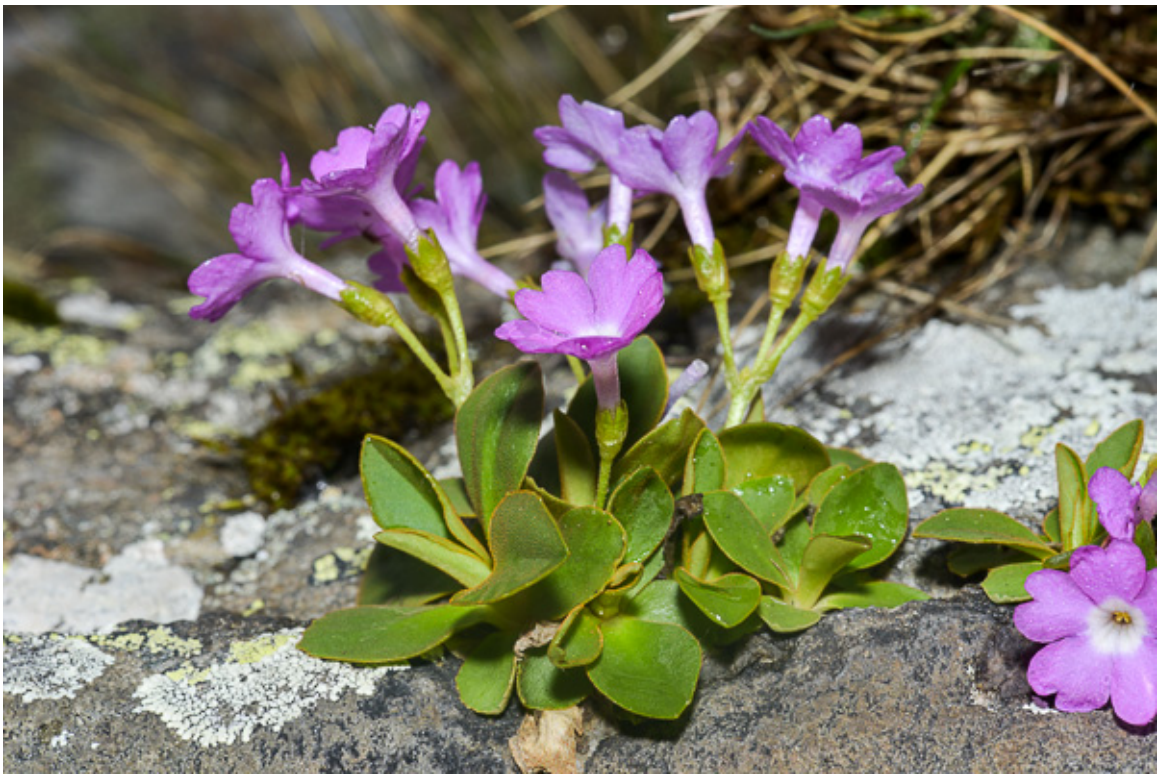
Délimitation d'espèces au sein du complexe de plantes des Alpes, *Primula pedemontana s.l.*

Maxime Jaunatre, Master 1 BEE Grenoble

1 Avril - 31 Mai 2019 — Soutenance : juin 2019

Enseignant référent :	**Tuteur de stage :**	**Équipe :**
Éric Coissac	Florian Boucher	DivAdapt



Primula pedemontana Crédit photo : Florian Boucher

Résumé

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetuer adipiscing elit. Ut purus elit, vestibulum ut, placerat ac, adipiscing vitae, felis. Curabitur dictum gravida mauris. Nam arcu libero, nonummy eget, consectetuer id, vulputate a, magna. Donec vehicula augue eu neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Mauris ut leo. Cras viverra metus rhoncus sem. Nulla et lectus vestibulum urna fringilla ultrices. Phasellus eu tellus sit amet tortor gravida placerat. Integer sapien est, iaculis in, pretium quis, viverra ac, nunc. Praesent eget sem vel leo ultrices bibendum. Aenean faucibus. Morbi dolor nulla, malesuada eu, pulvinar at, mollis ac, nulla. Curabitur auctor semper nulla. Donec varius orci eget risus. Duis nibh mi, congue eu, accumsan eleifend, sagittis quis, diam. Duis eget orci sit amet orci dignissim rutrum.

Table des matières

1 Introduction

Par la diversité des milieux qu'elle abrite, la chaîne des Alpes est une zone géographique propice à une grande biodiversité. Cet ensemble de massifs et de vallées constitue donc un laboratoire parfait pour étudier l'évolution des organismes dont les aires de répartitions semblent aisément observables. Cependant, l'histoire de cette orogénèse et les différents cycles glaciaires qui ont joué sur l'Holarctic complexifient énormément ces histoires biologiques. Ainsi, l'isolement géographique propice aux spéciations, ou encore l'adaptation à de nouvelles niches écologiques se sont trouvés modifiés de nombreuses fois par ces facteurs abiotiques. Ces nombreuses modifications ont aboutis à un état actuel de biodiversité où il est difficile de séparer ces ensembles de mécanismes, et conclure à une histoire biogéographique simple. En conséquence, on observe nombre d'espèces cryptiques, ou d'entités taxonomiques définies sur des critères évoluant rapidement dans la littérature.

Dans le cadre de cette étude, il est donc proposé d'approfondir l'étude de la structure génétique d'un groupe de plantes d'altitude : Primula sect. Auricula Scott subsect. Erythrodrosum Pax (ci-dessous, clade *Hirsuta*). Récement étudié génétiquement (Boucher *et al.* , 2016, Zhang & Kadereit, 2004, Zhang *et al.* , 2004), cette sous-section a été restructuré en s'appuyant sur des données génétiques. Cependant la dernière étude de Boucher *et al.* (2016) suggèrent qu'un ensemble d'espèce (*P. apennina, P.cottia, P.pedemontana*) soient regroupées en une seule entité taxonomique. Cette proposition vient également soulever l'hypothèse d'une nouvelle sous-espèce dans le massif des Écrins, qui pourrais être un hybride entre *P. hirsuta* et *P. pedemontana*.

Les buts de cette étude sont donc : (i) étudier la sous-section à l'aide d'outils de génétique des populations ; (ii) clarifier la structure de l'entité taxonomique regroupant les espèces *P. apennina, P. cottia et P. pedemontana* ; (iii) étudier l'hypothèse d'hybridation/introgression du taxon des Écrins.

To check

2 Matériels et méthodes

2.1 Échantillonnage

Les données génétiques utilisés lors de cette étude ont été produite dans le cadre de l'étude précédente de Boucher *et al.* (2016). Il s'agit d'un jeu de donnée composé de 90 individus des

espèces composant la section *Auricula*, au sein du genre *Primula*. Ces individus ont été prélevés à travers les Alpes entre avril et septembre 2014. L'identification taxonomique des individus a été réalisé sur le terrain, mais un individu a du être réattribué après analyse génétique au taxon *P. hirsuta*.

Les SNPs sont issus de séquençage haut débit via hyRAD (Suchan *et al.* , 2016). Le génome de référence proviens de *Primula veris*. Cette technique permet de génotyper le long du génome malgré des mutations sur les sites de restrictions. En effet les enzymes de restrictions sont trop sensibles à la mutation d'un nucléotide, tandis que les sondes ARN peuvent s'hybrider sur des sites plus nombreux sur le génome. La nécessité de capturer des sites malgré une faible variation provient du niveau interspécifique de l'étude, qui pose l'hypothèse que les mutations peuvent se placer sur les sites de restrictions et ainsi limiter leur capture par simple séquençage ddRAD.

2.2 Bioinformatique

Pour chacun des individus, l'information consiste en une séquence de SNPs appellés par Freebayes, exporté sous format VCF. Les analyses ont été porté sur deux jeux de données différents car filtrés sous des seuils différents. Le premier jeu de donnée (`'m30_-q20_mincov20'`) est issus de filtres très strict, avec un score de qualité (Phred) requis de 30 et une couverture minimale de 20 lectures par site. Afin de ne pas biaiser l'analyse par des seuils favorisant les régions conservées, le second jeu de données (`'m13_-q20_mincov10'`) est quant à lui produit avec un Phred minimal de 13 et une couverture de 10 lectures. A partir de ces séquences, les SNPs ont été isolés par Freebayes, avec un score de Phred minimal de 20 et un support de lecture de 30% minimum par allèle.

A partir des deux jeux de donnée initiaux, un pipeline est établis pour générer divers ensembles de données. Cette automatisation a permit entre autre de pouvoir évaluer l'effet des seuils posés au fur et à mesure de l'analyse. Les fonctions sont rassemblées en un package R hébergé sur Github (lien web 1) Dans un premier temps, le fichier initial est traité sous Rstudio (R.Team, 2017), avec la fonction `subset_reorder`, qui permet de reconstruire le fichier en ne gardant que les individus souhaité dans l'ordre indiqué. La fonction suivante `rare`, permet de trier les allèles considérés comme étant présents dans un trop faible pourcentage des individus. Ces allèles rares sont écartés du jeu de donnée et le loci pour l'individu présentant cet allèle rare est considéré comme une donnée manquante. Cette étape permet également de supprimer les lectures avec de multiples allèles variants qui sont reconnus comme des artefacts des algo-

rithmes utilisés pour appeler les SNP. Suite aux deux tris précédents, il y a donc des loci pour lesquels tout les individus portent la même information. Afin de ne garder que les loci polymorphiques, une fonction `clean` est donc appelée à la fin de la fonction `rare`, pour supprimer les locis monomorphiques. Les loci sont aussi filtré sur le score de qualité (`QUAL`) indiqué dans le vcf, qui correspond a la confiance dans l'assignation de l'allèle variant. Une fonction de `tri` est appelé pour supprimer les loci puis individus présentant trop de données manquantes selon les seuils posés. Enfin, afin de limiter le déséquilibre de liaisons, les sites sont filtrés selon leurs positions sur les contigs, où une distance minimale `n` doit être prise en compte entre deux sites d'un même contig pour que le second site soit conservé.

Afin de pouvoir utiliser les fichiers triés sous divers format, la sous-sélection d'individus et de loci est enregistrée sous quatre formats : `.vcf`, `.str`, `.geno`, `.snp`. La transformation d'un format en un autre se fait respectivement au moyen d'un script bash, par l'utilisation du software PGDSpider (Lischer & Excoffier, 2012), le package LEA (Frichot & François, 2015) et un script R. La production de ces fichiers est inscrite dans le pipeline par la fonction `files`.

L'ensemble de ces fonctions sont indépendantes mais peuvent être appelées dans le bon ordre au moyen de la fonction `dataset`, qui prend en entrée un vecteur de noms d'individus, un `csv` contenant les assignations aux populations, le fichier `vcf` original, le nom des fichiers de sortie et les seuils précisés au-dessus.

Chaque seuil est choisis après vérification que la décision n'impacte que peu les résultats de diversité génétique. Le nombre d'individus étant faible, il faut optimiser le nombre de SNPs par individus car cela permet de limiter la perte d'information et d'atteindre les mêmes résultats qu'attendus avec un échantillon plus vaste. (Nazareno *et al.* , 2017)

2.3 Génétique des populations

Les analyses de génétique des populations ont été réalisés sous Rstudio (R.Team, 2017) avec différents packages.

Dans un premier temps, des statistiques F sont calculées avec le package adegenet (Jombart & Ahmed, 2011). Ces statistiques permettent de se faire une première idée du jeu de donnée. Ce package permet également de réaliser un analyse en composante principale discriminante. Cependant un clustering de nos individus a été réalisé avant, afin d'essayer d'attribuer des groupes sans a-priori de populations. Ce clustering fait par adegenet trouve les groupes pour lesquels la variance intergroupes est maximale quand la variance intragroupes est minimale. La DAPC a

donc été réalisée avec ces groupes et sans afin d'observer les différences.

La structure des populations de nos taxons a ensuite été étudié par le package LEA (Frichot & François, 2015). Ce package permet une implémentation dans R des analyses auparavant menées par le logiciel STRUCTURE. Pour cette étude, la structuration a été modélisée pour des structure de K populations allant de 1 à 15, avec 20 simulations par K, en ne retenant que la meilleurs simulation basée sur le critère de "cross-entropy

Concernant l'hypothèse d'hybridation pour le taxon des Écrins, le package introgress (Gompert & Alex Buerkle, 2010) a été utilisé pour mesurer l'index h, index d'hybridation, entre deux taxons. Ce package requiert l'import des deux taxons parents présumés et des hybrides afin de mesurer un coefficient d'admixture (ou h-index). Ce coefficient basé sur une fonction de vraisemblance (Buerkle, 2005), où la proportion de chaque génome parental est mesurée dans l'individu hybride. Les marqueurs codominants utilisés ici n'étant pas fixés, le calcul du h-index se basera ici sur les fréquences alléliques.

To do

2.4 Inférences bayesiennes

Afin de caractériser l'admixture probable entre le taxon des Écrins et *P. hirsuta*, une approche par approximate Bayesian computation (ABC) a été réalisée sur le logiciel DIYABC (Cornuet *et al.* , 2014). Ce logiciel permet de simuler des jeux de données selon divers scénarios, en échantillonnant des paramètres entre des priors définis. Les scénarios sont ensuite classés selon les probabilités a posteriori d'observer notre jeu de donnée initial selon les scénarios proposés. Seuls quelques scénarios ont été étudiés ici, en prenant en compte le fait qu'ils sont à chaque fois supportés par peu d'individus. Les priors sont également proposés dans un grand intervalle et selon une distribution uniforme, les temps de divergence entre populations et taille de population n'ayant pas été étudiés sur le terrain.

To do

2.5 Admixture -ABBA-BABA-

Une autre approche de l'admixture entre plusieurs taxons du complexe de populations étudié est réalisé par le test "`ABBA-BABA`". Ce test d'admixture développé par Durand *et al.* (2011) propose une statistique (`D`) basée sur quatre lignées partageant un ancêtre commun, selon la fréquence de SNPs observés avec un motif particulier. Cette méthode étant initialement pensée pour des séquences haploïdes. De fait la plupart des algorithmes présentés écartent les sites

avec une ambiguïté (code IUPAC) ou alors résolvent l'ambiguïté par un tirage aléatoire entre deux bases. Il existe une méthode pour prendre en compte les sites hétérozygotes à partir des fréquences alléliques, comme présenté dans Durand *et al.* (2011), mais la faible taille de populations biaiserais les résultats. Il est donc plus judicieux d'écarter les sites hétérozygotes, rendant le test plus conservateur. Considérant que les locis sont sous une évolution neutre et sans déséquilibre de liaison, on attend deux configurations différentes pour une même topologie. Cette topologie [(((P1,P2),P3),O)] propose que "P1" et "P2" coalescent avant un autre événement de coalescence avec "P3", puis avec "O" l'outgroup. Sur cette topologie on attend deux allèles présents en fin de branche avec "A" l'allèle ancestral et "B" l'allèle alternatif porté par l'outgroup. Ce test ne s'intéresse qu'a deux cas : "ABBA" et "BABA". Sous un modèle neutre, on attend des proportions équilibrées de sites portant ces deux configurations. L'hypothèse alternative est qu'un déséquilibre de ces proportions peut être induit par deux cas : une topologie autre ou alors une introgression de "P3" avec "P1" ou "P2". Un introgression entre "P3" et "P1" verrais donc une plus grande proportion de locis à la configuration "BABA". Cela aboutis à une valeur négative du "D", comme explicité par l'équation suivante :

$$D(P1,P2,P3,0) = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_{ABBA}(i) - C_{BABA}(i)}{\sum_{i=1}^{n} C_{ABBA}(i) + C_{BABA}(i)}$$

Il est important de souligner que ce test ne permet en aucun cas de proposer un sens d'introgression, ni son intensité.

Devant le nombre réduit de sites informatifs, il a été décidé de calculer `D` à partir des fréquences alléliques, comme décrit dessous. P_{ij} correspond à l'allèle alternatif.

$$D(P1,P2,P3,0) = \frac{\sum_{i=1}^{n} (1-P_{i1})P_{i2}P_{i3}(1-P_{i4}) - P_{i1}(1-P_{i2})P_{i3}(1-P_{i4})}{\sum_{i=1}^{n} (1-P_{i1})P_{i2}P_{i3}(1-P_{i4}) + P_{i1}(1-P_{i2})P_{i3}(1-P_{i4})}$$

To check

3 Résultats

3.1 Tri du jeu de données

To do

3.2 Clade Hirsuta

To do

3.3 Complexe ouest alpin

To do

4 Discussion

To do

Remerciements

5 Bibliographie

Boucher, F. C., Casazza, G., Szövényi, P., & Conti, E. 2016. Sequence capture using RAD probes clarifies phylogenetic relationships and species boundaries in Primula sect. Auricula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **104**, 60–72.

Buerkle, C. Alex. 2005. Maximum-likelihood estimation of a hybrid index based on molecular markers. *Molecular Ecology Notes*, **5**(3), 684–687.

Cornuet, Jean Marie, Pudlo, Pierre, Veyssier, Julien, Dehne-Garcia, Alexandre, Gautier, Mathieu, Leblois, Raphaël, Marin, Jean Michel, & Estoup, Arnaud. 2014. DIYABC v2.0 : A software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, **30**(8), 1187–1189.

Durand, Eric Y., Patterson, Nick, Reich, David, & Slatkin, Montgomery. 2011. Testing for ancient admixture between closely related populations. *Molecular Biology and Evolution*, **28**(8), 2239–2252.

Frichot, Eric, & François, Olivier. 2015. LEA : An Rpackage for landscape and ecological association studies. *Methods in Ecology and Evolution*, **6**(8), 925–929.

Gompert, Zachariah, & Alex Buerkle, C. 2010. Introgress : A software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources*, **10**(2), 378–384.

Jombart, Thibaut, & Ahmed, Ismaïl. 2011. adegenet 1.3-1 : New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, **27**(21), 3070–3071.

Lischer, H. E L, & Excoffier, L. 2012. PGDSpider : An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, **28**(2), 298–299.

Nazareno, Alison G., Bemmels, Jordan B., Dick, Christopher W., & Lohmann, Lúcia G. 2017. Minimum sample sizes for population genomics : an empirical study from an Amazonian plant species. *Molecular Ecology Resources*, **17**(6), 1136–1147.

R.Team. 2017. R : A language and environment for statistical computing (Version 3.4. 2)[Computer software]. *Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing*.

Suchan, Tomasz, Pitteloud, Camille, Gerasimova, Nadezhda S., Kostikova, Anna, Schmid, Sarah, Arrigo, Nils, Pajkovic, Mila, Ronikier, Michal, & Alvarez, Nadir. 2016. Hybridization capture using RAD probes (hyRAD), a new tool for performing genomic analyses on collection specimens. *PLoS ONE*, **11**(3), 1–22.

Zhang, Li Bing, & Kadereit, Joachim W. 2004. Classification of Primula sect. Auricula (Primulaceae) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **146**(1), 1–26.

Zhang, Li-Bing, Comes, Hans Peter, & Kadereit, Joachim W. 2004. The Temporal Course of Quaternary Diversification in the European High Mountain Endemic Primula sect. Auricula (Primulaceae) . *International Journal of Plant Sciences*, **165**(1), 191–207.

6 Ressources

Web 1 – `https://github.com/gowachin/Pedemontana`

Species	Locality	Code	Morph	Collector	Date	Longitude	Latitude	Altitude	Reads raw	Reads trimmed	Voucher
P. apennina*	Sella del Marmagna, Italy	AMB	Short-styled	F. Boucher/L. Gallien	30/05/14	10.00575	44.3978	1610	6885928	6486849	Photo
P. apennina	Monte Marmagna, Italy	AML	Long-styled	F. Boucher/L. Gallien	30/05/14	9.99731	44.39672	1825	1856867	1663377	Photo
P. apennina	Monte Orsaro, Italy	AOL	Long-styled	F. Boucher/L. Gallien	30/05/14	9.99666	44.39883	1818	3494081	3230296	Photo
P. cottia	Below locus classicus, Italy	CS1	NA	F. Boucher	23/07/14	7.0716	44.9271	1159	5127416	4814386	Photo
P. cottia	Prali, locus classicus, Italy	CP1	NA	F. Boucher	23/07/14	7.06583	44.9186	1407	3160322	2941542	Photo
P. cottia	Prali, locus classicus, Italy	CP4	NA	F. Boucher	23/07/14	7.06583	44.9186	1407	3482252	3201012	Photo
P. daonensis	Passo di Gavia, Italy	DGB	Short-styled	F. Boucher/L. Gallien	27/05/14	10.49701	46.31843	2219	6095146	5757485	Photo
P. daonensis	Ritorto, Italy	DRL	Long-styled	F. Boucher/L. Gallien	27/05/14	10.80429	46.23149	2083	4607717	4299840	Photo
P. hirsuta	Malga Bordolona, Italy	DMB	Short-styled	F. Boucher	09/06/14	10.87383	46.43412	2214	6073360	5722516	Photo
P. hirsuta	Refuge du Couvercle, France	HC1	NA	C. Dentant	15/07/14	6.9656	45.9103	2649	2639620	2384576	NA
P. hirsuta	Grand Chat, France	HGL	Long-styled	F. Boucher/L. Gallien	18/05/14	6.2147	45.4467	1986	4583323	4270118	Photo
P. hirsuta	Steibensee, Switzerland	HS2	NA	F. Boucher	07/09/14	8.17	46.45	2414	2891228	2643122	Photo
P. hirsuta	Pic du Midi d'Ossau, France	HP1	NA	C. Roquet	15/08/14	-0.4381	42.8431	2739	1881282	1772502	NA
P. hirsuta	Passo del Bernina, Switzerland	HPB	Short-styled	F. Boucher	09/06/14	10.02717	46.41069	2328	6566463	6195227	Photo
P. pedemontana	Barrage de Tignes, France	PT1	NA	F. Boucher	27/07/14	6.94633	45.4805	1836	6515454	6086010	YES
P. pedemontana	Vallon d'Avérole, France	PV1	NA	F. Boucher	27/07/14	7.08707	45.29356	2144	6480484	6100355	YES
P. sp. Lauzon Valley	Lauzon Valley, France	GA2	NA	P. Salomé/R. Bonet/F. Boucher	25/07/14	6.2784	44.8418	1732	4150458	3873470	YES
P. sp. Lauzon Valley	Lauzon Valley, France	GA4	NA	P. Salomé/R. Bonet/F. Boucher	25/07/14	6.2773	44.8366	1899	4796528	4489119	YES
P. villosa ssp. irmingardis	Rappolt Kogel, Austria	VR3	Short-styled	F. Boucher	07/06/14	14.88541	47.08313	1871	4722814	4234314	Photo
P. villosa ssp. irmingardis	Rappolt Kogel, Austria	VR1	Long-styled	F. Boucher	07/06/14	14.88541	47.08313	1871	4789459	4283316	Photo
P. villosa ssp. villosa	Turracher Hohe, Austria	VL2	Long-styled	F. Boucher	07/06/14	13.87581	46.91273	1801	3227112	2776420	Photo
P. villosa ssp. villosa	Turracher Hohe, Austria	VB1	Short-styled	F. Boucher	07/06/14	13.87581	46.91273	1801	3004397	2708593	Photo

Annexe 1 – **Individus séquencés pour cette étude** lorem ipsum