

## Application pour échantillonner *Erebia sudetica* en France

### Groupes de recherche sollicitant le permis

Le projet de recherche est un effort conjoint de deux groupes de recherche situés en Espagne et en Finlande: Roger Vila est l'investigateur principal du Butterfly Diversity and Evolution Lab (BDE Lab) à l'Institut de Biologie Évolutive, Barcelone (Espagne) (<https://www.biologiaevolutiva.org/rvila>); Vlad Dincă est l'investigateur principal du Lepidoptera Research Lab (LepiLab) dans l'Unité de Recherche en Écologie et en Génétique de l'Université d'Oulu (Finlande) (<https://leps.wordpress.com>).

Les deux groupes utilisent les papillons diurnes (Papilionoidea) comme modèle de recherche et possèdent une vaste expérience dans l'étude de l'évolution, de la dynamique des populations et de la phylogéographie des papillons européens et nord-africains, ainsi que des programmes de conservation.

Le BDE Lab coordonne actuellement un projet de recherche intitulé «Expansion de la génomique des insectes» (acronyme EXIGEN) (Expanding Insect Genomics) (référence PID2022-139689NB-I00), financé par le Plan Nacional I + D + i Espagnol (MCIN / AEI / ERDF). Ce projet finance également une thèse de doctorat.

LepiLab coordonne actuellement un projet de recherche financé par l'Académie de Finlande. Le projet s'intitule «Comprendre la dynamique spatio-temporelle de la différenciation génétique: les papillons de jour européens comme modèle» (acronyme STAGE) (Understanding the spatio-temporal dynamics of genetic differentiation: The European butterflies as a model) (décisions n° 328895, 324988 et 352652). Ce projet finance également une thèse de doctorat.

### Contexte du projet

Compte tenu de l'étroite collaboration entre les deux laboratoires et des projets qu'ils coordonnent, nous prévoyons d'étudier conjointement l'histoire évolutive des papillons *Erebia sudetica* (Moiré des Sudètes) et *Erebia melampus* (Moiré des pâturins).

Bien que *E. sudetica* soit une espèce de haute valeur de conservation en France et en Europe (par exemple incluse dans l'annexe IV de la directive Habitats 92/43/CEE) et que *E. melampus* soit une espèce endémique alpine, elles ont fait l'objet de peu d'études moléculaires.

La plupart des informations disponibles se limitent aux allozymes et à l'ADN mitochondrial (codes-barres ADN). Une étude (2007) a utilisé des allozymes pour vérifier la structure génétique d' *E. melampus* et a inclus comme sous-groupe une seule population d' *E. sudetica* de Suisse (Haubrich & Schmitt 2007). Les auteurs ont découvert une différenciation génétique notable en trois lignées: *E. melampus* occidentale, *E. melampus* orientale et *E. sudetica*. Il est intéressant de noter que la divergence entre les deux lignées génétiques d' *E. melampus* était plus élevée que celle entre chacune de ces lignées et *E. sudetica*, suggérant la présence d'un complexe d'espèces avec différentes zones refuges glaciaires pendant la glaciation de Würm (Haubrich & Schmitt 2007).

Les données des codes-barres ADN d' *E. sudetica* et d' *E. melampus* disponibles dans le Barcode of Life Data System (BOLD, <http://v4.boldsystems.org/index.php>) suggèrent que les deux taxons sont paraphylétiques et affichent des niveaux très faibles de distance interspécifique minimale (0,3%).

Dans ces circonstances, nous pensons qu'une étude détaillée utilisant la génomique et éventuellement des sources de données supplémentaires (par exemple morphologie, analyses chimiques) est nécessaire afin de mieux comprendre ces taxons.

### **Objectifs**

Les recherches prévues sur *E. sudetica* et *E. melampus* poursuivent quatre objectifs principaux:

1. Documenter l'histoire évolutive des deux taxons
2. Analyser le potentiel de diversité cryptique au sein de ces taxons
3. Évaluer les niveaux d'infection par la bactérie *Wolbachia*
4. Évaluer les implications pour la conservation

### **Brève description des méthodes**

Les données génomiques seront obtenues à l'aide du «double digest restriction-site associated DNA sequencing» (ddRADseq). Il s'agit d'une modification du protocole RADseq original dans lequel le génome est digéré avec deux enzymes de restriction au lieu d'une, ce qui réduit les biais de préparation de bibliothèques induits par le cisaillement de l'ADN et augmente le temps et la rentabilité en maximisant la flexibilité de la quantité de marqueurs entre les individus et les bibliothèques (Peterson et al. 2012). Nos laboratoires possèdent une vaste expérience dans la préparation de bibliothèques ddRADseq et ont déjà publié des études utilisant cette approche (e.g., Dincă et al. 2019, Hinojosa et al. 2019, 2020, Tahami et al. 2021).

Les données ADN résultantes seront utilisées pour déduire des relations phylogénétiques, pour évaluer la structure génétique des populations et pour explorer des scénarios de délimitation des espèces.

Nous testerons la présence de *Wolbachia* en utilisant les données ddRADseq ; nous pouvons également réaliser un dépistage de *Wolbachia* par PCR avec des primers spécifiques de marqueurs largement utilisés pour détecter la présence de cette bactérie (e.g., *coxA*, *ftsZ*, *wsp*). Si *Wolbachia* est détecté, les souches peuvent être déduites à l'aide du schéma de typage de séquence multilocus (MLST).

Nous effectuerons également des analyses morphologiques, par ex. en examinant les organes génitaux masculins d'au moins un sous-ensemble de spécimens. La morphométrie sera également prise en compte si nous détectons des différences potentielles pouvant être quantifiées via la morphométrie linéaire ou géométrique. De plus, nous pouvons essayer la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (GC/MS) en utilisant les ailes. Il a été démontré que les hydrocarbures cuticulaires fournissent des informations utiles concernant la différenciation au niveau des populations ou des espèces chez certains papillons européens (e.g., Dapporto 2007, Hernández-Roldán et al. 2016).

### **Protocole de prélèvement**

Des spécimens d' *E. sudetica* et d' *E. melampus* seront capturés à l'aide de filets entomologiques. Les spécimens seront euthanasiés en appuyant brièvement sur le thorax. La priorité sera donnée aux mâles et aux spécimens à la fin de leur temps de vol afin que l'impact sur les populations soit réduit au minimum.

Jusqu'à huit spécimens par département (Cantal, Savoie) seront échantillonnés.

Les opérations de prélèvement auront lieu du 15 juillet au 15 août 2024 (pas plus de quatre jours sur le terrain, à déterminer en fonction des conditions météorologiques).

A notre connaissance, les populations d'*E. sudetica* du département du Cantal se trouvent au sein du Parc Naturel Régional des Volcans d'Auvergne.

Les spécimens seront conservés dans de l'éthanol à 99% et à -20°C. Les ailes seront conservées dans des enveloppes entomologiques, assurant ainsi la conservation à long terme des échantillons.

Des prélèvements non-letaux ne sont pas possibles pour les raisons suivantes:

1. Les analyses morphologiques nécessitent les ailes et d'autres parties du corps (par exemple les organes génitaux).
2. En cas de problèmes avec les premières analyses moléculaires, des tissus doivent être disponibles pour répéter/vérifier les résultats. Ceci est également valable à l'avenir, lorsque d'autres chercheurs pourraient avoir besoin de vérifier les résultats ou d'effectuer de nouvelles analyses en utilisant les mêmes échantillons (évitant ainsi la nécessité d'un échantillonnage supplémentaire).

Nous sommes actuellement en mesure d'inclure dans notre étude divers échantillons d' *E. melampus* des Alpes, ainsi que des spécimens d' *E. sudetica* de Roumanie (deux zones différentes des Carpates) et de Suisse (permis obtenu en 2021- Canton de Berne, autorisation référence 4.3.2.8). Dans ce contexte, pouvoir analyser dans notre étude quelques spécimens d' *E. sudetica* provenant de France est essentiel pour la représentation globale de la répartition d' *E. sudetica* en Europe (Fig. 1).

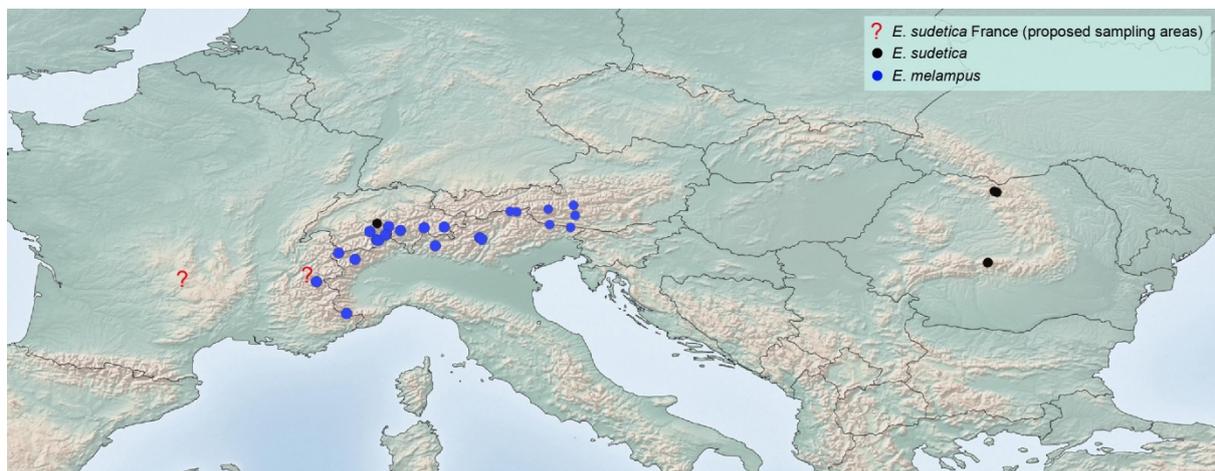


Fig. 1. Échantillons disponibles et prélèvement proposé (France) d'*E. sudetica* et *E. melampus*.

### Résultats attendus et implications

En abordant avec succès les quatre objectifs principaux mentionnés ci-dessus, nous entendons augmenter considérablement le niveau de connaissance de ces deux taxons. Comme cela a été brièvement expliqué dans la section « Contexte », les données sur les allozymes suggèrent une différenciation notable au sein d' *E. melampus* (Alpes Occidentales et Orientales), alors que des analyses détaillées, à notre connaissance, font défaut pour *E.*

*sudetica*. D'autre part, l'ADN mitochondrial (codes-barres ADN) suggère de très faibles niveaux de divergence (0.3 %) entre *E. sudetica* et *E. melampus* et à ce sujet, les deux taxons ne sont pas monophylétiques. Nos recherches documenteront la structure génétique et la relation entre *E. sudetica* et *E. melampus* et évalueront la possibilité que l'un de ces taxons puisse inclure des espèces cryptiques.

En outre, les connaissances sur l'infection par la bactérie *Wolbachia* fourniront des informations supplémentaires susceptibles d'expliquer les modèles d'ADN mitochondrial (étant donné la nature maternelle de *Wolbachia* et ses effets potentiels sur la population hôte – par exemple Werren *et al.* 2008).

Si l'un des taxons comprend des espèces cryptiques, alors l'état de conservation des taxons concernés doit être réévalué. Au-delà de la taxonomie, les lignées génétiques divergentes peuvent être considérées comme des unités évolutives significatives (UES) ayant une valeur de conservation, en particulier pour une espèce telle qu' *E. sudetica*. De telles connaissances pourraient aider à la gestion de la conservation des populations ciblées et, si nécessaire, à la priorisation des ressources. Une bonne connaissance de la structure génétique de ces espèces, ainsi que de l'infection par *Wolbachia*, sont tout aussi importantes si des futurs renforcements de population ou des réintroductions régionales seraient prévus. Compte tenu de la valeur de conservation d' *E. sudetica* et du fait que les deux espèces sont endémiques d'Europe, nous pensons que les résultats générés seront d'une grande pertinence non seulement pour les régions et les pays abritant des populations de ces taxons, mais également pour le continent européen en tant qu'entier.

## Références

- Dapporto L. 2007. Cuticular lipid diversification in *Lasiommata megera* and *Lasiommata pamegaera*: the influence of species, sex, and population (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 91(4): 703–710. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00833.x>
- Dincă V.<sup>#</sup>, Lee K.M.<sup>#</sup>, Mutanen M., Vila R. 2019. The conundrum of species delimitation: a genomic perspective on a mitogenetically super-variable butterfly. *Proceedings of the Royal Society B* 286: 20191311. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.1311> (<sup>#</sup> equal contribution).
- Haubrich K., Schmitt T. 2007. Cryptic differentiation in alpine-endemic, high-altitude butterflies reveals down-slope glacial refugia. *Molecular Ecology* 16: 3643–3658. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03424.x
- Hernández-Roldán J., Dapporto L., Dincă V., Vicente J.C., Hornett E.A., Šíchová J., Lukhtanov V.A., Talavera G., Vila R. 2016. Integrative analyses unveil speciation linked to host plant shift in *Spialia* butterflies. *Molecular Ecology* 25: 4267–4284. DOI: 10.1111/mec.13756
- Hinojosa J.C., Koubínová D., Dincă V., Hernández-Roldán J., Munguira M.L., García-Barros E., Vila M., Alvarez N., Mutanen M., Vila R. 2020. Rapid colour shift by reproductive character displacement in *Cupido* butterflies. *Molecular Ecology* 29(24): 4942–4955. <https://doi.org/10.1111/mec.15682>
- Hinojosa J.C., Koubínová D., Szenteczki M.A., Pitteloud C., Dincă V., Alvarez N., Vila R. 2019. A mirage of cryptic species: Genomics uncover striking mitonuclear discordance in the butterfly *Thymelicus sylvestris*. *Molecular Ecology* 28(17): 3857–3868. <https://doi.org/10.1111/mec.15153>. Featured on the journal cover.

- Peterson B.K., Weber J.N., Kay E.H., Fisher H.S., Hoekstra H.E. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for *de novo* SNP discovery and genotyping in model and non-model species. PLoS ONE 7: e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Tahami M.S., Dincă V., Lee K.M., Vila R., Joshi M., Heikkilä M., Dapporto L., Schmid S., Huemer P., Mutanen M. 2021. Genomics Reveal Admixture and Unexpected Patterns of Diversity in a Parapatric Pair of Butterflies. Genes 12(12): 2009. <https://doi.org/10.3390/genes12122009>
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nature Reviews Microbiology 6: 741–751.

Vlad Eugen Dincă



Roger Vila



14 décembre 2023