

# Rutilans

Association des Coléoptéristes amateurs du Sud de la France



MONOGRAPHIE  
de

*C. (Chrysocarabus) punctatoauratus* GERMAR, 1824  
(Coleoptera CARABIDAE)

De l'origine et de la diversité génétique de  
*C. punctatoauratus*

Jean-Yves RASPLUS

# De l'origine et de la diversité génétique

de

*Carabus (Chrysocarabus) punctatoauratus*

GERMAR, 1824

Jean-Yves RASPLUS \*

Septembre 2001

\* INRA - Centre de Biologie et de Gestion des Populations  
Campus International de Baillarguet - CS 30 016  
34988 Montferrier-sur-Lez - FRANCE

## *C. PUNCTATO AURATUS*

Ces dernières années ont vu l'avènement des techniques moléculaires en entomologie, les carabes ont constitué de fait un modèle biologique de qualité. En effet, leur brachyptérie et, fréquemment, leur stricte inféodation à des habitats localisés engendrent un isolement fort des populations qui facilite les processus de différenciation génétique. Malgré leur intérêt, peu d'études ont analysé la variabilité génétique d'espèces de carabes.

Les analyses phylogénétiques ont ainsi largement profité de l'amélioration des techniques de séquençages de gènes<sup>1</sup> mitochondriaux<sup>2</sup> et nucléaires. Parallèlement, l'étude génétique des populations de carabes a bénéficié du développement de marqueurs nouveaux plus polymorphes et, par conséquent, plus résolutifs que les marqueurs enzymatiques utilisés jusqu'à lors (Rasplus *et al.*, 2000, Rasplus *et al.*, 2001). Notre laboratoire a développé ces marqueurs sur différentes espèces de *Carabus* (*C. solieri*, *punctatoauratus* / *auronitens*, *splendens*, *nemoralis* et *problematicus*) et les prochaines années, verront sans aucun doute des avancées notables dans la compréhension des mécanismes de différenciation génétique chez les carabes, et peut être l'infirmité des résultats, concernant *C. punctatoauratus*, que je présente ci-dessous.

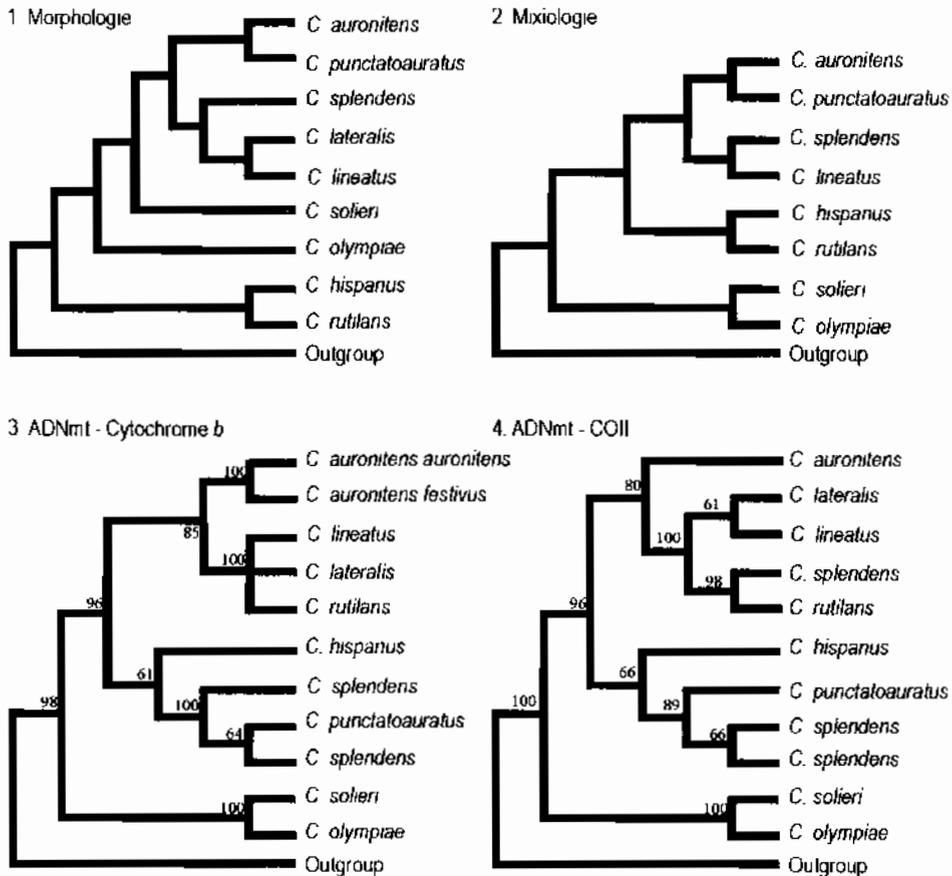
### **1. *C. punctatoauratus* : une bonne espèce, probablement issue de l'introggression de *C. auronitens* par *C. splendens***

L'histoire évolutive des espèces du sous-genre *Chrysocarabus* n'a jamais été reconstruite avec rigueur et peu d'études permettent de se faire une idée objective de la phylogénie de ce groupe. Cependant, que ce soit d'un point de vue morphologique (Mossakowski, 1980, Malausa *et al.*, 1984), ou d'un point de vue mixiologique (Puisségur, 1964, Allemand et Malausa, 1984), *C. auronitens* et *C. punctatoauratus* sont deux espèces extrêmement proches. Cette proximité a amené différents auteurs à considérer ces deux espèces comme synonymes. L'analyse récente de séquences de gènes nucléaires (Rasplus, non publié) et des gènes mitochondriaux de la Cytochrome Oxydase II (Düring *et al.*, 2001) et du Cytochrome b (Rasplus, en préparation) montrent des résultats contrastés (voir planche ci-dessous). Le gène nucléaire étudié (un gène anonyme), à l'instar de la morphologie et de la mixiologie, montre clairement la proximité de *C. punctatoauratus* et de *C. auronitens*. Au contraire, l'analyse des deux gènes mitochondriaux montrent des résultats convergents, mettant en évidence la proximité, sinon l'identité génétique, de ces gènes avec ceux de *C. splendens*. Tout laisse donc à penser que *C. auronitens* et *C. punctatoauratus* sont à l'origine une seule et même espèce, mais que les populations de cette dernière, isolées dans les Pyrénées, ont ensuite échangé des gènes avec une autre espèce quasi-endémique des Pyrénées : *C. splendens*.

<sup>1</sup> un gène est une unité d'information constituée par un fragment d'ADN et localisée sur un chromosome donné.

<sup>2</sup> le génome mitochondrial des insectes est circulaire et de petite taille (au plus 36000 nucléotides).

D'après les études menées au laboratoire, *C. splendens* et *C. punctatoauratus* s'hybrident facilement (la collecte fréquente d'hybrides supposés entre les deux espèces confirme cette capacité d'hybridation dans les milieux naturels). Seul le croisement *C. splendens* ♀ x *C. punctatoauratus* ♂ produit une descendance fertile qui peut donc à nouveau se croiser avec l'une ou l'autre des deux espèces. Ceci respecte la loi de Haldane qui veut que dans certains cas d'hybridations interspécifiques, la sélection opère sur le sexe hétérogamétique (en l'occurrence les mâles, XY chez les carabes). En conséquence, seules les femelles survivent et peuvent à nouveau se reproduire avec l'un ou l'autre des partenaires. Ce résultat et le fait que les mitochondries sont transmises par le sexe femelle, permettent de prédire que si une introgression<sup>3</sup> mitochondriale existe entre les deux espèces, elle ne peut se faire que dans le sens *C. splendens* → *C. punctatoauratus*, ce que le séquençage de gènes mitochondriaux confirme. Il est donc très probable que *C. punctatoauratus* soit une espèce apparue par hybridation stabilisée entre *C. auronitens* et *C. splendens*. Ce phénomène est connu chez d'autres insectes (Papilionidae) (Sperling et Harrison, 1994), mais aussi chez des carabes (*Ohomopterus*) (Sota et Vogler, 2001), et pourrait constituer un mode de diversification fréquent et important chez les animaux (Dowling et Secor, 1997).



Hypothèses de relations phylogénétiques au sein du sous-genre *Chrysocarabus* à partir de différents caractères : 1) morphologie (Mossakowski, 1980); 2) mixiologie (Allemand & Malausa, 1984); 3) ADN mitochondrial, séquences partielles du gène du Cytochrome b (657 pb)(Rasplus, en préparation); 4) ADN mitochondrial, séquences partielles du gène de la COII (687 pb) (Düring et al., 2001). Les valeurs de bootstrap (%) sur les nœuds donnent une idée de la fiabilité des relations phylogénétiques proposées.

<sup>3</sup> processus par lequel un gène est transféré d'un génotype à un autre (que ce soit entre populations ou espèces).

Le fait, qu'à ce jour, aucune population de *C. punctatoauratus* ne nous ait révélé de mitochondries de type "*auronitens*" (les populations de Pla Guilhem, par exemple, ont des gènes mitochondriaux parfaitement identiques à ceux des *C. splendens* de l'est pyrénéen) suggère fortement que l'introggression mitochondriale à une origine ancienne. La présence de différents haplotypes<sup>4</sup> mitochondriaux du groupe "*splendens*" dans des populations de *C. punctatoauratus* aujourd'hui géographiquement isolées et éloignées (est et ouest de la distribution géographique), laisse penser que cette introggression précède les événements paléoclimatiques ayant fractionné les populations de *C. punctatoauratus*. Assmann (1995) suppose que ce sont les dernières glaciations, et l'extension des glaciers pyrénéens, qui ont contribué à subdiviser et isoler les populations de *C. punctatoauratus*. Ces populations auraient passé les glaciations dans des refuges glaciaires, probablement sur les versants sud. Il est possible que dans certains de ces refuges *C. punctatoauratus* et *C. splendens* se soit maintenus, alors que dans d'autres seul *punctatoauratus* ait subsisté, ce qui pourrait aussi expliquer la variabilité génétique et morphologique observée.

Il est hasardeux d'estimer le temps de cette différenciation à partir de la divergence génétique des gènes mitochondriaux, néanmoins je me risque ici à donner une fourchette basée sur deux estimations (extrêmes) de la vitesse d'évolution des gènes mitochondriaux. Une estimation utilisée classiquement se base sur des observations effectuées sur plusieurs groupes d'insectes par Brower (1994), qui suggère que la divergence moyenne sur les gènes mitochondriaux est de 1,2% par million d'années (MA). L'autre estimation, plus récente (Prüser et Mossakowski, 1998), est basée sur l'étude de la différenciation entre les populations de trois espèces de *Carabus* : *C. melancholicus*, *C. morbillosus* et *C. rugosus*, se rencontrant au nord au et sud de Gibraltar et supposées être séparées depuis l'ouverture du détroit de Gibraltar. Cet événement rapide a fait suite au grand assèchement de la Méditerranée à la fin du Messinien (il y a 5,3 MA). Dans cette étude la divergence est estimée à 0,5% par MA pour le gène mitochondrial ND1 dont le tempo est proche de celui du cytochrome b. Cette estimation est, par ailleurs, très proche d'une autre basée sur l'étude des *Carabus* (*Ohomopterus*) japonais, qui se situe à un taux <0,57% par MA (Su *et al.*, 1996).

La plus forte différenciation observée pour le cytochrome b au sein des haplotypes mitochondriaux du groupe *splendens* est de l'ordre de 2,1 %. Par conséquent, la différenciation des différents haplotypes ayant ensuite introggressé *C. punctatoauratus* remonterait au moins à 1,75-4,2 MA, une fourchette qui permet d'exclure un lien quelconque avec les derniers événements glaciaires (12000 ans). Ce résultat n'exclut pas la possibilité que l'introggression de *C. punctatoauratus* par *C. splendens* soit plus récente, et de loin subséquente à la différenciation des haplotypes "*splendens*". Cependant, si tel était le cas, il serait alors difficile d'expliquer la distribution observée de certains de ces haplotypes (e.g. Espagne, Sierra de Urbasa dans *C. splendens* et France, forêt de Puivert dans *C. punctatoauratus* !). Il est intéressant de constater que l'on retrouve un niveau de différenciation identique entre *C. lineatus* et *C. lateralis* (2,1%) et *C. auronitens auronitens* et *C. auronitens festinus* (2,4%), ceci suggère fortement qu'un événement global a induit une différenciation concomitante des espèces de *Chrysocarabus* présentes à l'époque dans nos régions.

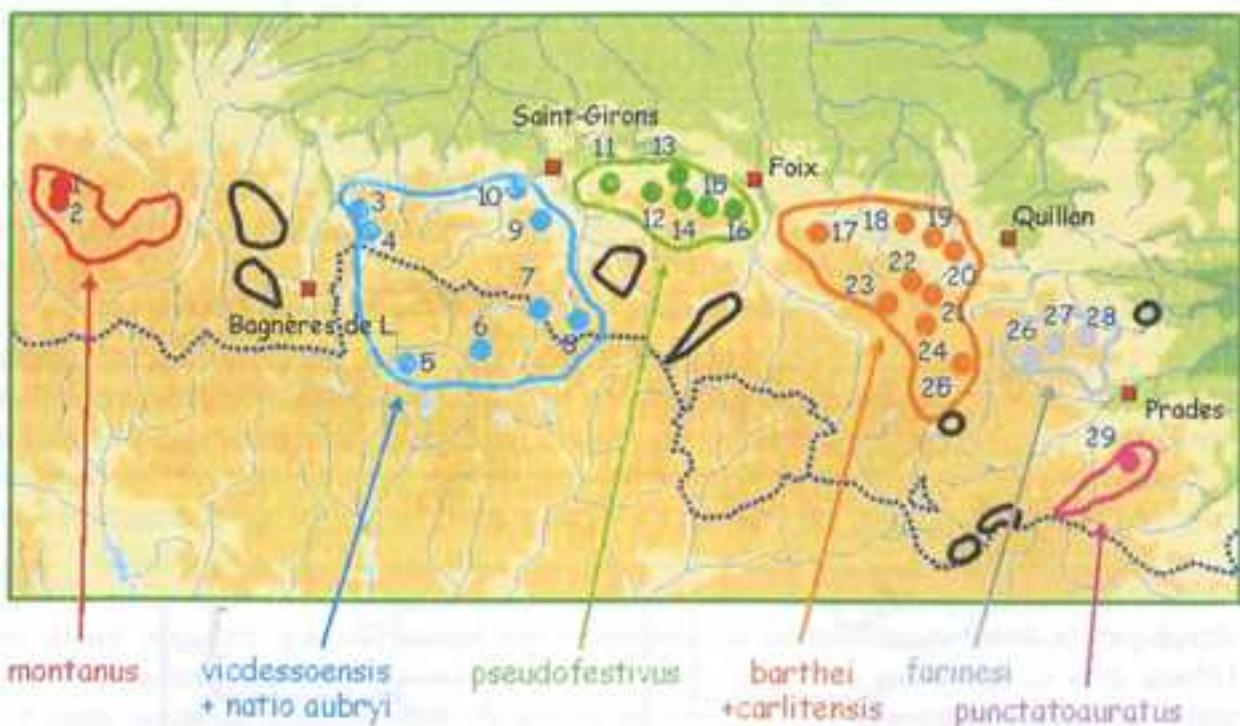
<sup>4</sup> forme allélique pour un génome haploïde (1 seul brin d'ADN), comme celui des mitochondries.

Si notre fourchette est juste (méfiance tout de même !), elle situerait les plus anciennes différenciations au sein des espèces de *Chrysocarabus* à la fin du Pliocène (il y a 2,6-2,3 MA) lorsque un épisode de refroidissement, provoque l'englacement des régions arctiques et se répercute fortement sur la flore et la faune européenne.

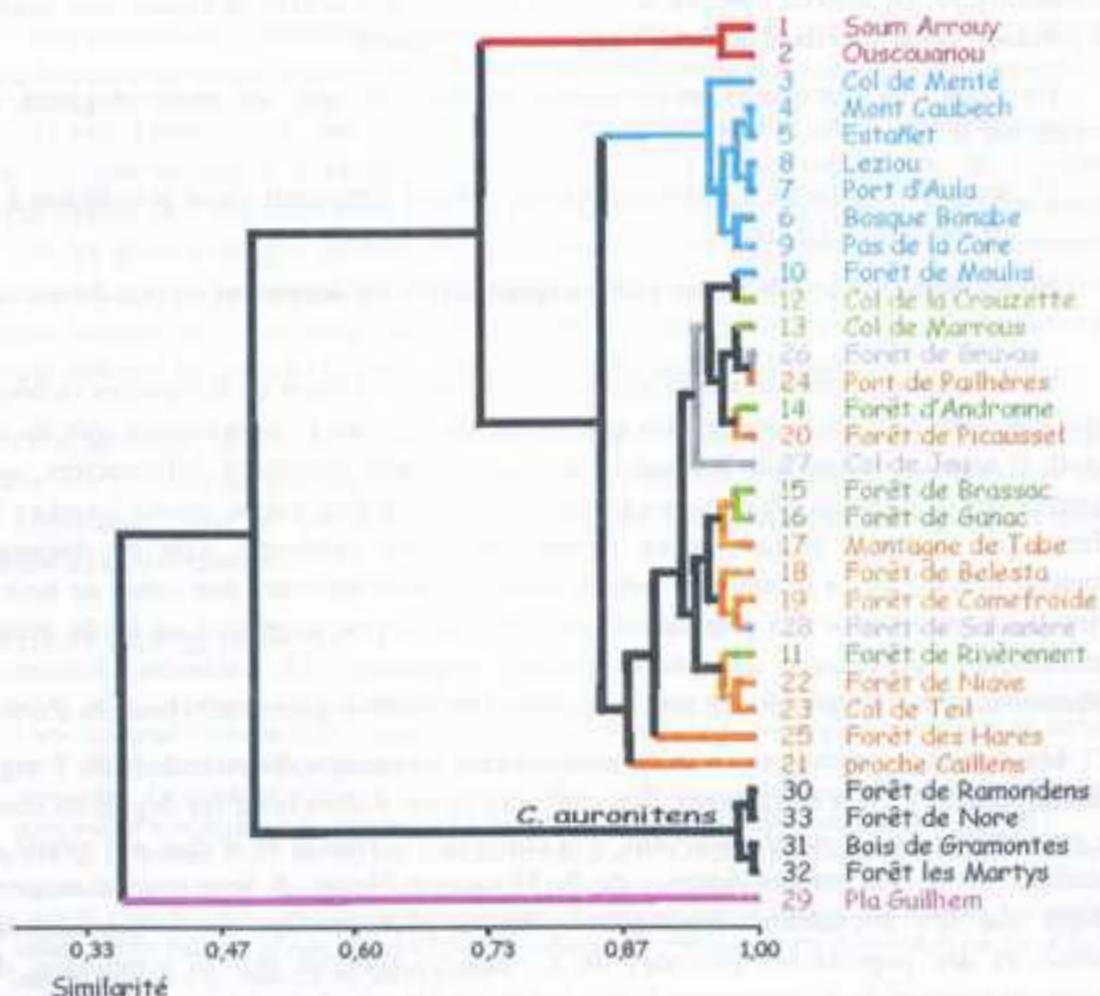
## 2. *C. punctatoauratus* : un carabe casanier, fortement diversifié à l'échelle des Pyrénées

Assmann et Weber (1997) ont récemment publié la première étude globale sur la structure génétique de *C. punctatoauratus* (nous avons récemment débuté une étude similaire avec d'autres marqueurs). Incluant 29 populations, cette analyse met en évidence 4 grands groupes de populations (voir la figure ci-contre) montrant un fort degré de différenciation :

1. *C. punctatoauratus punctatoauratus* (représenté par la natio *canigouensis*).
2. *C. punctatoauratus montanus* (représenté par 2 populations).
3. un ensemble de populations orientales (regroupant des populations proche du col du Menté, de la province de Lérida en Espagne, du mont Vallier et du mont Rouch).
4. le reste des populations analysées (populations centrales) mal regroupées géographiquement.



Distribution des populations étudiées et assignation aux sous-espèces



Arbre de similarité génétique (UPGMA) de 29 populations de *C. punctatoauratus* basé sur l'indice d'identité de Nei (1972). Quatre populations de *C. auronitens* de la Montagne Noire sont utilisées comme groupe externe potentiel (30-32). L'analyse est basée sur 4 loci enzymatiques (AAT-1, EST-X, GPI, 6-GPD) (Assmann et Weber, 1997).

Leur étude montre aussi que les populations de cette espèce sont fortement structurées et que des différenciations importantes peuvent exister entre des populations proches géographiquement. Un moyen d'estimer une différenciation génétique et de calculer l'indice de fixation de Wright ( $F_{st}$ ). Cet indice reflète le niveau des différences de fréquence allélique<sup>5</sup> que l'on peut observer à certains locus<sup>6</sup>, et par conséquent, le degré de divergence génétique entre les populations. Cette divergence génétique est souvent le fruit de la dérive génétique ou de la sélection opérant après la subdivision en populations locales (races ou dèmes). Avec des marqueurs enzymatiques un indice de  $F_{st}$  de l'ordre de 0-0,05 reflète une diversification faible, 0,05-0,15 une diversification modérée, 0,15-0,25 une diversification importante, au dessus de 0,25 la diversification est considérée comme très importante.

Le  $F_{st}$  moyen calculé sur l'ensemble des populations étudiées est de 0,23; ceci reflète un important niveau de diversification de *C. punctatoauratus* sur l'ensemble des Pyrénées. Si on exclut de l'analyse les 3 populations les plus différenciées (Pla-Guilhem, Soum d'Arrouy et

<sup>5</sup> A un emplacement donné sur un chromosome, un même gène peut exister sous différentes formes appelées allèles, la proportion de chacune de ces formes dans une population est la fréquence allélique.

<sup>6</sup> position d'un gène sur un chromosome.

Ouscouanou), le Fst moyen observé se situe à 0,15, ce qui reflète là encore une importante différenciation génétique dans la partie centrale des Pyrénées.

En clair, les marqueurs moléculaires reflètent ce que les entomologistes avertis observent sur le terrain :

- 1) les populations de *C. punctatoauratus* varient fortement d'une population à l'autre (d'une forêt à l'autre);
- 2) *C. punctatoauratus* est un piètre migrant, il ne s'échappe pas ou peu de ses habitats préférés.

Nous étudions actuellement (travaux de C. Brouat) - à l'aide de marqueurs moléculaires de type microsatellite (plus performant que les enzymes) - les *C. punctatoauratus* du plateau de Sault, et nous montrons que là aussi les populations sont fortement différenciées, au point de montrer des différences génétiques significatives au sein d'un même massif forestier !. Ceci confirme que, à basse altitude, cette espèce est plutôt casanière. Elle ne disperse que faiblement, et a du mal à quitter son habitat forestier, pour traverser des zones de bois ou de prairies. En conséquence, les populations dérivent peu à peu acquérant au fil du temps des caractéristiques génétiques et phénotypiques originales. De manière évidente, les *punctatoauratus* de l'étage alpin en font de même et ne quittent guère leurs prairies d'altitude.

Un dernier résultat de cette étude nous ramène, au paragraphe précédent sur l'origine de *C. punctatoauratus*. Afin de disposer d'un référentiel pour hiérarchiser les degrés de similarité entre populations de *C. punctatoauratus*, nos collègues Assmann et Weber ont ajouté quatre populations de *C. auronitens festivus* de la Montagne Noire. A leur grande surprise, ils montrent que ces populations sont génétiquement plus proches de *C. punctatoauratus montanus* et des populations centrales de *C. punctatoauratus* que la population de Pla Guilhem. Autrement dit, *C. punctatoauratus canigouensis* est génétiquement plus proche de *C. auronitens festivus* que de *C. punctatoauratus montanus*, ce qui devrait rassurer certains d'entre-nous et en inquiéter d'autres !. Je rappelle ici que la variabilité enzymatique est l'expression du génome nucléaire et que ces deux formes diffèrent, par ailleurs, fortement par leurs génomes mitochondriaux.

Ils montrent aussi que ces populations (*auronitens festivus*, *canigouensis* et *montanus*) constituent les populations les plus différenciées (elles se situent à la base de l'arbre), tout en se situant géographiquement aux trois extrémités d'un triangle recouvrant l'aire de distribution de *C. punctatoauratus*. Ceci, nous ramène immédiatement à l'hypothèse d'un isolement ancien des populations pyrénéennes à partir d'un ancêtre "*auronitens*". Bien évidemment, il faut se méfier de ce type d'analyse qui n'est pas complètement adapté à révéler les histoires évolutives, cependant la coïncidence est troublante et peut servir d'hypothèse de départ à de futures investigations.

En conclusion, je soulignerai deux faits importants révélés par nos premières études sur *C. punctatoauratus* et qui révèlent tout l'intérêt scientifique de nos magnifiques carabes :

1) une espèce n'est pas forcément complètement isolée génétiquement d'une autre espèce ... contrairement à la pensée courante !. Elle peut, par le jeu de croisements interspécifiques peu fréquents mais fertiles, échanger du matériel génétique avec une autre.

2) les gènes échangés peuvent profiter à l'un ou l'autre des partenaires (ici probablement à *punctatoauratus*), lui permettant de disposer d'un panoplie adaptative plus large, de coloniser de nouveaux habitats etc... (on comprend mieux pourquoi dans le Pays de Sault, *C. punctatoauratus*, fortement mélangé de *splendens*, s'adapte à des conditions de faible altitude...).

Pour terminer, je ne peux que féliciter vivement François Caubet pour cette excellente synthèse sur *C. punctatoauratus* et souligner, n'en déplaise à certains, combien ces travaux sont importants pour le professionnel qui, au delà du modèle biologique, étudie les mécanismes de l'évolution.

### 3. Citations bibliographiques

- Allemand R. et J.C. Malausa. 1984. Compatibilité génétique et distances phylétiques entre les espèces du genre *Chrysocarabus* Thomson (Col., Carabidae). *Annales de la Société Entomologique de France*. **20**: 247-263.
- Assmann T. 1995. Zur Populationsgeschichte des Laufkäfer *Carabus punctatoauratus* Germar und *Carabus auronitens* Fabricius (Coleoptera, Carabidae): über endemismus in eiszeitlichen Refugialräumen und postglaziale arealausweitung. *Osnabruecker Naturwissenschaftliche Mitteilungen*. **20/21**: 225-273.
- Assmann T. et F. Weber. 1997. On the allozyme differentiation of *Carabus punctatoauratus* Germar (Coleoptera, Carabidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. **35**: 33-43.
- Brower A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and conservation among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **91**: 6491-6495.
- Dowling T.E. et C.L. Secor. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **28**: 593-619.
- Düring A., M. Brückner et D. Mossakowski. 2001. Differenzen zwischen gene tree und organismal tree ? Mitochondriale Gene und die Verwandtschaftsbeziehungen der *Chrysocarabus*-Arten. *Entomologica Basiliensia*. (sous presse).
- Malausa J.C., Y. Pujante, J. Drescher et J. Armand. 1984. Preuves génétiques de la synonymie de *Chrysocarabus punctatoauratus* Germar avec *Chrysocarabus auronitens* Fabricius (Coleoptera, Carabidae). *Nouvelle Revue d'Entomologie*. **1**: 359-363.
- Mossakowski D. 1980. Evolution of habitat preference illustrated by the phylogeny of *Chrysocarabus* species (Coleoptera, Carabidae). Pp. 103-112 in Weber F., (ed.). *Den Boer et al. Miscell. papers*. Landb, Hogeschool, Wageningen.
- Prüser F. et Mossakowski. 1998. Low substitution rates in mitochondrial DNA in Mediterranean carabid beetles. *Insect Molecular Biology*. **7**: 121-128.
- Puisségur C. 1964. Recherches sur la génétique des Carabes. (*Chrysocarabus* et *Chaetocarabus*). *Vie et Milieu*. **18 suppl.**: 1-288.
- Rasplus J.Y., S. Garnier, S. Meusnier, S. Piry, P. Audiot et J.M. Cornuet. 2001. Setting conservation priorities : The case study of *Carabus solieri* (Col. Carabidae). *Genetic, Selection and Evolution*.: (sous presse).
- Rasplus J.Y., S. Meusnier, G. Mondor, S. Piry et J.M. Cornuet. 2000. Microsatellite analysis of genetic population structure in the endangered Carabid : *Carabus solieri* (Carabidae). Pp. 11-24 in Brandmayr P. et al., (eds). *Natural History and Applied Ecology of Carabid Beetles*. Pensoft Publishers, Sofia.
- Sota T. et A.P. Vogler. 2001. Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the carabid beetles *Ohomopterus*. *Systematic Biology*. **50**: 39-59.
- Sperling F.A.H. et R.G. Harrison. 1994. Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies. *Evolution*. **48**: 408-422.
- Su Z.-H., T. Ohama, T.S. Okada, K. Nakamura, R. Ishikawa et S. Osawa. 1996. Phylogenetic relationships and evolution of the Japanese Carabinae ground beetles based on Mitochondrial ND5 sequences. *Journal of Molecular Evolution*. **42**: 124-129.

# TABLE DES MATIERES

<b>TOME 1</b>		LES FORMES INDIVIDUELLES	42
<b>DE LA DIVERSITE MORPHOLOGIQUE</b>		LES HYBRIDES	44
INTRODUCTION	5	CONCLUSION	45
REMERCIEMENTS	7	BIBLIOGRAPHIE	47
NOMENCLATURE	9	CARTES DE REPARTITION	I-III
CLASSIFICATION ACTUELLE	10	PLANCHES COULEURS	IV-XV
PHYLOGENIE	11		
BIOLOGIE	15	<b>TOME 2</b>	
ETUDE DES POPULATIONS	19	<b>DE L'ORIGINE ET DE LA DIVERSITE GENETIQUE</b>	
LES PATTES ROUGES	33	FAITS ET HYPOTHESES	50
LES POPULATIONS PATTES ROUGES	35	BIBLIOGRAPHIE	56

La « MONOGRAPHIE DE *Carabus (Chrysocarabus) punctatoauratus* » est une publication de l'Association des Coléoptéristes amateurs du Sud de la France « *Rutifans* ».

Les insectes présentés proviennent de la collection F. CAUBET et pour les formes individuelles et hybrides de A. CAMARD, F. CAUBET, J. LEPLAT, P. MEYER & A. MOLLARD.

Cet ouvrage a été réalisé :

- Pour les prises de vue photographiques par J. LEPLAT & M. DEBREUIL pour la couverture.
- Pour la cartographie par A. MOLLARD.
- Pour la mise en page et le traitement numérique des photos par M. DEBREUIL.
- Pour l'impression par AROBASERVICE à Perpignan en septembre 2001.

