites.
- On obtient $(\varphi_i^*, \alpha_i^*)_{i=1,\dots,K}$.

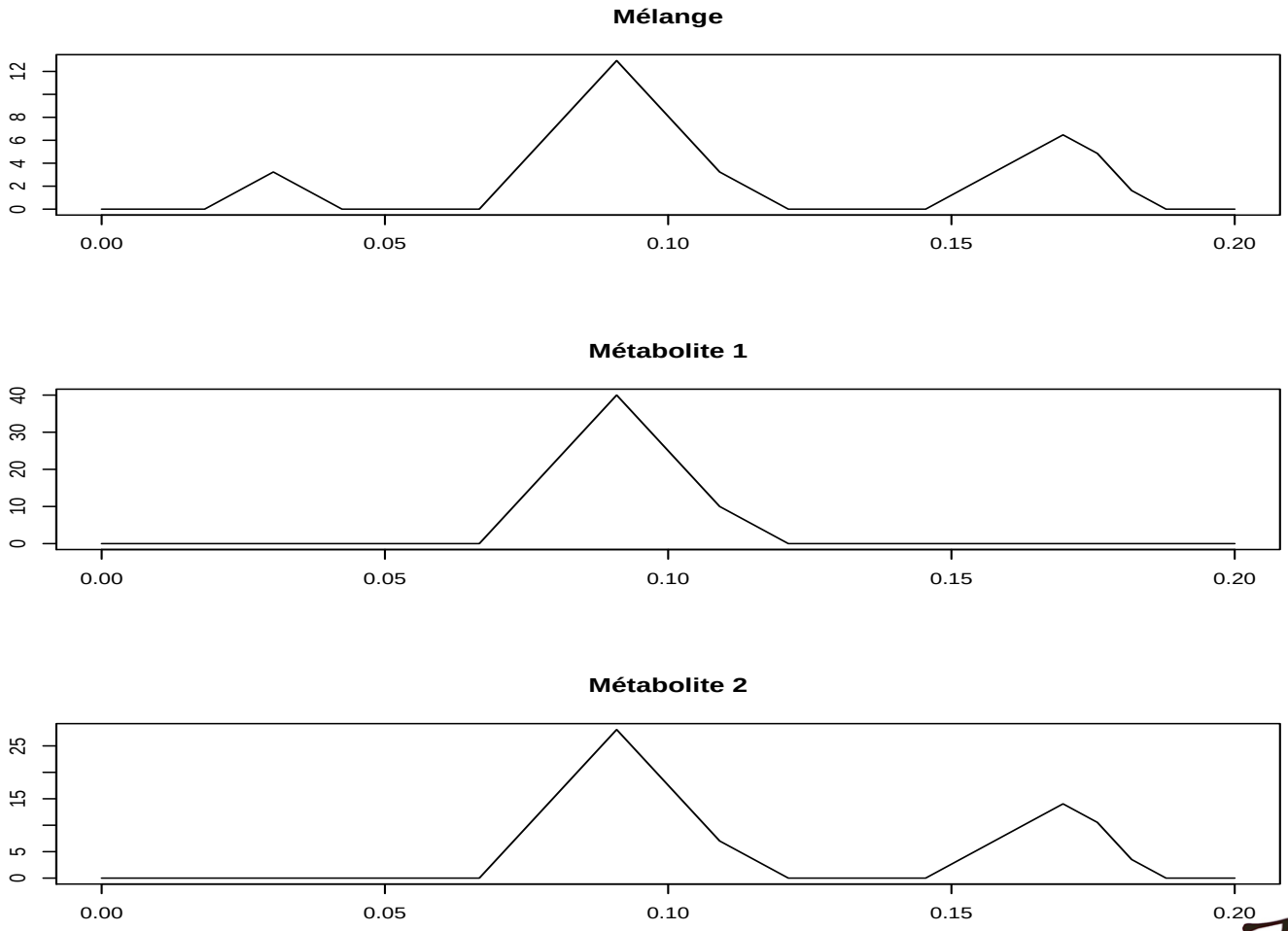
Cadre formel

- $\varphi \in \mathcal{F}$ ensemble des fonctions continues strictement croissantes sur $[a, b]$ qui valent a en a et b en b.
- On associe la fonction $g_\zeta(x) = x + \zeta x(1-x)$ au nombre $\zeta \in [-1, 1]$. On peut voir que $g_\zeta \in \mathcal{F}$.
- Considérons $\mathcal{A}_n = \{\varphi_{\zeta^n} = g_{\zeta_n} \circ \ldots \circ g_{\zeta_1}, \text{avec } \zeta^n = (\zeta_1, \ldots \zeta_n) \in [-1, 1]^n\}$ l'ensemble des polynômes obtenus en composant n fonctions $g_{\zeta_1}, \ldots, g_{\zeta_n}$. On a : $\mathcal{A}_1 \subset \ldots \subset \mathcal{A}_n \subset \mathcal{F}$.
- On estimera une fonction $\varphi \in \mathcal{F}$ par une fonction $\varphi_{\zeta^n} \in \mathcal{A}_n$.

Proposition

L'ensemble des fonctions A_n est dense pour $(F, ||.||_\infty)$.

Compétition



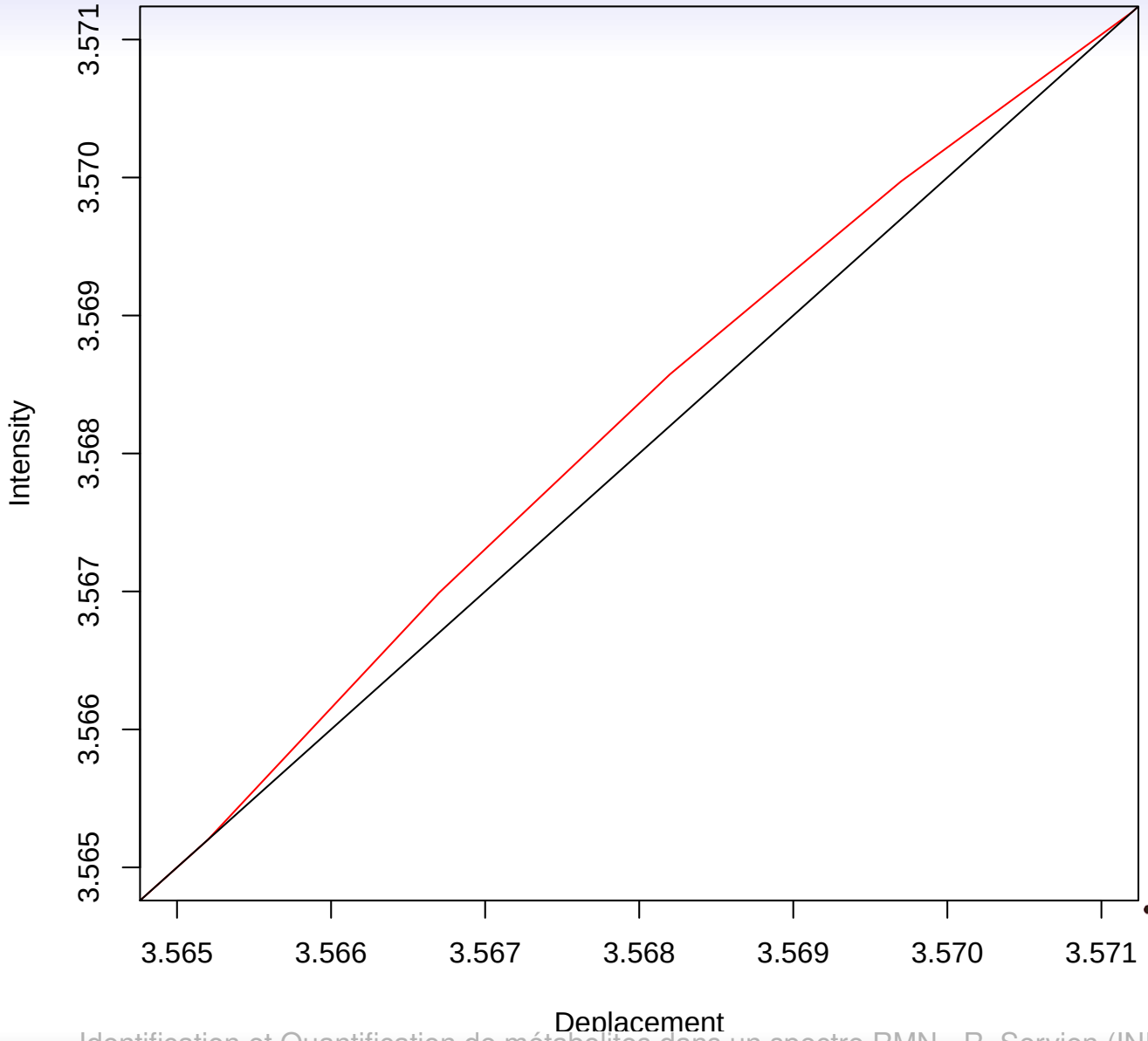
Calcul des $\hat{\hat{\alpha}}_i$

- On a obtenu $(\varphi_i^*)_{i=1,\dots,K}$ à l'étape précédente.
- $$\sum_{i=1}^{K} \alpha_i \text{ est maximum sous } \begin{cases} \sum_{i=1}^{K} \alpha_i & \leq 1 \\ Y(t) & \geq \sum_{i=1}^{K} \alpha_i Z_i \circ \varphi_i^*(t). \end{cases}$$
- Programmation linéaire.
- On obtient $\left(\hat{\hat{\alpha}}_i\right)_{i=1,\dots,K}$.

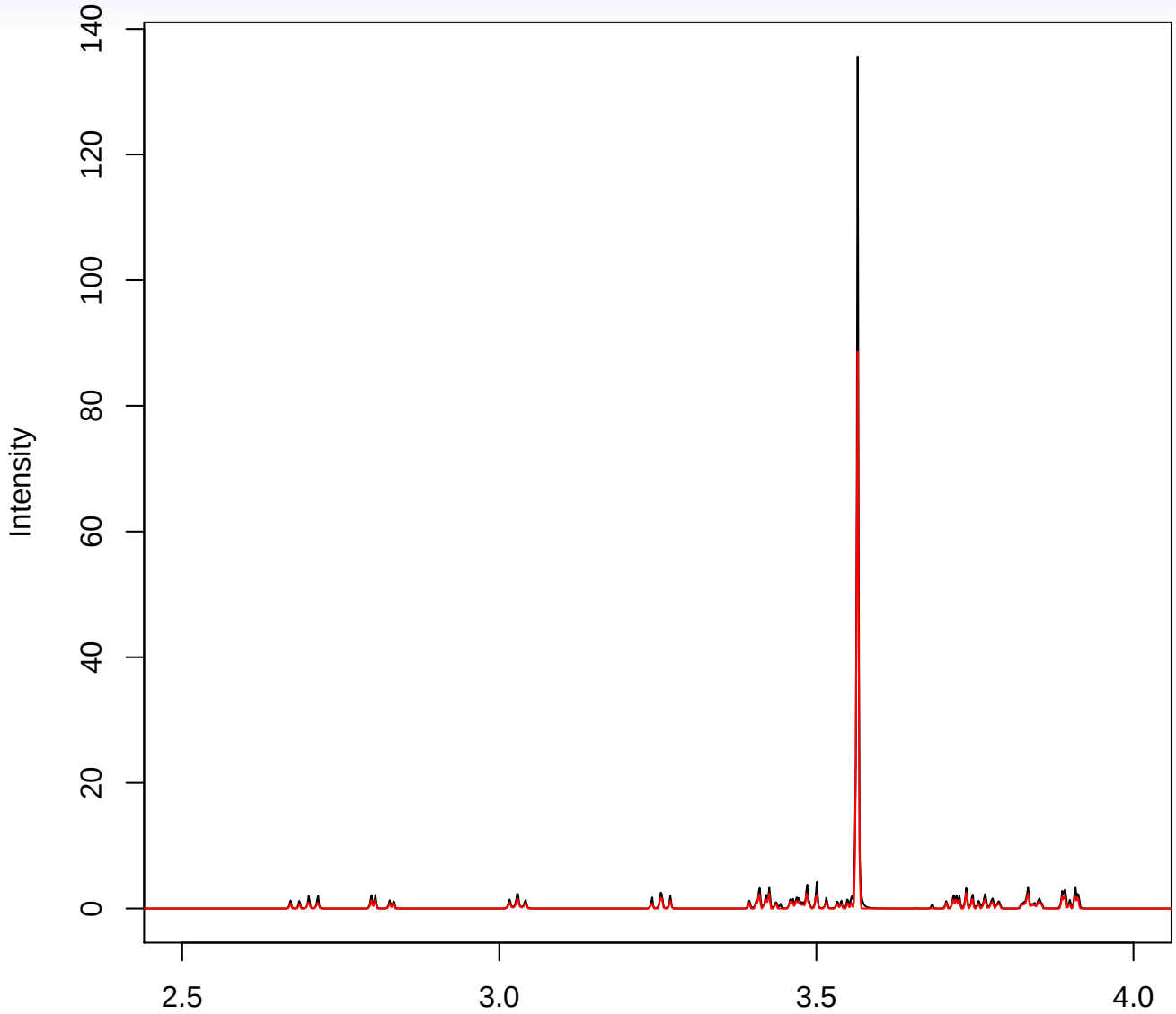
Programme

- Logiciel gratuit *R*.
- *source*(" *ProgTotal*.*r*")
- $a <- Total($" $STD2Melange - 1.002.txt$")
- Bibliothèque de 36 métabolites à tester $\approx$ 15 secondes.

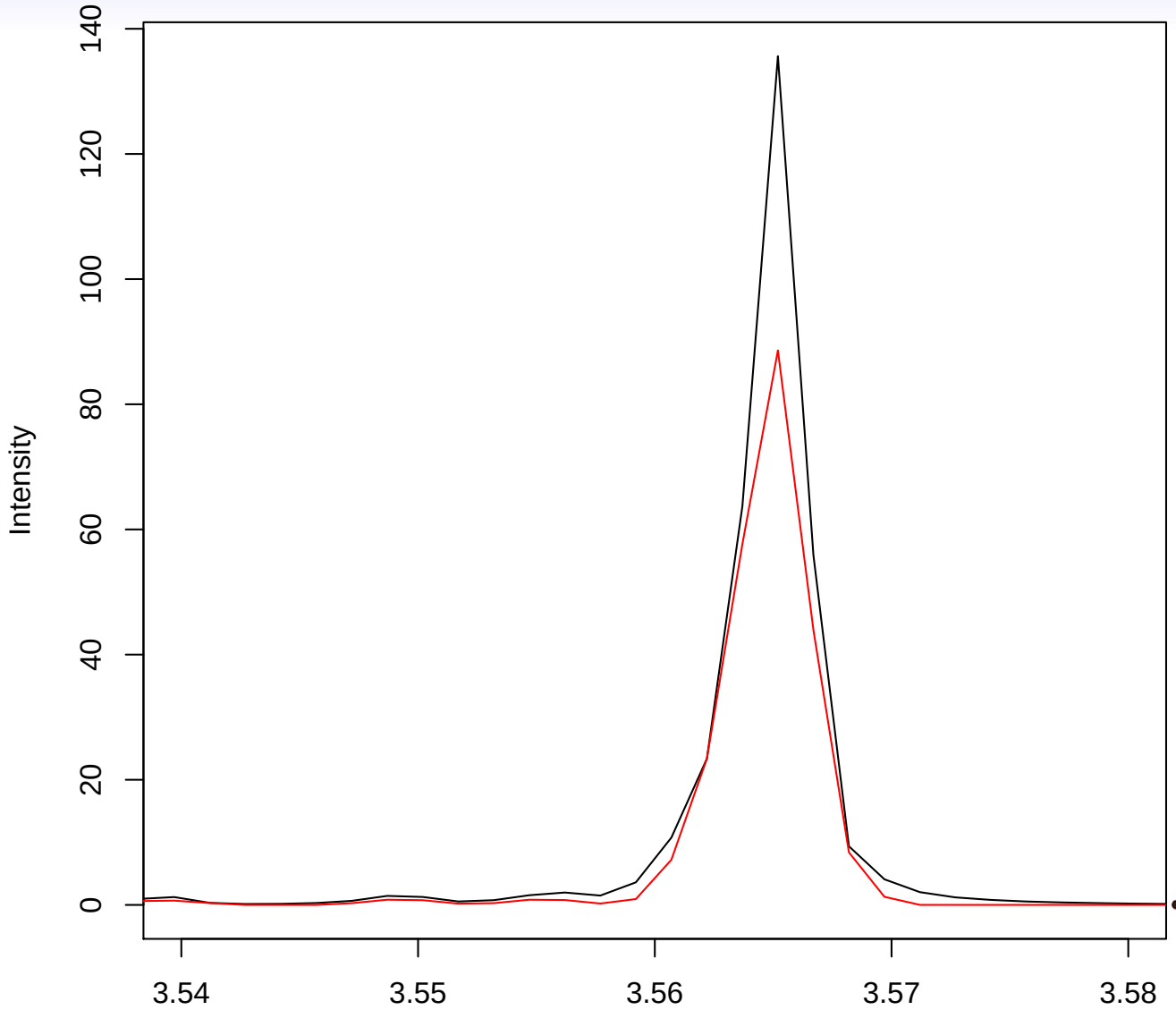
Exemple de Déformation



Reconstruction avec les $\left(\hat{\hat{\alpha}}_i\right)_{i=1,\ldots,K}$.



Reconstruction avec les $\left(\hat{\hat{\alpha}}_i\right)_{i=1,\ldots,K}$.



Résultats

- 32 absents du mélange, 4 présents.

Nom du Métabolite	Proportion Minimum	Proportion Maximum	Vraie Proportion
Glycine	0.694	0.694	0.76
Glucose	0.103	0.103	0.15
Lysine	0.024	0.026	0.02
Acide Aspartic	0.039	0.040	0.08

Perspectives

- Application :
  - Affiner la quantification.
  - Package R.
  - Validation de la méthode (plus de mélanges, matrices différentes, données extérieures ...)
- Théorie :
  - Définir des intervalles de confiance pour les proportions (prise en compte du bruit ...)
  - Etude de la loi de l'estimation par programmation linéaire (bord de l'espace paramétrique ...)
  - Introduction d'apprentissage.