

BayPass 2.3: tutoriel de génomique d'association adapté au séquençage en pool

Jérôme OLIVARES¹

2023-07-11

¹INRAE, UR-1115 PSH, 228 route de l'aérodrome, 84914 Avignon, France

Contents

Résumé	3
prérequis	3
Introduction	4
Présentation du logiciel BayPass 2.3	5
Présentation générale de l'analyse :	5
Données brutes	7
Obtention d'un fichier Poolseq.vcf :	7
Filtrage des données brutes	8
Conversion du pooldata en fichiers d'entrées pour BayPass	10
Design de l'analyse BayPass	10
Subsampling	11
Baypass : l'analyse poolseq	13
Annexes	15
Annexe 1	15
Références	18

Résumé

Ce tutoriel détaille d'une part la manière de générer les fichiers d'entrées du logiciel BayPass à partir de données de séquençage en pool, d'autre part le paramétrage optimal du logiciel BayPass et en fin propose une méthode d'exploration des résultats d'analyses produits. Un pipeline d'analyse mixant des packages sous Rstudio et des lignes de commandes Linux, est décrit afin de guider pas à pas l'utilisateur tout au long du processus depuis les données brutes jusqu'à la liste finale de loci/variants candidats. Ce tutoriel est à destination des étudiants et des bioinformaticiens débutants.

mots clefs

Logiciel BayPass, séquençage en pool, GWAS, études d'associations pangénomiques, Rstudio.

prérequis

Les commandes décrites dans cet article ont été regroupées dans un fichier au format « R markdown » (Rmd) « Poolseq_pipeline.Rmd » librement téléchargeable à l'adresse : <https://github.com/Jolivares-INRAE/Download>. Ce tutoriel est conçu pour décrire pas à pas les différentes étapes du fichier Rmd et permettre à l'utilisateur de les exécuter en parallèle. L'utilisateur devra avoir une connaissance basique du logiciel Rstudio et être capable d'écrire et lancer des scripts sur un cluster de calcul. Les commandes ont été rédigées sous Rstudio version 1.4.1106 couplé à R 64 bits version 4.0.5. avec toutes les librairies nécessaires à jour (Capture 1) et dans l'environnement bash/SLURM des clusters de calculs de la plateforme GenoToul de bioinformatique (GenoToul Bioinfo). Dans le cas d'une utilisation dans un autre environnement logiciel, l'utilisateur devra probablement effectuer des adaptations du code. Bien que l'essentiel des calculs de BayPass seront réalisés sur un cluster de calcul, certains de ses utilitaires seront utilisés en local sous Rstudio, la dernière version du logiciel sera donc téléchargée depuis l'adresse <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/baypass/download.html> et décompressée dans un répertoire local par l'utilisateur. Dans tous les codes qui suivent l'expression « ~/path/ » sera à remplacer par les chemins personnels de l'utilisateur. Le terme de chromosome sera utilisé en références aux appellations de contigs, scaffold, ou chromosomes qui correspondent aux séquences nucléotidiques du génome de référence, plus ou moins mature, qui sera utilisé.

Introduction

Dans un contexte agronomique actuel de réduction de l'utilisation des pesticides ou de réchauffement climatique, analyser et comprendre les bases génétiques de l'adaptation des organismes aux méthodes de lutttes qui leurs sont opposées ou à l'évolution de leur environnement est un enjeu majeur des recherches de ces dernières années.

Les études d'associations pangénomiques (GWAS en anglais pour genome-wide association study) adossées aux techniques de séquençage haut débit (NGS) permettant le séquençage de génome complet, sont un outil de choix pour ce type d'analyse. L'étude au niveau populationnel demandant le séquençage d'un grand nombre d'individus, les couts d'analyses étaient initialement très élevés et ces études étaient souvent réservées aux organismes dit "modèles", humain en tête. Néanmoins il a été démontré depuis, que le séquençage en pool d'individus (poolseq) c'est-à-dire en mélangeant de manière équimolaire l'ADN d'un grand nombre d'individus (50 à 100) issus d'une même population permettait non seulement de réduire drastiquement les couts puisqu'on ne réalise qu'un seul séquençage mais aussi que la découverte des points de mutations (SNP) et l'estimation de leur fréquence allélique étaient souvent plus efficaces et précises [Futschik and Schlötterer, 2010]. Parmi les logiciels à même d'analyser ces fréquences alléliques on compte Baypass [Gautier, 2015] qui évalue par une approche bayésienne, la différenciation des SNP en liaison avec une covariable environnementale en tenant compte de la structure et de la parenté entre les populations en estimant la covariance (Ω) des fréquences alléliques. Baypass 2.3 a la particularité supplémentaire de pouvoir calculer un contraste des fréquences alléliques entre deux groupes de populations caractérisés par un caractère binaire, sensible ou résistant par exemple.

La documentation disponible de BayPass 2.3 décrit par le menu les algorithmes de fonctionnement et les différents paramètres du logiciel mais reste néanmoins, et assez logiquement, succincte sur les étapes en amont et en aval. A ma connaissance un seul tutoriel est disponible sur le web [Nielsen, 2020] et décrit de manière plus détaillée la préparation des données brutes et l'analyse en mode « poolseq » de Baypass, mais il nécessite des bases quelque peu avancées de codage sous R et en environnement bash. Si les bio-informaticiens chevronnés ne rencontreront pas de difficultés particulières, il n'en va pas forcément de même pour bon nombre d'agents que les orientations des recherches associées à la baisse des coûts de séquençage ont aiguillé vers les voies de la génomique. Cet article a pour but de détailler les différentes étapes d'une analyse de type GWAS/poolseq avec le logiciel BayPass 2.3 et d'éclairer les points qui sont habituellement peu explicités car considérés comme évident et se veut, au final, le plus proche possible de la citation de Talleyrand : « Si cela va sans le dire, cela ira encore mieux en le disant ».

Présentation du logiciel BayPass 2.3

Le logiciel BayPass est un logiciel de génomique des populations qui vise principalement à l'identification de marqueurs génétiques soumis à la sélection et/ou associés à des covariables spécifiques à la population (variables environnementales, phénotypiques, quantitatives, catégorielles...). Par une approche bayésienne il évalue une **matrice Ω** de covariance des fréquences alléliques des populations résultant de leur histoire démographique. Deux manières d'estimer ces fréquences alléliques sont disponibles soit en se basant sur les génotypes référence/mutant des individus analysés soit, lorsque l'on active le « pool-seq mode », ces fréquences alléliques sont calculées en regard de la profondeur de séquençage (reads count) et pondérées par le nombre d'individus qui ont contribué à cette profondeur. C'est cette seconde approche que nous considérerons dans cet ouvrage.

BayPass propose 3 modèles statistiques d'analyse :

Le Core Model

C'est le modèle de base, il permet de calculer la matrice de covariance Ω et d'attribuer une statistique de différenciation XtX à chaque SNP, et ainsi de scanner le génome pour identifier les régions génomiques différenciées entre les populations. Le XtX est une statistique analogue au Fst mais tient compte de la co-évolution des populations grâce à la matrice Ω .

Le Standard Model

Ce modèle, permet, l'orsque l'on fournit une ou plusieurs covariables (environnementales, phénotypiques...), de calculer un facteur de Bayes, ou Bayes factor en anglais, (BF) pour chaque marqueur génétique représentant la force d'association avec une covariable. C'est un modèle tout en un qui intègre le calcul des XtX et de la matrice Ω , il est adapté au faible nombre de population (< 15).

L'Auxiliary Model

Ce modèle a une approche différente dans le calcul de la statistique BF, sans entrer dans le détail il est plus adapté au grand nombre de population (> 15), En contrepartie il nécessite que l'on fournisse une matrice Ω déjà calculée par une analyse Core Model précédente, il recalcule alors les XtX et la statistique BF.

Ces covariables évoquées doivent être distribuées en gradient entre les populations (différence de température, d'altitude...), en complément, dans le cas où la covariable étudiée serait purement qualitative ou binaire (sensible/résistant, gros/petit...), les modèles Standard et Auxiliaire peuvent calculer une statistique $C2$ qui évalue le contraste de différence des fréquences alléliques de chaque marqueur entre 2 groupes de populations.

Présentation générale de l'analyse :

La Figure 1 est une vision simplifiée des différentes étapes nécessaire à l'analyses de données poolseq. Les étapes nécessitant une importante puissance de calcul comme le variant calling ou l'analyse BayPass se déroulent soit dans l'environnement Linux du cluster de calcul, les étapes de filtrage,

manipulation de données et de résultats se font sur ordinateur local sous Rstudio. La première étape part des fichiers d'alignement au format « *bam* » de chaque population à analyser et consiste à effectuer une recherche de variants (variant calling) pour obtenir un fichier au format « **vcf* » regroupant tous les points de mutations ou SNP de toutes les populations qui sont autant de marqueurs génétiques à analyser. Ce fichier *vcf* sert d'entrée au package « PoolFstat » [Gautier et al., 2022] qui va permettre de filtrer les SNPs à analyser et générer les fichiers nécessaires au bon fonctionnement de BayPass mais aussi de faire une première analyse des Fst entre populations par exemple. Ces fichiers d'entrées pouvant contenir plusieurs millions de SNP, ils sont découpés en plusieurs dizaines de sous jeux de données (sub sampling) afin de réduire les temps de calculs. Une fois que BayPass a analysé tous les sous jeux de données, l'homogénéité des résultats entre eux est analysée sous Rstudio puis les résultats peuvent être regroupés, filtrés et analysés afin de déterminer les marqueurs génétiques et les régions chromosomiques d'intérêts qui seront visualisées par différents plots.

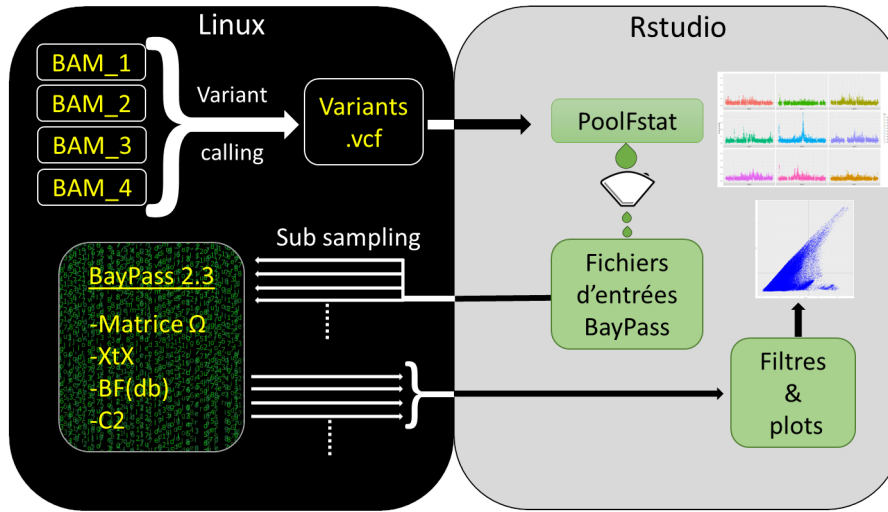


Figure 1: Pipeline d'analyse BayPass

Le pipeline d'analyse est décomposé en plusieurs étapes se déroulant soit en environnement Linux pour celles nécessitant une importante capacité de calcul, soit sous Rstudio pour le filtrage et l'analyse des résultats.

Données brutes

Obtention d'un fichier Poolseq.vcf :

Les étapes de contrôle qualité et d'alignement des données de séquençage sont largement documentées par ailleurs, et ne seront donc pas documentées ici, et nous partirons directement des fichiers d'alignement **bam**. La première étape consiste à regrouper les fichiers **bam** de toutes les populations en un seul fichier puis à effectuer le variant calling avec un logiciel dédié compatible avec le séquençage en pool afin de conserver les informations de profondeur. Nous recommandons l'utilisation des Samtools [Li et al., 2009] et de VarScan 2 [Koboldt et al., 2012] avec une instruction pipe entre les deux pour éviter les fichiers intermédiaires et économiser l'espace de travail (Script 0.1). Les commandes sont effectuées avec les paramètres de base, sauf la p-value qui est montée à 0.5 pour être le moins stringent possible à ce stade. On peut découper le travail en plusieurs chromosomes pour réduire les temps de calculs.

Script 0.1. Exemple d'un script bash pour effectuer un variant calling

Si l'on veut découper le travail en chromosomes, il est indispensable de travailler sur des fichiers bam correctement indexés et d'utiliser l'option -r/-region qui tire profit de cet index.

```
#!/bin/bash
#SBATCH --array=1-29                #création de l'array: un élément/indice par chromosome

module load bioinfo/samtools-1.12
module load bioinfo/VarScan-2.4.2
module load bioinfo/bcftools-1.14

ls ../*.bam > BamList.txt           #liste tous les fichiers ".bam"
ls ../*.bam | sed -r 's/^.+\\.bam/' | sed -r 's/.bam/' > NameList.txt      #extraire les noms des échantillons

samtools mpileup -C 50 -d 5000 -q 20 \
-r chr${SLURM_ARRAY_TASK_ID} \
-f ../ref_genome.fas -b ../BamList.txt | \
java -Xmx2G -jar $VARSCAN mpileup2cns \
--variants --min-coverage 10 \
--min-avg-qual 20 --min-var-freq 0.05 \
--p-value 0.5 --output-vcf 1 \
--vcf-sample-list NameList.txt > ../project_chr${SLURM_ARRAY_TASK_ID}.vcf

bgzip ../project_chr${SLURM_ARRAY_TASK_ID}.vcf
bcftools index ../project_chr${SLURM_ARRAY_TASK_ID}.vcf
```

A l'issue du variant calling les fichiers **vcf** des autosomes seront concaténés (Script 0.2), les chromosomes sexuels ayant une ségrégation, une histoire démographique et une ploïdie différente des autosomes il conviendra, lorsque cela est possible, de les analyser à part.

Script 0.2. Exemple d'un script bash pour concaténer des fichiers **vcf**

On peut utiliser les bcftools pour concaténer les fichier **vcf**, la liste des fichiers à traiter est contenue dans une variable alimentée par une boucle “for”.

```
#!/bin/bash
module load bioinfo/bcftools-1.14
Path='../'

# une boucle "for" itère sur les numéros des autosomes de 2 à 28 et ajoute chaque fichier vcf et son
for ((i=2; i<=28; i++))
do
    files+=" $Path/project_chr${i}.vcf.gz"
done

# bcftools concatène la liste des vcf contenu dans la variable $file
bcftools concat $files -O z -o $Path/project_chr2-28.vcf.gz
```

Filtrage des données brutes

Le fichier **vcf**, éventuellement compressé, est téléchargé sur un ordinateur local pour être analysé sous Rstudio. Dans un premier temps il faut charger les packages nécessaires et définir les chemins des différents dossiers qui seront utilisés (Chunk 0.1)

Chunk 0.1. Chargement des packages et chemins

```
library(poolfstat)      #filtrage du vcf et création des fichiers d'entrées BayPass
library(RColorBrewer)   #gestion couleur des heatmaps
library(mixOmics)       #"cim" pour heatmap
library(corrplot)       #matrice de corrélation pour heat map
library(VennDiagram)    #création de diagramme de Venn
library(nVennR)         #extraction de données d'un diagramme de Venn
library(tidyverse)      #manipulation de données et plots (ggplot2)

path_vcf <- "C:/BayPass/vcf/"
path_input <- "C:/BayPass/Input/"
path_out <- "C:/BayPass/Output/"
path_res <- "C:/BayPass/Resultats/"
```

Le filtrage du **vcf** et la sélection des SNPs à analyser ce fait à l'aide du package PoolFstat (Chunk 0.2). Dans un premier temps il faut renseigner les noms des populations dans un objet **pnames** et les tailles haploïdes de chaque population dans un objet **psizes**. Pour les organismes diploïdes, le nombre total de copies des autosomes sera deux fois le nombre d'individus dans le pool, pour les gonosomes Y ou W la ploïdie sera égale au nombre d'individus XY/ZW et pour les gonosomes X ou Z le calcul sera (nombre de XX/ZZ * 2) + (nombre de XY/ZW * 1). La fonction **vcf2poodata** va balayer le fichier **vcf**, sélectionner les SNP bi-alléliques selon des critères définis par l'utilisateur et créer un objet **pooldata**.

Chunk 0.2. Filtrage et sélection des SNPs

Les options à renseigner sont: min.rc = minimum de reads qu'un allèle doit avoir pour être retenu. min.cov.per.pool = Si au moins un pool n'est pas couvert par au moins au moins min.cov.perpool reads, le SNP est rejeté. max.cov.per.pool = Si au moins un pool est couvert par plus de que max.cov.perpool reads, le SNP est rejeté. min.maf = fréquence allélique minimale autorisée pour l'allèle minoritaire pour qu'un SNP soit retenu.

```
#Infos sur les pops
pnames <- as.character(c('pop01', 'pop02', 'pop03', 'pop04', 'pop05', 'pop06', 'pop07', 'pop08', 'pop09', 'pop10'))
psizes_A <- as.numeric(c('150', '180', '24', '114', '180', '44', '180', '160', '200', '74', '80', '52'))
```



```
psizes_X <- as.numeric(c('120', '135', '16', '86', '135', '30','135', '120', '150', '60', '63', '42',
psizes_Y <- as.numeric(c('30', '45', '8', '28', '45', '14','45', '40', '50', '14', '17', '10', '19'))
#conversion du .vcf
pooldata <- vcf2pooldata(vcf.file = paste(path_vcf, "project_chr2-28.vcf.gz", sep=""), poolsizes = ps

## Reading Header lines
## VarScan like format detected for allele count data:
## the AD field contains allele depth
## for the alternate allele and RD field for the reference allele
## (N.B., positions with more than one alternate allele will be ignored)
## Parsing allele counts
## 107526 lines processed in 0 h 0 m 3 s : 19529 SNPs found
## Data consists of 19529 SNPs for 13 Pools

#élimine le 1% supérieur considéré comme trop fortement couvert (région très dupliquée, biais de séq
pooldata<-pooldata.subset(pooldata, cov.qthres.per.pool = c(0,0.99))
```

```
## Data consists of 19276 SNPs for 13 Pools
```

A ce stade cet objet ***pooldata*** peut être utilisé pour calculer diverses statistiques couramment utilisées dans les études de génomique des populations, un exemple d'estimation de la structure génétique des populations déduite des F_{st} est donné en [Annexe 1](#)

Conversion du pooldata en fichiers d'entrées pour BayPass

La fonction *pooldata2genobaypass* convertit l'objet *pooldata* en fichier d'entrée pour BayPass:

```
pooldata2genobaypass(pooldata, writing.dir = path_input, subsamplesize = -1, subsamplingmethod = "thi
```

```
## x being coerced from class: matrix to data.table
```

On récupère dans le répertoire *path_input* trois fichiers: un fichier “*genobaypass*” qui contient les données filtrées de génotypage, un fichier “*snpdet*” qui contient la liste des positions correspondantes et un fichier “*poolsize*”, qui est une copie de l'objet *psizes*.

Design de l'analyse BayPass

Deux fichiers de paramétrages au format texte/tabulation peuvent être créés en fonction de l'analyse envisagé: Le premier fichier “*ecotype*” (Table 0.1) identifie les covariables quantitatives écologiques de chaque population, avec une covariable par ligne et autant de lignes que de covariables à analyser. Seules sont acceptées les valeurs numériques graduées (taille, poids, mortalité ...).

Table 0.1. Exemple de constitution d'un fichier *ecotype*

Chaque ligne correspond à une covariable quantitative, chaque colonne correspond à une population.

25
48.5
96.2
17
15.3
...
4.75
0.53
0.27
-0.86
-0.61
...
43.90
44.37
44.29

47.36

47.86

...

Le deuxième fichier ***contraste*** (Table 0.2) contient les covariables qualitatives (petit, chaud, résistant...), il permet d'identifier l'appartenance de chaque population à un groupe qualitatif soit référence (-1), un groupe candidat (1) ou aucun des deux groupes (0). Une ligne par combinaison de contraste.

Table 0.2. Exemple de constitution d'un fichier ***contraste***

Chaque ligne correspond à une analyse binaire de comparaison des fréquences alléliques de 2 groupes de population. Sur la ligne 1 le groupe composé des population 1 et 2 est comparé au groupe des populations 3,4 et 5. Sur la ligne 2 le groupe composé des population 1 et 2 est comparé au groupe des populations 4 et 5, la population 3 est exclue de l'analyse. Etc...

1

1

-1

-1

-1

...

1

1

0

-1

-1

...

0

1

-1

-1

0

...

Ces fichiers seront aussi transférés sur le cluster de calcul.

IMPORTANT : Les analyses BayPass sont relativement longues (plusieurs heures) mais l'analyses conjointes de plusieurs covariables a un impact relativement faible sur le temps de calcul final, dès lors il est très rentable de multiplier les analyses de covariables en ajoutant autant de lignes que nécessaires dans ces fichiers de paramétrages plutôt que de relancer une analyse complète pour chacune d'entre elles.

Subsampling

Copier les fichiers ***genobaypass***, ***snpdet***, ***poolsize***, ***contraste***, ***ecotype*** sur le cluster de calcul. La découpe en sous jeux de données des fichier genobaypass et snpdet se fait sous Bash avec une commande sed par exemple (Script 0.3).

Script 0.3. Exemple d'une commande de subsampling.

La commande **sed** prélève une ligne toutes les 100 et les copie dans un fichier **.sub** et s'exécute 100 fois pour ballayer tous le fichier initial et créer ainsi 100 fichiers de sous-jeux de données.

```
for i in {1..100}; do sed -n "$i~100p" genobaypass > genobaypass.sub$i; sed -n "$i~100p" snpdet > snp
```

Le nombre de fichiers **.sub** à créer dépend du nombre total de SNP à analyser, une taille finale de 80 000 à 120 000 SNPs par fichier de sous-jeux de données est un bon compromis entre qualité d'analyse et temps de calcul.

Baypass : l'analyse poolseq

La commande est la même pour les différents modèles employés par BayPass (Script 0.4), ce sont les fichiers optionnels qui définissent le modèle : Pour le core model, seuls les fichiers genobaypass et snpdet sont nécessaires, on peut néanmoins faire une analyse de la statistique de contraste C2 avec le fichier de covariable qualitative *contraste*. Le standard model est activé par l'option *-efile* et le fichier de covariable quantitative *ecotype*

, l'option *-efile* pour le covariate model et l'option *poolsize* pour activer le mode Pool-Seq. Un exemple de script d'analyse de type Pool-Seq, parallélisée sur 25 CPU est disponible à l'adresse suivante: https://github.com/Jolivares-INRAE/Download/tree/BayPass_pipeline

Il est recommandé dans le cadre d'une analyse Pool-Seq d'utiliser et fixer le paramètre *-d0yij* à 1/5e de la valeur la plus faible du *poolsize*. (voir page 22 et 39 du manuel de BayPass). Tous les fichiers de résultats cibleront le dossier dans lequel se trouve le script.

Script 0.4. Exemple d'un script bash pour lancer une analyse BayPass

Les sous-jeux de données sont analysés en parallèle

```
#!/bin/bash
#SBATCH --array=0-99          #création de l'array: un élément/indice par job prévu (indice base 0)
#SBATCH --cpus-per-task=2     #nbr de core par job
#SBATCH --mem-per-cpu=2G      #mémoire partagée par tous les cores

module load system/R-3.4.3
module load bioinfo/baypass_2.3
module load compiler/intel-2018.0.128
module load mpi/openmpi-1.8.8-intel2018.0.128
module load compiler/gcc-9.3.0

Path='/BayPass/Input'
FILES_R1=$(ls $Path/genobaypass.sub* | sed -r 's/^.+\\///'))
INPUT_F1=${FILES_R1[$SLURM_ARRAY_TASK_ID]}
OUTPUT=${FILES_R1[$SLURM_ARRAY_TASK_ID]/genobaypass/project.output}

i_baypass \
-gfile $Path/$INPUT_F1 \           #fichiers genobaypass.sub*
-poolsizefile $Path/poolsize \    #active le mode poolseq
-d0yij 40 \                       #1/5e de la valeur la plus faible du poolsize
-seed 5001 \
-nthreads 2 \
-outprefix $OUTPUT \
```

Pour le modèle standard, il faut rajouter au script précédent le fichier contenant les covariables quantitatives et l'option *scalecov*

```
-efile $Path/ecotype \           #calcul des Bayes Factors: modèle standard & auxiliaire
-scalecov \                     #re-scale les covariables quantitatives
-contrastfile $Path/contrast \  #calcul du contraste C2: modèle core, standard & auxiliaire
```

Pour activer le modèle auxiliaire il faut ajouter l'

```
-auxmodel \                               #active le modèle auxiliaire  
-omegafile $Path/omega.mat \             #matrice  $\Omega$  modèle standard (optionnel) & auxiliaire (obligatoire)  
-auxPbetaprior 0.02 1.98                 #ajuste le  $Pi$  beta prior
```

c

Annexes

Annexe 1

Le package R *poolfstat* peut être utilisé pour calculer diverses statistiques utilisées dans les études de génomique des populations, ces outils sont décrits et exemplifiés dans la vignette de *poolfstat* : (<https://cran.r-project.org/web/packages/poolfstat/vignettes/vignette.pdf>), parmi ceux-ci on trouve l'analyse des Fst.

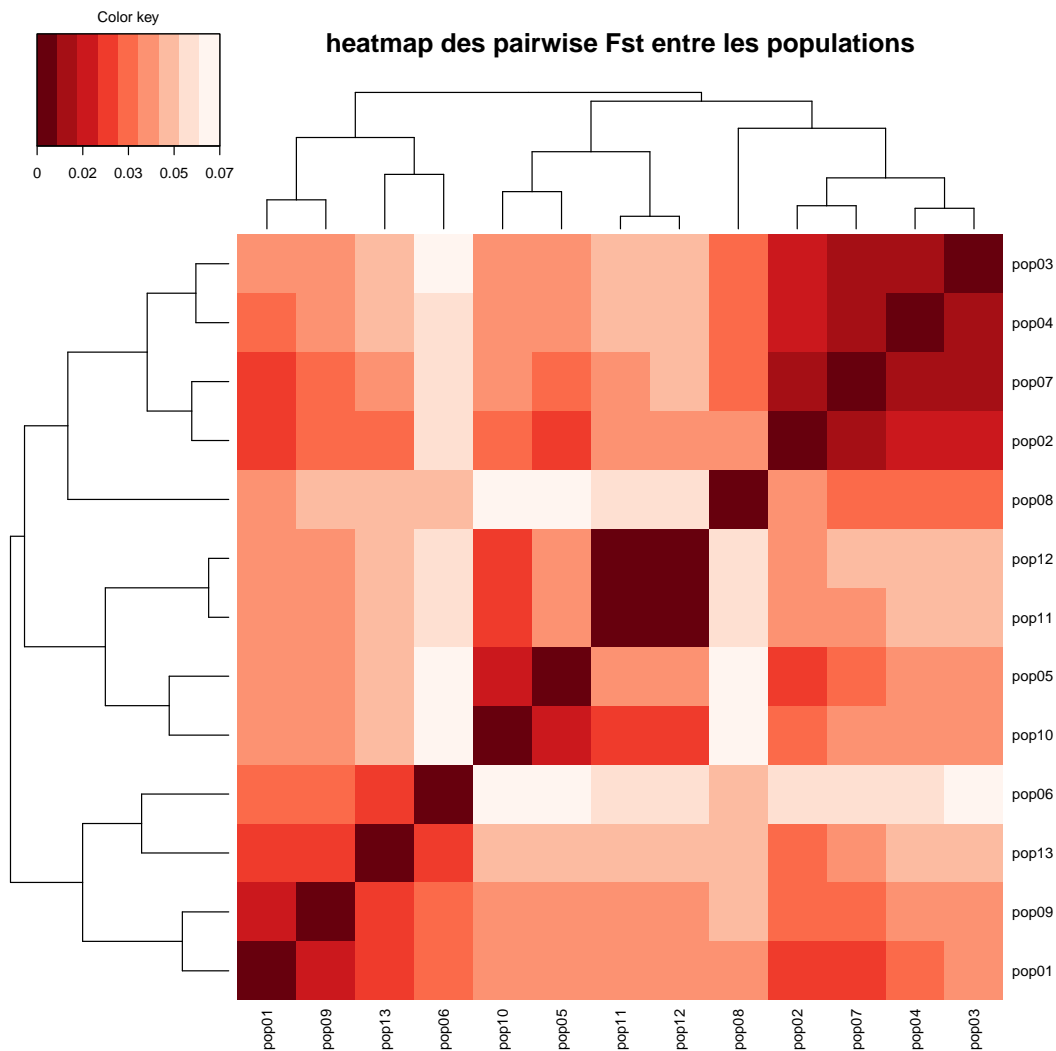
Pairwise

Calcul des Fst entre les populations deux à deux (pairwise) afin de visualiser la proximité génétique entre populations.

```
#Calcul des pairwise Fst  
PairWise.fst <- compute.pairwiseFST(pooldata, method = "Anova", min.cov.per.pool = 4, max.cov.per.pool = 10)
```

```
## Computation of the 78 pairwise Fst  
##  
## Overall Analysis Time: 0 h 0 m 1 s
```

```
#conversion en matrice de distance  
df <- as.matrix(dist(t(PairWise.fst@PairwiseFSTmatrix)))  
#heatmap  
cim_color <- colorRampPalette(rev(brewer.pal(9, "Reds")))(9)  
cim(df, color = cim_color, symkey = FALSE, margins = c(10, 10), title = "heatmap des pairwise Fst en fonction de la distance")
```



On peut aussi calculer et plotter des Fst multi-locus en balayant le génome avec une fenêtre glissante de SNP consécutifs et un chevauchement d'une demi fenêtre, une région génomique très différenciée apparaîtra sous la forme d'une éruption de points colorés.

Fst en fenêtre glissante

```
#calcul des Fst avec une fenêtre glissante de 100 SNP consécutifs .
Multi.Loc.fst <- computeFST(pooldata, method = "Anova", sliding.window.size = 100)
```

```
## Start sliding-window scan
## 1 chromosomes scanned (with more than 100 SNPs)
##
## Average (min-max) Window Sizes 28 ( 1.7 - 865.6 ) kb
```

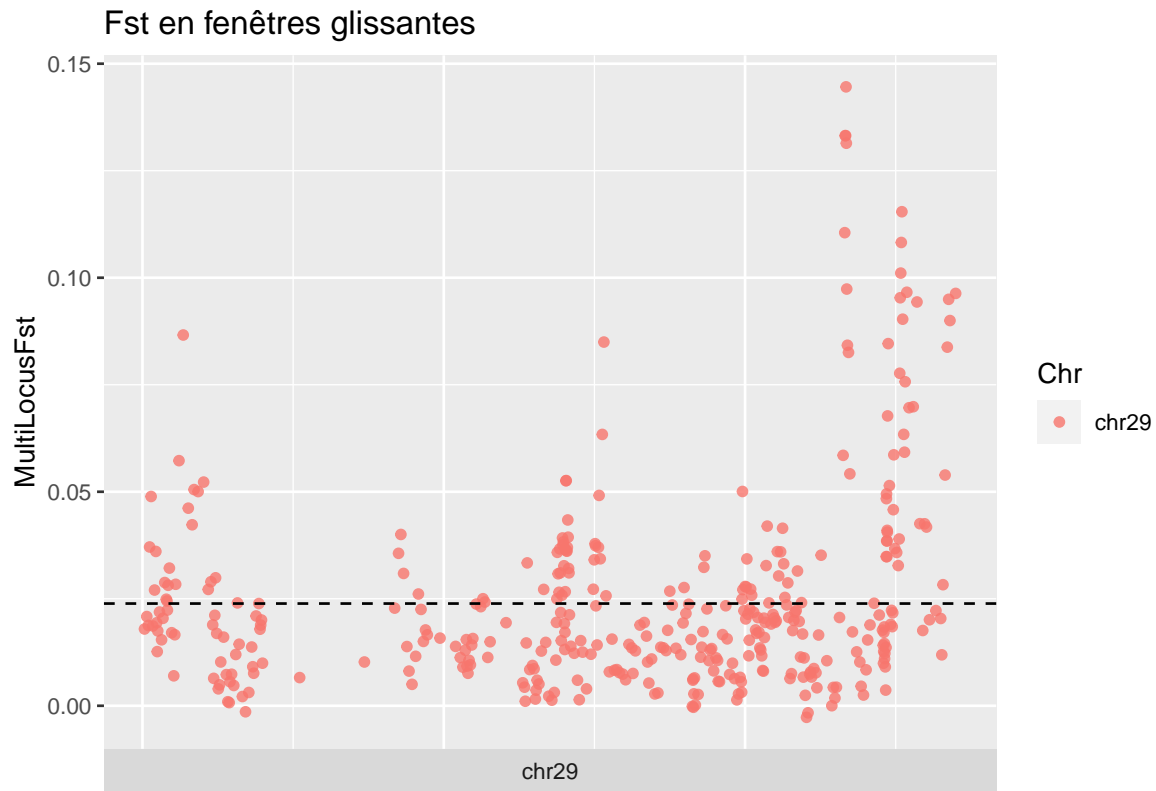
```
#conversion en objet data frame
df.fst<-as.data.frame(Multi.Loc.fst$sliding.windows.fst, h=T)
#plot.
Fst.plot = ggplot(data=df.fst, aes(x=CumulatedPosition/1e6, y=MultiLocusFst)) +
  geom_point(aes(color=Chr), alpha=0.8, size=1.5) +
```



```

ggtitle("Fst en fenêtres glissantes") +
geom_hline(yintercept=Multi.Loc.fst$FST,lty=2) #le seuil indique la Fst globale estimée à l'échelle
Fst.plot + scale_x_continuous() + scale_y_continuous() +
theme(axis.title.x=element_blank(), axis.text.x=element_blank(), axis.ticks.x=element_blank()) +
facet_wrap(~Chr, scales = 'free_x', strip.position = c("bottom")) #affichage des chromosomes en grille

```



Références

Bibliography

- Andreas Futschik and Christian Schlötterer. The Next Generation of Molecular Markers From Massively Parallel Sequencing of Pooled DNA Samples. *Genetics*, 186(1):207–218, September 2010. ISSN 1943-2631. doi: 10.1534/genetics.110.114397. URL <https://academic.oup.com/genetics/article/186/1/207/6063740>.
- Mathieu Gautier. Genome-Wide Scan for Adaptive Divergence and Association with Population-Specific Covariates. *Genetics*, 201(4):1555–1579, December 2015. ISSN 1943-2631. doi: 10.1534/genetics.115.181453.
- Mathieu Gautier, Renaud Vitalis, Laurence Flori, and Arnaud Estoup. f-statistics estimation and admixture graph construction with Pool-Seq or allele count data using the R package poolfstat. 2022.
- Daniel C. Koboldt, Qunyuanyuan Zhang, David E. Larson, Dong Shen, Michael D. McLellan, Ling Lin, Christopher A. Miller, Elaine R. Mardis, Li Ding, and Richard K. Wilson. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, 22(3):568–576, March 2012. ISSN 1088-9051. doi: 10.1101/gr.129684.111. URL <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.129684.111>.
- Heng Li, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, Richard Durbin, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16):2078–2079, August 2009. ISSN 1367-4811, 1367-4803. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352. URL <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/25/16/2078/204688>.
- Erica S. Nielsen. Pool-Seq Analyses: PoolFstat & BayPass, 2020. URL <https://esnielsen.github.io/post/pool-seq-analyses-poolfstat-baypass/>.