

Génomique de la conservation chez le sonneur à ventre jaune : diversité génétique, adaptation, et mutations délétères

Action PNA : « Étude génome nationale »

Principaux porteurs : Jean-Paul Léna (Université de Lyon), Hugo Cayuela (Université de Lausanne), Cédric Baudran (Office National des Forêts, animateur du PNA sonneur)

Principaux partenaires technico-financiers sollicités : Office National des Forêts, Union des Producteurs de Granulats, DREAL Nouvelle-Aquitaine, DREAL Pays de la Loire, DREAL Auvergne Rhône-Alpes

(1) Contexte général

Comprendre les mécanismes moléculaires associés au fonctionnement et à l'évolution des populations naturelles est enjeu de central en biologie de la conservation (Shafer et al. 2015, Allendorf et al. 2017). Durant les 20 dernières années, un nombre grandissant d'étude a soutenu l'idée que la définition des unités de gestion devait reposer sur la prise en compte des caractéristiques démographiques et moléculaires des populations naturelles (voir les synthèses bibliographiques de Allendorf 2017, Frankham et al. 2017). Une population constitue une unité évolutive fondamentale dans lesquelles les quatre forces majeures de l'évolution (mutation, sélection, dérive génétique, et flux de gènes) s'exercent (Waples & Gaggiotti 2006, Lowe & Allendorf 2010). Chez les espèces en déclin, une baisse de la taille efficace de la population affecte ces quatre forces de manière simultanée (Frankham 1995). Elle conduit en particulier à une baisse de la diversité génétique et de l'efficacité de la sélection, ainsi qu'à une augmentation des effets de la dérive génétique et de la fréquence/fixation d'allèles potentiellement délétères (Frankham 2005, Charlesworth 2009). Ces différents mécanismes conduisent inévitablement à une diminution de la capacité des espèces en déclin à répondre à de nouveaux stress environnementaux (ex. : changements climatiques, maladies émergentes; Frankham 2005, Hughes et al. 2009). Ils contribuent ainsi à augmenter le risque d'extinction des petites populations en affectant les performances et la valeur sélective des individus qui les compose (vortex d'extinction; Fagan & Holmes 2006, Frankham 2010).

Les populations de sonneur à ventre jaune (*Bombina variegata*) ont subi un déclin généralisé en Europe de l'ouest au cours du XXème siècle (IUCN 2018). Ce phénomène a conduit à l'extinction de l'espèce aux Pays-Bas et au Luxembourg et à la disparition des populations naturelles de Belgique (IUCN 2018). En France, ce déclin a conduit à l'extinction de cette espèce dans plusieurs départements dans l'ouest et le sud de la France (Massemin & Cheylan 2001, Lescure et al. 2011). Dans ce contexte, il apparaît crucial de mieux comprendre le rôle des mécanismes génétiques façonnant l'évolution des populations de sonneurs et leurs implications dans le vortex d'extinction des petites populations. Nous aborderons cette thématique à l'aide de méthodes génomiques de pointe et d'un vaste échantillonnage effectué à l'échelle nationale dans des populations occupant quatre types d'habitats : des carrières, des forêts, des zones prairiales, et des habitats rivulaires.

(2) Objectifs de l'étude

Dans le cadre de l'action du PNA sonneur "Étude génomique nationale", nous poursuivrons les cinq objectifs suivants :

- (1) **Objectif 1 : Examiner la diversité génétique globale et ses déterminants environnementaux et démographiques.** Nous analyserons les patrons de diversité génétique parmi les populations et examinerons l'influence de facteurs environnementaux locaux (i.e., type d'habitat) et paysagers (fragmentation paysagère, isolation démographique) sur les variations de diversité à l'échelle du génome. Pour les populations ayant été suivies démographiquement, nous analyserons s'il existe une association entre la taille de la population démographique, la taille de population efficace (N_e) et la diversité nucléotidique le long du génome.
- (2) **Objectif 2 : Examiner la variation génétique maladaptative et ses déterminants environnementaux et démographiques.** Nous identifierons des mutations potentiellement délétères et examinerons l'influence de facteurs environnementaux locaux (i.e., type d'habitat) et paysagers (fragmentation paysagère, isolation démographique) sur la fréquence et la fixation de ces mutations. Pour les populations ayant fait l'objet de suivis démographiques, nous examinerons les relations entre la taille de population démographique et l'accumulation de mutations délétères. Nous détecterons ces mutations en nous appuyant sur le transcriptome du sonneur publié en 2016 (Nürnberg et al. 2016) et procéderons à l'identification des voies métaboliques qu'elles sont susceptibles d'affecter.
- (3) **Objectif 3 : Examiner la variation génétique adaptative et ses déterminants environnementaux et démographiques.** Nous chercherons à détecter des signaux moléculaires d'adaptation au climat local (température, précipitations) et aux types d'habitats occupés (environnements forestiers, prairiaux, rivulaires, et de carrière). Nous considérerons des deux types de marqueurs génétiques : des SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) et des CNVs (*Copy Number Variants*). Nous identifierons le rôle des gènes candidats dans des voies métaboliques potentiellement reliées aux performances individuelles. Enfin, nous examinerons comment la démographie (taille de population démographique, taux d'accroissement de la population) affectent la diversité génétique adaptative dans les populations de sonneur.
- (4) **Objectif 4 : Examiner la dépression de consanguinité et ses effets sur la survie adulte et le recrutement.** Nous examinerons la présence de dépression de consanguinité en analysant le lien entre l'hétérozygotie (globale ou centrée sur les régions codantes du génome), la survie adulte, et le recrutement dans les populations pour lesquelles nous disposons de données de capture-recapture (suivis de 3 ans ou plus).
- (5) **Objectif 5 : Proposer des mesures de gestion favorisant le maintien de la diversité génétique adaptative, la réduction de la diversité génétique maladaptative, et la suppression de la dépression de consanguinité.** Sur la base de nos résultats, nous proposerons des mesures de gestion (ex. : rétablissement de la connectivité génétique, flux de gènes assistés, renforcement démographique) permettant de lutter contre les effets de la dépression de consanguinité, la perte de diversité génétique adaptative, et l'accumulation de variants délétères. Dans le cas de mesures de renforcement

démographique à partir d'autres populations, nous évaluerons les risques associés à l'*outbreeding* et à l'érosion de l'adaptation locale.

(3) Matériels et méthodes

Plan et méthode d'échantillonnage

L'étude reposera sur un vaste échantillonnage incluant 28 populations françaises (voir le **Tableau 1**), soit 5 populations par type d'habitats (carrières, forêts, des zones agricoles, et des habitats rivulaires). La liste de communes concernées est présentée dans l'Annexe IV. Des échantillons salivaires seront collectés chez 20 individus adultes dans chaque population, soit un total de 540 individus. Les populations seront échantillonnées avec l'appui de référents locaux (voir la liste dans le **Tableau 1**). Lorsque des suivis par capture-recapture sont réalisés par des structures locales, nous tirerons bénéfice de ces opérations pour effectuer les prélèvements salivaires afin de réduire le temps de manipulations des animaux. Les captures et prélèvements seront réalisés en mai et juin, de jour – à l'exception de la population de Ségrie (72) où la LPO Sarthe (référént Frédéric Lecureur) effectue les captures de nuit dans le cadre de son suivi. Les individus seront capturés à la main ou l'épuisette. L'opérateur chargé du prélèvement salivaire (effectué à l'aide d'un coton-tige) portera des gants stériles jetables. Les gants seront changés entre chaque population échantillonnée et le matériel utilisé (boîte, seau, épuisette, et gants) sera désinfecté au Virkon afin d'empêcher la propagation éventuelle de pathogènes entre les populations. Les prélèvements et les captures seront réalisées par Hugo Cayuela (chercheur postdoctorant, PhD) qui a organisé plusieurs études de capture-recapture et de génétique des populations (voir le CV fourni dans l'annexe II) chez le sonneur à ventre jaune et possède le brevet d'expérimentation animale Niveau I/b (approuvé par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, conformément à l'arrêté du 1/2/2013 ; voir le document fourni dans l'annexe III)

Analyses moléculaires et bioinformatiques

Les analyses moléculaires incluant l'extraction et la normalisation des ADN seront réalisées dans le Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (UMR 5023). Les librairies et le séquençage seront effectués sur la plateforme de séquençage de l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS, Université Laval, Québec). Les individus seront génotypés à l'aide d'une autre approche de type *Genotyping-By-Sequencing* (GBS) à l'aide d'un séquenceur Ion Proton P1v2.

Les analyses bio-informatiques seront réalisées par les Dr. Hugo Cayuela (Université de Lyon) et Quentin Rougemont (Université de Montpellier). Les lectures issues du séquençage seront alignées et les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*, c'est-à-dire des marqueur bi-alléliques) seront appelés et génotypés à l'aide du pipeline d'analyse Stacks v.1.44. Les SPNs seront ensuite filtrés et sélectionnés pour leur qualité. Les analyses de diversité génétique seront effectuées avec le logiciel PLINK (Purcell et al. 2007). Les tailles efficaces de population (N_e) seront estimées à l'aide du programme LDNE (Waples & Do 2008). Nous identifierons les loci sous sélection à l'aide de méthodes de scan génomique incluant des approches Bayésiennes (Bayenv 2; Günther & Coop 2013), des modèles mixtes (LFMM; Frichot et al. 2013), et des méthodes

d'ordination (RDA; Forester et al. 2016). La recherche d'allèles délétères sera effectuée en procédant tout d'abord à un BLAST des tous les SNPs sur le transcriptome du sonneur (Nürnberg et al. 2016). Ensuite, nous utiliserons le programme PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*; Choi & Chan 2015) pour détecter les mutations délétères à proprement parler.

Tableau 1. Liste des 28 populations à échantillonner. La liste de communes concernées est présentée dans l'Annexe IV.

ID	Région	Habitat	Localisation	Dép	Référent
Sites principaux					
1	Grand-est	Carrière	Saint-Nabor	67	Jean-Pierre Vacher
2	Grand-est	Forêt	Forêt domaniale de Verdun	55	Cédric Baudran
3	Grand-est	Agricole	Marsal	57	Laurent Godet
4	Grand-est	Carrière	Xeuilley	54	Damien Aumaître
5	Grand-est	Forêt	Forêt domaniale de la Croix-au-Bois	08	Cédric Baudran
6	Grand-est	Forêt	Forêt domaniale de Darney	88	Eric Bonnaire
7	Grand-est	Forêt	Forêt domaniale du Morthomme	55	Cédric Baudran
8	Pays de la Loire	Agricole	Vernie	72	Johannic Chevreau
9	Pays de la Loire	Carrière	Ségrie	72	Frédéric Lecureur
10	Centre val de Loire	Agricole	Prissac	36	Yohan Morizet
11	Centre val de Loire	Agricole	Sargé-sur-Braye	41	Florian Laurenceau
12	Nouvelle-Aquitaine	Forêt	Forêt de Rochechouart	87	Clémence Brosse
13	Nouvelle-Aquitaine	Carrière	Nontron	24	Clémence Brosse
14	Nouvelle-Aquitaine	Agricole	Aignes-et-Puypéroux	16	Jean-Marc Thirion
15	Nouvelle-Aquitaine	Agricole	Les Chaumes d'Avon	79	Florian Doré
16	Bourgogne Franche-Comté	Forêt	Forêt domaniale de Chaux	25	Alix Michon
17	Bourgogne Franche-Comté	Agricole	Morvan	21	Nicolas Varranguin
18	Bourgogne Franche-Comté	Agricole	Charolais	71	Nicolas Varranguin
19	Bourgogne Franche-Comté	Rivière	Vallée de la Bienne	39	Alix Michon
20	Auvergne Rhône-Alpes	Forêt	Forêt domaniale des Prieurés	03	Cédric Baudran
21	Auvergne Rhône-Alpes	Forêt	Forêt domaniale des Blaches	38	Cédric Baudran
22	Auvergne Rhône-Alpes	Carrière	Cusy	74	Pierre Gotteland
23	Auvergne Rhône-Alpes	Rivière	Vallée de l'Eyrieux	07	Hugo Cayuela
24	Auvergne Rhône-Alpes	Rivière	Vallée de la Bourge	07	Hugo Cayuela
25	Auvergne Rhône-Alpes	Rivière	Puy-en-velay	43	Solenne Muller
26	Auvergne Rhône-Alpes	Rivière	Valserine	01	Hugo Cayuela
27	Auvergne Rhône-Alpes	Rivière	Vallée du Gage et de la Loire	07+43	Julie Pedrono
28	Normandie	Agricole	Vallée de l'Iton (Le Hom)	27	Lucy Morin

(1) Planification et budget

Le budget total prévu pour ce projet, dont le détail est présenté dans le **Tableau 2** ci-dessous, s'élève à 44000 euros. L'université de Lyon et de Montpellier financent les salaires des

postdoctorants et des techniciens (8000 euros) tandis que Plan Nation d'Action (PNA sonneur), l'Union Nationale des Producteurs de Granulats (UNPG), la DREAL des Pays de la Loire, et la DREAL AuRA finance les analyses moléculaires et le séquençage à hauteur de 36000 euros.

Tableau 2. Plan de financement

Financier	Montant	Postes de financements
Plan Nation d'Action	16000	- Extraction et normalisation des ADN - Création des librairies et séquençage
Union Nationale des Producteurs de Granulats	8000	
DREAL des Pays de la Loire	4000	
DREAL AuRA	8000	
Sous-total :	36000 euros	
Université de Lyon et de Montpellier	8000	- Extraction et normalisation des ADN (salaire du personnel technique) - Analyses bio-informatiques et statistiques (salaires des postdoctorants)
Total :	44000 euros	

L'étude sera déclinée en 6 phases (voir le **Tableau 3** ci-dessous) qui seront réalisées sur une période de 3 ans (2021-2023). Les résultats seront présentés et remis aux financeurs sous la forme d'articles scientifiques rédigé en anglais et d'un rapport court (moins de 10 pages) écrit en français. Le tableau ci-dessous présente l'échéancier de l'étude.

Tableau 3. Phasage de l'étude sur la période 2021-2023.

Action	2021	2022	2023
PHASE 1 : Collecte des échantillons d'ADN	X		
PHASE 2 : Extraction et normalisation des ADN	X		
PHASE 3 : des librairies et séquençage	X	X	
PHASE 4 : Analyses bio-informatiques et statistiques		X	X
PHASE 5 : Rédaction d'articles scientifiques			X
PHASE 6 : Rédaction d'un rapport court (moins de 10 pages) en français			X

Références bibliographiques

- Allendorf, F. W. (2017). Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular Ecology*, 26, 420-430.
- Charlesworth, B. (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*, 10, 195.
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31, 2745-2747.
- Fagan, W. F., & Holmes, E. E. (2006). Quantifying the extinction vortex. *Ecology Letters*, 9, 51-60.
- Forester, B. R., Jones, M. R., Joost, S., Landguth, E. L., & Lasky, J. R. (2016). Detecting spatial genetic signatures of local adaptation in heterogeneous landscapes. *Molecular Ecology*, 25, 104-120.
- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetics Research*, 66, 95-107.
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 131-140.
- Frankham, R. (2010). Inbreeding in the wild really does matter. *Heredity*, 104, 124.

- Frankham, R., Ballou, J. D., Ralls, K., Eldridge, M., Dudash, M. R., Fenster, C. B., ... & Sunnucks, P. (2017). Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press, UK.
- Frichot, E., Schoville, S. D., Bouchard, G., & François, O. (2013). Testing for associations between loci and environmental gradients using latent factor mixed models. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 1687-1699.
- Günther, T., & Coop, G. (2013). Robust identification of local adaptation from allele frequencies. *Genetics*, 113.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11, 609-623.
- IUCN 2018. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2.
- Lescure, J., Pichenot, J., & Cochard, P. O. (2011). Régression de *Bombina variegata* (Linné, 1758) en France par l'analyse de sa répartition passée et présente. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, 137, 5-41.
- Lowe, W. H., & Allendorf, F. W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity?. *Molecular Ecology*, 19, 3038-3051.
- Massemin, D., & Cheylan, E. M. (2001). Eléments bibliographiques sur le statut passé et actuel du Sonneur à ventre jaune *Bombina variegata* (L.)(Anura; Discoglossidae) en région méditerranéenne française. *Bulletin de la Société herpétologique de France*, 97, 41-47.
- Nürnberg, B., Lohse, K., Fijarczyk, A., Szymura, J. M., & Blaxter, M. L. (2016). Para-allopatry in hybridizing fire-bellied toads (*Bombina bombina* and *B. variegata*): Inference from transcriptome-wide coalescence analyses. *Evolution*, 70, 1803-1818.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., ... & Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
- Shafer, A. B., Wolf, J. B., Alves, P. C., Bergström, L., Bruford, M. W., Brännström, I., ... & Fawcett, K. D. (2015). Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends in Ecology & Evolution*, 30, 78-87.
- Waples, R. S., & Gaggiotti, O. (2006). What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15, 1419-1439.
- Waples, R. S., & Do, C. H. I. (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, 8, 753-756.