



**HAL**  
open science

# Identification spécifique et structure génétique des populations du papillon-cendre responsable des épisodes de papillonite en Guyane et au Vénézuéla

Marina Ciminera

► **To cite this version:**

Marina Ciminera. Identification spécifique et structure génétique des populations du papillon-cendre responsable des épisodes de papillonite en Guyane et au Vénézuéla. Sciences agricoles. Université de Guyane, 2017. Français. NNT : 2017YANE0016 . tel-01834559v2

**HAL Id: tel-01834559**

**<https://theses.hal.science/tel-01834559v2>**

Submitted on 24 Sep 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# Thèse



En vue de l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université de Guyane**

Discipline : *Sciences et Technologies*

Spécialité : *Écologie*

---

---

Présentée et soutenue publiquement le *11 décembre 2017* par :

**MARINA CIMINERA**

---

---

---

**Identification spécifique et structure génétique des populations du papillon-cendre responsable des épisodes de papillonite en Guyane et au Venezuela**

## **JURY**

Carole KERDELHUÉ	Directrice de Recherches INRA UMR CBGP Montpellier	Rapporteur
Carlos LOPEZ-VAAMONDE	Chargé de Recherches INRA URZF Orléans	Rapporteur
Eric MARCON	Directeur de Recherches INRA UMR EcoFoG Kourou	Examineur
Rodolphe ROUGERIE	Maître de Conférences des Universités, Muséum National d'Histoire Naturelle Paris	Examineur
Marie-Anne AUGER-ROZENBERG	Chargée de Recherches INRA URZF Orléans, HDR	Co-Directrice de Thèse
Niklas TYSKLIND	Chargé de Recherches INRA UMR EcoFoG Kourou	Co-Directeur de Thèse
Alain ROQUES	Directeur de Recherches INRA URZF Orléans	Directeur de Thèse

---

**Ecole Doctorale n°587 : Diversités, Santé et développement en Amazonie**



# Identification spécifique et structure génétique des populations du papillon-cendre responsable des épisodes de papillonite en Guyane et au Venezuela.

## Table des matières

### AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

1. Introduction générale.....	8
1.1. La spéciation : de la population à l'espèce dans le contexte néotropical.....	8
1.2. Les Lépidoptères et autres arthropodes urticants.....	12
1.3. Les agents de la papillonite en Amérique du Sud.....	14
1.4. Mes hypothèses de travail concernant les espèces impliquées dans la papillonite en Guyane.....	17
2. Le Modèle biologique : le Genre <i>Hylesia</i> et l'espèce <i>H. metabus</i> .....	19
2.1. Taxonomie et délimitation des espèces.....	19
2.2. Distribution géographique de l'espèce <i>Hylesia metabus</i> .....	22
2.3. Biologie et écologie d' <i>Hylesia metabus</i> .....	23
2.3.1. Cycle de développement.....	23
2.3.2. Plantes-hôtes d' <i>H. metabus</i> .....	27
2.3.3. Ennemis naturels d' <i>H. metabus</i> .....	29
2.3.4. Impact sanitaire économique et écologique d' <i>H. metabus</i> .....	29
3. Echantillonnage et méthodes d'analyse.....	31
3.1. Stratégie d'échantillonnage.....	31
3.1.1. Les Zones d'études et les méthodes de collectes.....	31
3.2. Outils d'analyse génétique.....	39
3.2.1. Introduction.....	39
3.2.2. Les marqueurs utilisés pour mon étude.....	41
3.2.3. Méthodes d'analyse.....	46
3.3. Méthodes d'études du comportement sexuel d' <i>Hylesia metabus</i> .....	49
3.3.1. Elevage des <i>Hylesia metabus</i> .....	49
3.3.2. Conditionnement.....	49
3.3.3. Alimentation des chenilles et mesures d'hygiène (désinfection des élevages).....	51
3.3.4. Identification de la période d'appel des femelles.....	51
3.3.5. Tentative d'identification de la phéromone sexuelle.....	52
4. Identification des espèces d' <i>Hylesia</i> responsables de la papillonite en Guyane et au Venezuela.....	54
4.1. <i>Hylesia metabus</i> : une unité taxonomique au sein du genre.....	54
4.2. Identification des espèces d' <i>Hylesia</i> responsables de la papillonite en Guyane et au Venezuela.....	57
5. Structure génétique et diversité des populations d' <i>H. metabus</i> lépidoptère responsable de la papillonite en Guyane et au Venezuela.....	60
6. Contribution à la compréhension du comportement sexuel chez <i>Hylesia metabus</i> .....	89
6.1. Aperçu synthétique des phéromones de Lépidoptères Saturniidae et objectifs de l'étude.....	89
6.2. Résultats de l'étude.....	93

6.2.1.	Identification de la période d'appel des femelles d' <i>Hylesia metabus</i> .....	93
6.2.2.	Une identification encore très imparfaite des composés impliqués dans la phéromone sexuelle .....	96
6.3.	Avancées et faiblesses dans la compréhension du comportement sexuel de <i>Hylesia metabus</i> .....	98
6.3.1.	Le rythme d'émission de la phéromone sexuelle chez <i>H. metabus</i> .....	98
6.3.2.	La composition de la phéromone sexuelle d' <i>Hylesia metabus</i> reste toujours une boîte noire .....	99
6.3.3.	Conclusion.....	99
7.	Discussion générale et perspectives .....	101
8.	BIBLIOGRAPHIE.....	108

## Liste des Figures :

<i>Figure 1: Schéma conceptuel du continuum de divergence durant le processus de spéciation. Nosil et al. (2009b).</i> .....	9
<i>Figure 2: Les modes de spéciation géographique</i> .....	11
<i>Figure 3: Dispositif urticant chez Hylesia metabus.</i> .....	15
<i>Figure 4: Synthèse de la classification des espèces d'Hylesia du groupe I</i> .....	21
<i>Figure 5: Synthèse de la classification des espèces d'Hylesia du groupe II</i> .....	22
<i>Figure 6 Aire de répartition d'H. metabus en gris, extrapolée à partir des zones de recensement d'H. metabus de Lemaire (2002) et des coordonnées géographiques des individus représentés dans la base de données Barcode Of Life Database (BOLD- BIN AAA3035)</i> .....	23
<i>Figure 7: Cycle de développement d'H. metabus. Les photographies illustrent les différentes phases de développement : A- dôme de ponte ; B- chenilles néonates; C- et D- chenilles en plaque; E- chenille de dernier stade ; F- chrysalide extraite du cocon ; G- femelle adulte.</i> .....	24
<i>Figure 8: Variation de taille de la capsule céphalique des stades larvaires d'H. metabus tirée de (Vassal, 1989)</i> .....	25
<i>Figure 9 : Dôme de ponte d'H. metabus montrant les soies abdominales recouvrant la ponte, et détails des soies au microscope électronique. (adapté de (Paniz-Mondolfi et al., 2011))</i> .....	26
<i>Figure 10: A- Cocon d' H. metabus ; B- chrysalide d' H. metabus</i> .....	26
<i>Figure 11: a- Position géographique des zones d'études et écorégions concernées ; b- Péninsule Paria ; c- bande côtière Guyanaise ; d'après( <a href="http://maps.tnc.org/">http://maps.tnc.org/</a> )</i> .....	32
<i>Figure 12 : Typologie des habitats de Guyane basée sur les formations végétales, les différents types de sols et l'assemblage de faunistique (Guitet et al., 2015)</i> .....	33
<i>Figure 13 : Schéma du dispositif de piégeage lumineux.</i> .....	34
<i>Figure 14: Position des 14 sites d'échantillonnage sur la bande côtière Guyanaise, Les noms des localités correspondant aux codes mentionnés sur la figure sont détaillés dans les Tableau 2 et 3. ....</i>	35
<i>Figure 15: Variation spatio-temporelle des échantillonnages sur la bande côtière Guyanaise</i> .....	36

<i>Figure 16: Ecorégions de la péninsule Paria et position des 13 sites d'échantillonnage. Les noms des localités correspondant aux codes mentionnés sur la figure sont détaillés dans le Tableau 4. ....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 17: Schéma du Barcoding Gap : écart entre la divergence intra-spécifique (rouge) et les distances interspécifiques (bleu).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 18: Etapes de la réalisation d'une banque enrichie en microsatellites.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 19: Bacs d'élevages des chenilles d'Hylesia.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 20 : Photographie des éclosiers collectifs.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 21: Distribution de la distance génétique (K80) par paire du fragment Cox 1 de 714 séquences d'Hylesia spp.. b, distance par pair classés, c, nombre de groupe parmi lesquels les séquencés ont été partitionnées en fonction des valeurs de de divergence intra-spécifiques. ....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 22 : a) Arbre Neighbour Joining de 774 séquences d'Hylesia (téléchargement à partir de BOLD en rouge des séquences appartenant à H. metabus ; b) Détail du nœud de l'arbre qui regroupe toutes les séquences d'H. metabus. ....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 23: Distance génétiques par paires des séquences du BIN AAA3035 (bleu) et de son BIN le plus proche, tiré de BOLD (rouge). ....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 24: Durées de comportement d'appel des femelles d'H. metabus en fonction des classes d'âge. Des lettres identiques indiquent aucune différence significative entre classes d'âge (p-val&gt;0.01).....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 25: Cumul du nombre de femelles d'H. metabus en appel par tranche de 10 minutes en heure locale, et en minutes depuis le début de la scotophase. ....</i>	<i>95</i>

## **Liste des Tableaux :**

<i>Tableau 1 : Plantes- hôtes d'H. metabus et pays de signalement (adapté de (Vassal, 1989) pour la Guyane et de (Vásquez, 1994) pour le Venezuela.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 2:Détail du nombre de chenilles et d'imagos d'Hylesia capturés sur l'année 2012 en période de pullulation. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 3 : Détail du nombre d'échantillons pour l'année 2014, pour les deux périodes de piégeages, les chiffres en gras représente les échantillons associés aux épisodes de papillonite en ville.....</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 4 : Détail des échantillonnages au Venezuela.....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 5: Identification par la librairie NIST des composés présent dans l'extrait (Hexane).....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 6:Identification par analyse GC-MS des composés capturés par SPME chez les femelles d'Hylesia metabus. Les composés suivis du signe « ? » n'ont pas eu leur identification confirmée.....</i>	<i>97</i>

## Avant-propos et remerciements

Avec plus de 157 500 espèces décrites (Van Nieuwerkerken *et al.*, 2011), les lépidoptères constituent un des groupes d'insectes les plus diversifiés. De par leur présence en abondance dans la quasi-totalité des écosystèmes terrestres, de nombreuses espèces de ce groupe présentent de fortes interactions avec les activités humaines, pouvant générer des impacts conséquents au plan économique, sanitaire ou sociétal (Gurr, Wratten and Snyder, 2012). Alors que certains lépidoptères sont considérés comme bénéfiques en tant que pollinisateurs, sources alimentaires ou encore producteurs de soie, d'autres affectent de manière négative l'agriculture, la foresterie mais aussi la santé humaine (Goldsmith and Marec, 2010). Afin de limiter l'impact de ces dernières espèces, la mise en place de mesures de gestion et de contrôle des populations concernées s'avère indispensable. Cela vaut aussi pour les régions néotropicales, qui sont caractérisées par une grande diversité de lépidoptères, incluant des espèces ayant un large impact, en particulier pour la santé humaine (Dyer, Carson and Leigh, 2012).

Les pullulations de « papillon cendre » attribuées à des espèces du genre *Hylesia*, appartenant à la famille des Saturniidae, constituent ainsi un problème récurrent en Amérique du Sud (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2011). En effet, pour protéger ses œufs des prédateurs, la femelle possède des soies détachables extrêmement urticantes qu'elle est susceptible de libérer dans l'atmosphère (Battisti *et al.*, 2011). L'augmentation des sources de lumière artificielle depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle avec l'urbanisation croissante attire ces papillons nocturnes vers les villes et les villages, où la libération des soies urticantes est susceptible d'affecter l'Homme en générant une douloureuse affection de peau, la « papillonite » (Dinehart *et al.*, 1987). Malgré les enjeux sociaux et économiques liés à la présence récurrente de ces papillons en zones urbaines, leur biologie et leur écologie reste peu connue.

En août 2011, près d'un siècle après la première description de la papillonite en Guyane (Jourdain *et al.*, 2012), la Direction Générale de la Santé du Ministère de la Santé et de l'Action Sociale a saisi le Centre National d'Expertise sur les Vecteurs (CNEV), en lui demandant une mission d'appui sur les stratégies et méthodes de lutte utilisables contre le « papillon cendre ». Parmi les recommandations issues de cette mission du CNEV, figure la mise en œuvre d'une lutte intégrée s'appuyant sur les programmes de recherche vénézuéliens, pays où les mêmes problèmes sanitaires sont observés, ainsi que le développement d'un programme de recherche spécifique en Guyane pour étudier ces papillons en soulignant l'absence de données scientifiques dans cette région. C'est ce dernier constat qui a généré le présent travail de thèse, qui s'inscrit plus globalement dans une thématique d'écologie appliquée ayant comme objectif général l'apport de connaissances sur les papillons responsables de la papillonite en Guyane dans un contexte tropical à forte biodiversité et grande hétérogénéité de milieux (Guitet, Richard-hansen and Surugue, 2015).

## Remerciements

*Ce projet de thèse a bénéficié d'un financement conjoint de la Collectivité territoriale de Guyane, du Fond Social Européen ainsi que du Labex Ceba (CNRS).*



*Merci à Carole KERDELHUE et Carlos LOPEZ-VAAMONDE d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également à Eric MARCON et à Rodolphe ROUGERIE d'être examinateurs de ce travail.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier mes encadrants Alain ROQUES, Marie-Anne AUGER-ROZENBERG et Niklas TYSKLIND.*

*Merci Alain d'avoir toujours été là quand j'en ai eu besoin, même à l'autre bout du monde. Merci Marie-Anne pour ton soutien et ta gentillesse, et de m'avoir si bien accueillie à Orléans, j'avais presque oublié qu'il faisait froid. Merci à Niklas de m'avoir adopté en cours de route et merci pour ton aide au quotidien.*

*Merci à tous les collaborateurs, Pascal GOMBAULD et le PNRG de Guyane, pour leur implication dans mon projet de thèse. Melfran HERERRA, pour les échantillons de palometa peluda mais aussi pour avoir été mon « correspondant papillonite », et j'espère qu'un jour on se rencontrera. Merci à Brigitte FRÉROT, pour son aide sur les méthodes d'extraction de phéromones. Jean-Philippe CHAMPENOIS, pour les collectes d'échantillons. Les agents communaux de Sinnamary, pour leur aide et leur gentillesse, et tout spécialement Charles BERGERE, pour ses connaissances de terrain et pour son aide précieuse. Frederic BENELUZ, pour avoir partagé ses énormes connaissances sur les Hylesia en toute simplicité. Merci à Greg LAMARRE, pour son aide. Je tiens à remercier Frederic ROBIN, pour ces charmants RDV du mercredi.*

*Merci à toute l'équipe de génétique de Kourou, notamment Ivan et Caroline pour leur accueil dans l'équipe. Je tiens à remercier Valérie, pour son aide au labo mais surtout pour avoir pris soin de moi et pour m'avoir écouté quand j'en ai eu besoin. Merci à Eliane pour ces bons moments et également pour son aide quand j'étais perdue. Je tiens particulièrement à remercier Henri, d'avoir partagé mon bureau, ma thèse n'aurait pas été la même sans toi. Merci pour ton aide au labo mais surtout pour m'avoir fait rire autant. Merci à Hadrien pour avoir partagé tous ces bons moments chasse au guppy et autres missions farfelues, mais également pour avoir été présent pendant les mauvais moments.*

*Je remercie également toute l'équipe de zoologie forestière de l'INRA Orléans pour leur accueil.*

*Merci à ma famille de ne pas m'en vouloir d'être partie si loin. Merci à mes grands petits frères et mes petits grands frères, merci à ma sœur et ma mère, pour leur soutien moral par la poste. Un énorme merci à Thibault, pour son soutien au quotidien.*

*Pour finir, je tiens à remercier mon frère Lary, pour son aide notamment sur le terrain, sans qui ma thèse n'aurait pas été possible, cette thèse lui est dédiée.*

# 1. INTRODUCTION GENERALE

---

La forêt tropicale est très diverse et représente un terrain de choix pour décrypter les processus de spéciation à l'origine de la biodiversité. L'identification taxonomique et la délimitation des espèces occupent une position centrale dans les études de biodiversité. Cette identification est rendue difficile chez les insectes phytophages, le plus souvent oligo- ou polyphages, pour lesquels il existe des complexes d'espèces-soeurs, c'est à dire phylogénétiquement proches, et des complexes d'espèces cryptiques, où les espèces ne sont pas phylogénétiquement proches mais non séparables sur des critères morphologiques. Après un bref récapitulatif de la notion d'espèces et des mécanismes de spéciation, je présenterai les lépidoptères modèles de cette étude ainsi que mes hypothèses de travail sur le groupe des papillons impliqués dans la papillonite en Guyane.

## 1.1. La spéciation : de la population à l'espèce dans le contexte néotropical

Bien que l'espèce soit l'unité centrale en biologie et en gestion des insectes, il n'existe pas de consensus strict pour décrire ce qu'est une espèce. Plus d'une vingtaine de définitions ont été proposées et ont fait l'objet de nombreux débats (Coyne and Orr, 2004). Je citerais parmi celles-ci l'approche biologique de l'espèce car elle introduit la notion importante de l'isolement reproductif : "*Species are groups of actually or potentially interbreeding populations, which are reproductively, isolated from other such groups*" (Mayr, 1942). Cette approche définit l'espèce comme un groupe de populations effectivement ou potentiellement inter-féconds, et reproductivement isolés d'autres groupes similaires. Dans la nature, les individus d'une espèce sont généralement organisés en groupes dont les membres ont une chance équivalente de se reproduire entre eux : on parle de populations ou dèmes (Hartl and Grant, 2007). Lorsque les populations sont isolées, elles sont soumises indépendamment à la sélection naturelle et/ou à la dérive, deux moteurs de l'évolution conduisant à la différenciation graduelle des populations. La résultante des forces évolutives en l'absence de migration peut conduire les populations à se différencier et engendrer de nouvelles espèces. La spéciation est généralement un processus non instantané (sauf dans des cas de spéciation génétique issue de duplication de génome ou de distribution irrégulières de chromosomes- voir Wood et al., 2009), auquel correspond un gradient de différenciation morphologique et génétique et sur lequel la plupart des concepts s'accorde. Lors du processus de spéciation, il existe des étapes conceptuelles de divergences, tel que les populations, les races ou les espèces (De Queiroz 2005).

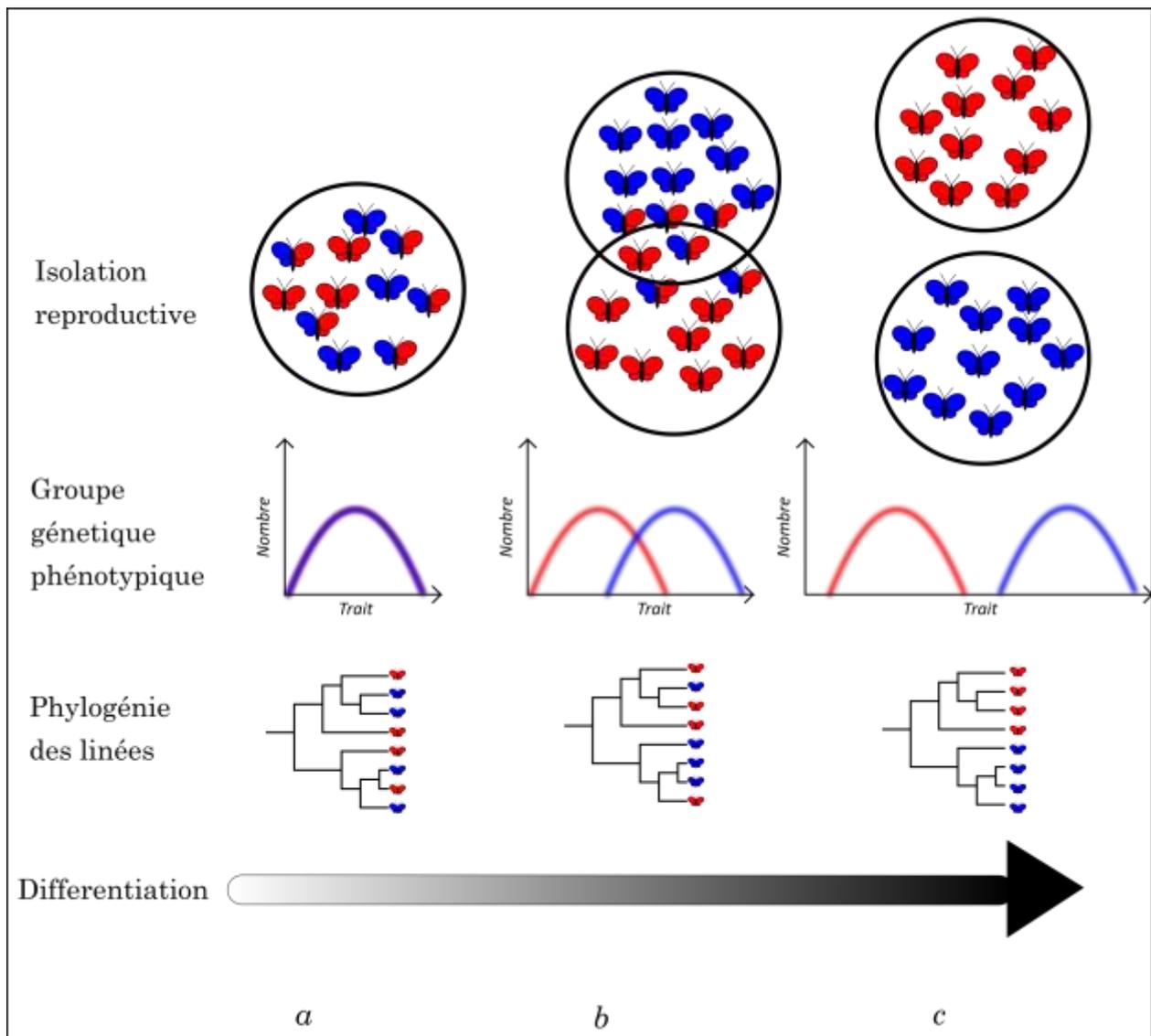


Figure 1: Schéma conceptuel du continuum de divergence durant le processus de spéciation. Les couleurs représentent le polymorphisme, phénotypique ou génétique. Les cercles représentent des populations, c'est-à-dire, des ensembles d'individus qui se reproduisent entre eux. Les courbes représentent la distribution de phénotypes ou génotypes. De gauche à droite les étapes conceptuelles de la différenciation : a- une population unique aux trait variables parmi les individus, et où les individus se reproduisent entre eux de façon aléatoire; b- deux populations dont les membres se reproduisent de façon non homogène, mais toujours capable de produire des individus intermédiaire ; c- deux espèce distinctes où les traits sont complètement assortis entre les deux groupes. Modifié à partir de Nosil *et al.* (2009b).

Les espèces sont les entités discrètes qui constituent des ensembles différenciés de façon irréversible au cours du temps. Les espèces peuvent être délimitées en utilisant différents critères (De Queiroz, 2007). Les critères de ressemblances anatomiques sont le plus communément utilisés pour reconnaître des espèces. Cependant la découverte contemporaine de nouvelles espèces reflète rarement la description de nouvelles formes morphologiques (Vogler and Monaghan, 2007). Au lieu de

cela, de nouvelles espèces sont généralement découvertes lors de réévaluations de taxons existants à l'aide de multiples approches incluant le comportement, l'écologie, et les marqueurs moléculaires, en conjonction avec une analyse morphologique traditionnelle. Bien que les différences morphologiques puissent être subtiles et donc facilement omises, les divergences génétiques au sein d'une même espèce indiquent souvent une diversité cryptique pouvant diriger l'analyse taxonomique.

La spéciation peut être abordée en fonction des liens géographiques qui existent entre l'espèce nouvellement formée et l'espèce ancestrale (Fitzpatrick, Fordyce and Gavrillets, 2009): la **spéciation allopatrique** est la formation d'espèces par isolement géographique avec des barrières physiques à la reproduction (Figure 2 a). La rupture de l'aire de répartition de l'espèce mère en populations géographiquement disjointes est qualifiée de **vicariante** lorsque l'isolement reproducteur scinde l'espèce ancestrale en deux ensembles d'effectifs équivalents. La spéciation allopatrique est qualifiée de **péripatrique** lorsque la population isolée est de petite taille entraînant un effet fondateur (Templeton, 1980) (Figure 2 b). La spéciation allopatrique peut être induite par des reconfigurations à grande échelle du paysage qui isolent des populations anciennement continues, telles que la séparation des continents par la tectonique des plaques, l'élévation des montagnes ou la formation de grands fleuves. La spéciation **parapatricque** est un mode de spéciation sans isolement reproducteur complet, les populations échangeant des migrants (Figure 2 c). Ce mode de spéciation peut être la résultante d'isollements engendrés par un gradient environnemental, tel que l'altitude ou la pluviométrie. La spéciation **sympatrique** a été la plus controversée car elle implique la formation d'espèces sans isolement géographique (Figure 2d). Dans ce cas, l'isolement reproductif est induit par la sélection naturelle et/ou sexuelle. Plus récemment la théorie de la **spéciation écologique** a été proposée : elle implique que les barrières reproductives soient induites par une sélection divergente liée à des adaptations au milieu (Rundle and Nosil, 2005). La spéciation écologique peut se produire sous tous les scénarios géographiques et suppose que, dans un environnement hétérogène, des individus présentent un avantage sélectif (taux de survie et de reproduction plus élevé) pour certaines conditions environnementales.

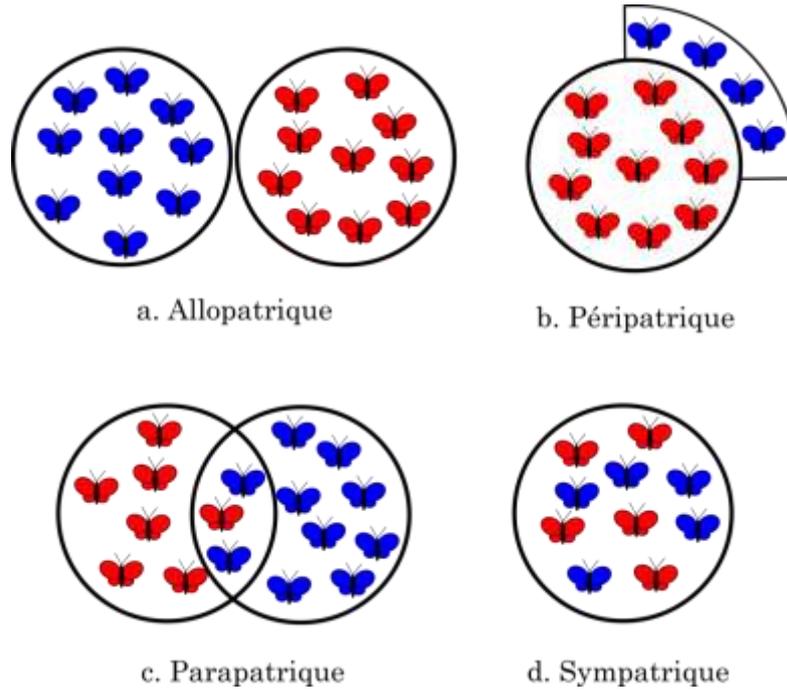


Figure 2: Les modes de spéciation géographique

La recherche sur les lépidoptères tropicaux, notamment du genre *Heliconius* (Nymphalidae) a contribué à améliorer la compréhension des mécanismes de spéciation écologique et sexuelle (Merrill *et al.*, 2015). Les premiers évolutionnistes ont été attirés par le mimétisme frappant du groupe. Les lignées divergentes ont convergé à plusieurs reprises sur les mêmes modèles phénotypiques d'alerte, une observation qui a conduit Henry Walter Bates à développer la théorie du mimétisme (Bates, 1862). Bates a ensuite interprété les différences entre les populations géographiques comme un soutien à l'hypothèse de Darwin sur l'évolution des espèces (Darwin, 1859). Plus récemment, les études de génomique ont joué un rôle important dans les débats sur l'évolution de l'architecture génétique de l'adaptation et de la spéciation (Merrill *et al.*, 2015).

Pour le milieu forestier néotropical, plusieurs théories concurrentes mais non exclusives permettraient d'expliquer les différenciations intra-spécifiques et la spéciation, après développement de mécanismes d'isolement génétique (Haffer, 1969). La diversification des lépidoptères néotropicaux a fréquemment été débattue en référence à la « théorie des refuges » (Brown, Sheppard and Turner, 1974), qui propose des taux élevés de spéciation allopatric résultant de la fragmentation des forêts tropicales. Ainsi, la théorie des refuges explique les assemblages faunistiques actuels par la fragmentation de l'habitat au cours des derniers cycles glaciaires. Cependant, des preuves croissantes suggèrent que l'orogénèse andine a également favorisé la diversification par spéciation allopatric tout en présentant de nouvelles opportunités pour la spéciation écologique (Elias, Joron and Willmott, 2009). Les modèles spatio-temporels de différenciation génétique sont discordants chez les dif-

férentes familles de lépidoptères et ne sont pas conciliables avec un modèle unique reliant la spéciation et la distribution des patrons de différenciation uniquement au changement de paysage (Matos-Maraví *et al.*, 2013).

## 1.2. Les Lépidoptères et autres arthropodes urticants

En réponse à certaines contraintes biotiques et abiotiques, les arthropodes ont développé des mécanismes de défense notamment comportementaux, chimiques et morphologiques, incluant le développement de soies aux propriétés urticantes (Battisti *et al.*, 2011; Greeney, Dyer and Smilanich, 2012). Cet appareil urticant correspond en fait à des poils modifiés qui ont perdu tout ou en partie de leur fonction sensorielle, habituellement observée chez de nombreux arthropodes. Ces poils microscopiques ou vraies soies urticantes (true setae en anglais) varient dans leur structure et leur mode d'action (Battisti *et al.*, 2011). Il faut les distinguer des épines venimeuses, qui appartiennent aussi au système de défense de certains arthropodes.

Les épines venimeuses possèdent des connexions nerveuses intra-tégumentaires, impliquées dans des fonctions sensorielles et sont répandues chez les chenilles de lépidoptères (Battisti *et al.*, 2011). Ce sont des armatures chitineuses pouvant être ramifiées, en particulier chez les Saturniidae, et qui sont alors appelées scoli (scolus pour l'épingle unique à l'extrémité de l'abdomen) (Figure 3). Cette structure permet la production et le stockage de venin, inoculé uniquement par contact direct avec la chenille (Hossler, 2010). Ces structures tubulaires creuses possèdent à leurs bases des cellules sécrétrices spécialisées. Chez certaines espèces, les épines, renouvelables entre les mues, peuvent être extrêmement venimeuses. C'est le cas notamment des chenilles de *Lonomia obliqua* (Saturniidae) possédant des enzymes pro-coagulantes et fibrinolytiques, capables d'entraîner des hémorragies sévères, parfois létales chez l'homme (Fritzen *et al.*, 2004).

Les vraies soies sont des structures ne possédant pas de connexion nerveuse avec le tégument, et sont facilement détachables. Leur forte densité par individu et leur extrême facilité à se détacher ainsi que leur rémanence dans l'environnement représentent un des principaux risques pour la santé humaine lié aux lépidoptères (Battisti, Larsson and Roques, 2017). L'apparition des vraies soies s'est produite dans des lignées éloignées d'arthropodes, notamment chez des araignées de la famille des *Theraphosidae* et les lépidoptères (Battisti *et al.*, 2011). Bien que non démontrée, leur apparition suggère une convergence évolutive de protection contre les prédateurs. En effet la principale fonction évoquée dans la littérature implique la protection par la dissuasion des prédateurs, et il a été émis l'hypothèse que des mécanismes défensifs se rapporteraient distinctement à chaque type de prédateur, vertébrés ou arthropodes (Cooper, 2005).

Les effets de plusieurs mécanismes défensifs étant souvent associés, peu d'études ont démontré expérimentalement l'efficacité des propriétés urticantes

(Gentry and Dyer, 2002; Greeney *et al.*, 2012). L'action sur les vertébrés est ainsi complexe car la réaction est provoquée à la fois par la pénétration des soies dans les tissus des vertébrés et l'inoculation de substances susceptibles de provoquer des réactions inflammatoires (Hossler, 2010). Les réactions apparaissent généralement avec un certain délai, ce qui rend difficile la compréhension de la fonction de protection. Une fois dans l'air, les soies peuvent se disperser à des kilomètres et persister dans l'environnement pendant plusieurs années (Maier *et al.*, 2003; Petrucco Toffolo *et al.*, 2014). Néanmoins, il a été établi que certains vertébrés évitent les arthropodes qui présentent des soies urticantes (Cooper, 2005). Chez certaines espèces, les soies urticantes sont parfois associées à des signaux d'avertissement notamment chez les araignées (Cooke, Roth and Miller, 1972; Pérez-Miles, 2002). L'agrégation des œufs et des larves de lépidoptères (Battisti *et al.*, 2011) est couramment associée aux soies urticantes (Mappes, Marples and Endler, 2005), laissant supposer que l'agrégation permettrait de renforcer l'apprentissage de l'évitement des chenilles urticantes par les vertébrés (Ruxton, Sherratt and Speed, 2004). Moins d'études ont concerné les effets sur les invertébrés prédateurs mais la fonction de protection des masses d'œufs contre les invertébrés a été démontrée chez différentes espèces de papillons, notamment chez les *Hylesia* (Cabrera *et al.*, 2016).

L'ingestion involontaire d'arthropodes ou de leurs soies urticantes est fréquente chez les animaux à sang chaud et peut avoir des conséquences dramatiques, entre autres la nécrose de la langue chez les animaux domestiques, chiens et chats, et le bétail (Roques, 2015) et l'avortement précoce chez les chevaux (Perkins *et al.*, 2016).

Chez l'Homme, les propriétés urticantes des vraies soies de certains arthropodes sont susceptibles de provoquer des pathologies variées (Moneo *et al.*, 2015). Lorsqu'elles impliquent les lépidoptères, les pathologies se distinguent en fonction du stade qui les provoque. On parle d'érucisme pour les chenilles et de lépidoptérisme ou de papillonite pour les adultes (Hossler, 2010). La distinction des symptômes basée sur les réactions locales est compliquée, car d'une part les soies libérées par les arthropodes peuvent être dispersées à longue distance dans l'environnement (Battisti *et al.*, 2011), et d'autre part des réactions généralisées peuvent apparaître sur des endroits du corps non directement touchés (Moneo *et al.*, 2015). Bien que la majorité des lésions provoquées soit des dermatites de contact passagères, certains symptômes peuvent être plus graves, notamment des lésions oculaires et respiratoires, des manifestations systémiques, cardiaques et neurologiques (Mullens, 2009). Des réactions allergiques associées à des IgE (anticorps) sont également susceptibles de se manifester chez une partie non négligeable de la population comme cela a été montré pour la chenille de la processionnaire du pin, pouvant éventuellement conduire à des chocs anaphylactiques (Moneo *et al.*, 2015). Dans la grande majorité des cas, ces pathologies impliquent des chenilles (Mullens, 2009). Toutefois dans certains pays ce sont les papillons adultes responsables de lépidoptérisme ou de papillonite qui revêtent une importance sanitaire (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2011). Leurs propriétés urticantes, leur grande mobilité associée à l'attractivité qu'exercent sur eux les lumières artificielles favorisent les envenimations chez

l'homme. Plusieurs espèces présentant des abondances importantes ou ayant des comportements favorisant l'interaction avec l'homme sont capables de provoquer des pseudo-épidémies à travers le monde (Battisti *et al.*, 2017).

### 1.3. Les agents de la papillonite en Amérique du Sud

Parmi les espèces en forte interaction avec l'Homme, celles du genre néotropical *Hylesia* (Saturniidae), ont une importance particulière car elles induisent des affections de masse parmi la population humaine dans plusieurs pays d'Amérique du Sud (Polar *et al.*, 2010). Le genre *Hylesia* Hübner comprend environ 110 espèces en Amérique du Sud, réparties du Mexique à l'Argentine (Lemaire, 2002). Plusieurs d'entre elles ont été identifiées comme responsables de problèmes de santé humaine. La papillonite causée par les individus du genre *Hylesia* a été initialement décrite par Légger et Mouzels en 1918 en Guyane et confirmée en Argentine par Dallas en 1926, puis de nouveau par Boyé en 1932 en Guyane. La papillonite a reçu le statut d'« épidémie estivale » en Argentine par Jörg en 1933. La papillonite a connu une forte notoriété médicale vers le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle en raison de nombreux cas attribués à *Hylesia urticans* Floch et Abonnenc, 1944, aujourd'hui synonyme d'*Hylesia metabus* Cramer, 1775, (Lemaire, 2002). En effet, des papillons de cette espèce, attirés par les lumières des bateaux, ont causé une dermatite de masse parmi les équipages de pétroliers du port fluvial de Caripito au Venezuela (Dinehart *et al.*, 1985). Dans ce pays, les cas de papillonite ont été si invalidants qu'ils ont entraîné des conflits syndicaux et ont été finalement reconnu comme maladie du travail (Berg, 1982). En Argentine, la papillonite fréquemment provoquée par *H. nigricans* chez les personnes travaillant dans les plantations d'arbres fruitiers a reçu le même statut juridique (Casalá *et al.*, 1967). *H. nigricans* a aussi été reconnue responsable des épidémies de papillonite dans le sud du Brésil et en Uruguay (Salomon *et al.*, 2005). Au Brésil, des épidémies de dermatites causées par *Hylesia paulex* Dognin, 1922 ont été signalées de 1989 à 1991 à São Paulo (Glasser *et al.*, 1993). Des épisodes de papillonite provoqués par *H. alinda* Druce ont enfin été signalés au Mexique (Specht, Formentini and Corseuil, 2006). Cependant, les espèces de ce genre ont une morphologie adulte très similaire et présentent un dimorphisme sexuel marqué. L'identification spécifique est donc difficile tout comme la possibilité de relier mâles et femelles d'une même espèce (Lemaire, 2002). De ce fait de nombreuses notifications d'épidémies de papillonite ne mentionnent pas le nom de l'espèce incriminée (Glasser *et al.*, 1993).

En définitive, il semble que les soies urticantes de la plupart des espèces d'*Hylesia* sont susceptibles de provoquer une dermatite chez les humains (Lemaire, 2002). Les travaux sur les propriétés urticantes des *Hylesia* ont ainsi montré que, quelle que soit l'espèce incriminée, l'urtication provient de deux types de soies abdominales présentes uniquement sur les derniers segments des papillons femelles, appelées respectivement type S3 et type S4 (Lamy *et al.* 1982; Cabrera *et al.* 2016). Le type S3 est connecté à un réservoir intra-tégumentaire entouré de cellules pos-

sédant des fonctions de sécrétion qui sont responsables de la production de substances urticantes (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2011). Ces soies possèdent un canal central creux, sont très légères, et facilement transportées par le vent. Les barbules (petites pointes) à leur extrémité rendent leur élimination extrêmement difficile une fois enfoncées dans le derme, et elles sont la cause des réactions inflammatoires. Leur fonction semble double, d'une part pour éviter les prédateurs, les oiseaux et les chauves-souris avant l'accouplement et d'autre part pour protéger les œufs des prédateurs avant la période d'éclosion. Les soies de type S4 sont des structures en forme de faucille d'environ 1 mm longitudinalement. Chez *H. metabus*, ces types de soies se trouvent exclusivement sur l'abdomen des femelles qui les déposent sur leurs œufs afin de former la couche principale de protection externe de la ponte (Cabrera *et al.*, 2016). Ainsi, les prédateurs doivent traverser la barrière urticante, dense et compacte, pour accéder aux œufs. En outre, la texture visiblement poilue du dôme de ponte peut être interprétée par les prédateurs comme un signal aposématique (Cabrera *et al.*, 2016). Il semble que les *Hylesia* aient développé ce système de protection pendant le processus évolutif afin de défendre leur descendance et donc garantir le succès de la reproduction (Cabrera *et al.*, 2016).

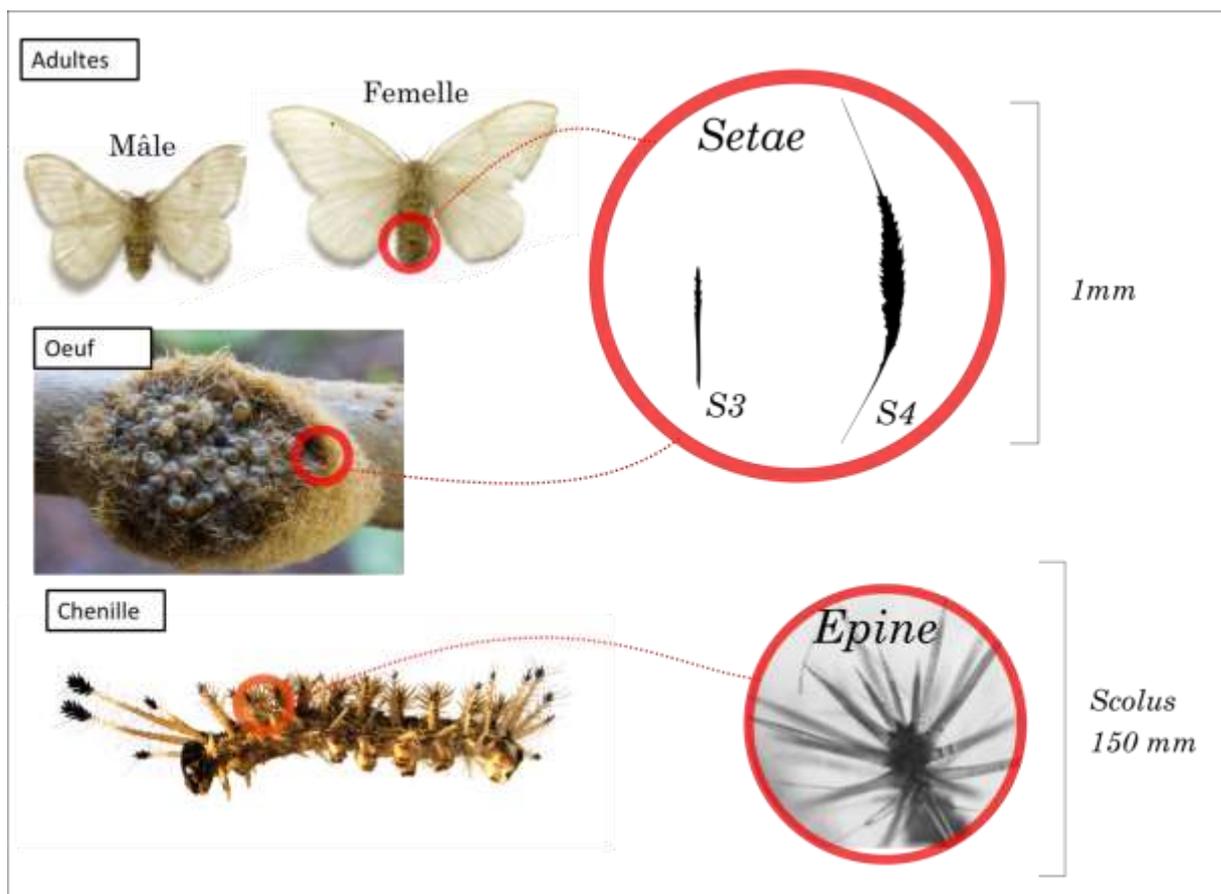


Figure 3: Dispositif urticant chez *Hylesia metabus*.

La papillonite attribuée à l'espèce *Hylesia metabus* constitue un problème récurrent en Guyane. *H. metabus* semble répandue à faible altitude en Amérique du Sud avec une distribution englobant le Pérou, l'Équateur, la Bolivie, le Guyana, le Venezuela, le Suriname, la Guyane et la partie nord du Brésil (Lemaire, 2002). En outre, depuis le siècle dernier, la quasi-totalité des pullulations de cette espèce a été signalée dans les zones côtières du Venezuela et de la Guyane (Jourdain *et al.*, 2012). Une invasion de *H. metabus* a également été récemment observée pour la première fois à Trinidad (Polar *et al.*, 2010). Comme indiqué précédemment, les espèces d'*Hylesia* présentent au stade adulte des caractéristiques de discrimination morphologique parfois ambiguës qui, associées à une quasi totale méconnaissance des stades juvéniles, laissent présager de probables erreurs d'identifications des espèces elles-mêmes, mais également de leur plantes-hôtes (Janzen *et al.*, 2012). En effet, bien qu'*H. metabus* ait été décrite comme forestière et polyphage par Lemaire (2002), il est communément considéré que c'est une espèce associée aux milieux de mangroves (Lemaire, 2002), puisque d'après la littérature (Jourdain *et al.*, 2012), les invasions urbaines proviendraient de migrations de papillons depuis la mangrove vers les zones habitées sous l'effet de l'attraction par les lumières des zones urbanisées. Par ailleurs, ce sont fréquemment les mêmes communes qui sont périodiquement envahies après la tombée de la nuit par les papillons, même si la plupart des villes de Guyane sont situées dans les zones côtières à proximité des mangroves.

Cependant, les descriptions de comportement alimentaire des chenilles d'*Hylesia* diffèrent entre Guyane et le Venezuela. Les chenilles sur le territoire Guyanais ont été décrites comme associée préférentiellement au palétuvier blanc (*Avicennia germinans*) tandis que les chenilles du Venezuela sont considérées associées principalement au palétuvier rouge (*Rhizophora mangles*) alors que les deux espèces d'arbres sont présentes dans les mangroves du littoral des deux territoires. En outre, la répartition exacte des populations hors pullulations et leurs préférences écologiques ne sont connues que de façon très imparfaite (Lemaire, 2002; Dyer *et al.*, 2012).

Au niveau temporel, les épisodes de papillonite sont ponctuels et irréguliers et il est difficile de retracer avec certitude les événements de pullulation passés car les cas de papillonite recensés se basent sur les symptômes perçus sur les populations humaines, et sont généralement attribués à *H. metabus* par le corps médical sans vérification taxonomique (Jourdain *et al.*, 2012). Les pullulations se produisent de manière non cyclique et sont vraisemblablement plus fréquentes en fonction de l'augmentation de l'urbanisation (Jourdain *et al.*, 2012). Les pullulations sont asynchrones à l'échelle du continent et plus localement sur le territoire guyanais, contrairement à ce qui est généralement observé chez les lépidoptères qui pullulent en forêt (Franklin, Myers and Cory, 2014).

Afin d'élaborer des politiques spécifiques de régulation de ces lépidoptères visant à protéger d'une part la population humaine et d'autre part la biodiversité, il est important de clarifier ces points pour mettre en place des stratégies de lutte efficaces de prévention et de contrôle des populations de ces insectes urticants dans l'intérêt des populations humaines. A l'heure actuelle, les épisodes de papillonite en

milieux urbains sont non prévisibles et souvent gérés en catastrophe une fois la pullulation installée.

## 1.4. Mes hypothèses de travail concernant les espèces impliquées dans la papillonite en Guyane

Les hypothèses de travail que j'ai cherché à tester et valider ont donc été les suivantes : Au vue des différences observées entre le Venezuela et la Guyane, mais aussi entre régions de la Guyane, j'ai fait l'hypothèse de l'implication possible de plusieurs espèces du genre *Hylesia* dans les épisodes de papillonite en Guyane. J'ai tenté de vérifier cette hypothèse par des méthodes moléculaires, notamment par l'utilisation de marqueurs mitochondriaux.

Ma seconde hypothèse est basée sur l'observation de nombreuses espèces d'*Hylesia* en forêt très loin de la côte, y compris *H. metabus* (Lemaire, 2002). On peut donc supposer que les mouvements de populations lors des gradations ne proviennent pas des mangroves comme considéré jusqu'à maintenant mais peuvent procéder d'autres milieux, en particulier forestier. Pour répondre à cette question, j'ai développé des marqueurs microsatellites que j'ai utilisés pour étudier la structure génétique des populations à une échelle locale (la Guyane) et régionale (Guyane vs Venezuela), dans l'optique d'identifier l'origine des individus responsables des pullulations urbaines.

Dans une optique plus appliquée, j'ai cherché à préciser des traits d'histoire de vie des populations impliquées dans les épidémies, et en particulier les mécanismes de communication chimique des adultes, pouvant à terme conduire à la définition de pièges attractifs pour la surveillance du développement des épidémies.

Le manuscrit qui suit s'articule donc en six parties. Le 2<sup>ème</sup> chapitre présente le modèle biologique, c'est-à-dire les espèces du genre *Hylesia*. Un 3<sup>ème</sup> chapitre indique le matériel et les méthodes utilisés, notamment l'échantillonnage, le choix et le développement des outils moléculaires ainsi que les méthodes d'élevages et les tests comportementaux. Le 4<sup>ème</sup> chapitre détaille les résultats des analyses moléculaires visant à clarifier le statut taxonomique des insectes responsables des épisodes de papillonite en Guyane, et à analyser leur proximité génétique avec les spécimens collectés au Venezuela. Le 5<sup>ème</sup> chapitre présente l'étude de structuration génétique des populations de l'espèce *Hylesia metabus* en Guyane et au Venezuela. Un 6<sup>ème</sup> chapitre traite des mécanismes de reconnaissances des partenaires sexuels chez cette même espèce, *Hylesia metabus*. La dernière partie correspond à une discussion générale sur les résultats de ces travaux de thèse, ainsi que leurs perspectives

d'applications dans la gestion de la papillonite et le contrôle des populations d'insectes impliqués en Guyane, et plus largement en Amérique du Sud.

## 2. LE MODELE BIOLOGIQUE : LE GENRE *HYLESIA* ET L'ESPECE *H. METABUS*

---

### 2.1. Taxonomie et délimitation des espèces

Le genre *Hylesia* appartient à la famille des Saturniidae, qui est la plus riche en nombre d'espèces de la super-famille des Bombycoidea au sein de l'ordre des Lépidoptères. Les Saturniidae comptent ainsi au moins 1861 espèces recensées, réparties en 62 genres et neuf sous-familles (Lemaire and Minet, 1998). Parmi ces dernières, la sous-famille des Hemileucinae, dans laquelle est rangé le genre *Hylesia*, contient 49 genres incluant environ 670 espèces (Lemaire, 2002). Le genre *Hylesia* est un groupe complexe comprenant plus de 110 espèces en Amérique du sud, dont plus de 30 ont été répertoriées en Guyane (Lemaire 2002). Les adultes sont des individus généralement faiblement colorés, aux motifs alaires peu marqués, et présentant un important polymorphisme intra-spécifique ainsi qu'un fort dimorphisme sexuel

La taxonomie du genre reste assez confuse car reposant sur des caractères morphologiques relativement peu discriminants. Initialement établi par Hübner en 1820 avec comme espèce-type *Phalaena Bombyx canitiace* (Hübner, 1820), le genre a ensuite été combiné avec deux autres genres par Dyar en 1913 (Lemaire *et al.*, 1998). Claude Lemaire, lors de sa révision des Saturnidés Américains entre 1973 et 2002, a ensuite réorganisé le genre *Hylesia* en deux groupes en fonction du nombre d'éperons présents sur les tibias prothoraciques, mésothoraciques et métathoraciques. Le Groupe I de formule tibiale (0, 2, 3) pour les éperons compte environ 69 espèces (Figure 4), divisées en 4 sous-groupes, chacun étant difficilement séparable, dont le sous-groupe des *Hylesia canitia* lui-même subdivisé en 7 assemblages d'espèces très similaires entre elles. Le Groupe II de formule tibiale (0, 2, 2) est divisé en 15 sous-groupes contenant 42 espèces au total (Figure 5).

Pour différencier les adultes de ces espèces, l'habitus est cependant un critère diagnostique peu pertinent vu la forte ressemblance entre espèces au sein du genre, de plus souvent associée à une forte variabilité au sein d'une même espèce. Les genitalia, qui sont souvent de bons critères diagnostiques chez les insectes, ne permettent pas de différencier les espèces des complexes du groupe I (Lemaire, 2002). De même le bord antérieur du fronto-clypeus, qui lorsqu'il est développé est appelé «

protubérance frontale » (Michener, 1952), n'est discriminant que pour les espèces du Groupe II. Le nombre d'articles antennaires ne permet pas non plus de séparer les complexes d'espèces du groupe I. Les imagos d'*Hylesia*, qui ne s'alimentent pas, présentent généralement une forte réduction des pièces buccales (Lemaire & Minet, 1998), et les palpes labiaux et les galeae sont similaires au sein des complexes d'espèces du groupe I (Lemaire, 2002). Les fléchettes abdominales sont présentes sur toutes les femelles d'*Hylesia* aux niveaux des segments 4 à 7 de l'abdomen (Lemaire, 2002). Ainsi les caractéristiques anatomiques des imagos bien que largement explorées par les entomologistes ne permettent pas d'identifier avec précision les espèces du groupe I.

Les caractéristiques des œufs et des stades larvaires sont également très peu renseignés. L'écologie et la biologie ne sont décrites, et encore très partiellement, que pour quelques espèces : *H. metabus* (Fornés and Hernández, 2000), *H. nigricans* (Specht *et al.*, 2006), *H. lineata* (Pescador, 1995), *H. paulex* (Pereira *et al.*, 2009) et *H. metaphira* (Specht, Formentini and Corseuil, 2007).

L'espèce *H. metabus*, considérée comme responsable des épisodes de papillonite en Guyane (Vassal, 1989; Polar *et al.*, 2010; Jourdain *et al.*, 2012), a été classée dans le sous-groupe *canitia* du Groupe I, y formant un assemblage avec huit autres espèces (Figure 4). *H. metabus* a été précédemment mise en synonymie avec *H. obsoleta* Cramer 1780, *H. boarmia* Hübner 1820 *H. grisoli* Bouvier 1923 *H. urticans* Floch et Abonnenc 1944, et *H. caripitox* Orfila 1952. Cependant, à l'heure actuelle il n'existe pas de phylogénie des espèces d'*Hylesia* permettant de valider cette classification, ni la délimitation des espèces, voire des assemblages d'espèces.

	Sous-groupe	Assemblage d'espèces	Espèce
	<b>Groupe I</b>		<i>Hylesia bouvereti</i>
		<i>Hylesia canitia</i>	<i>Hylesia canitia</i> Cramer, 1780 <i>Hylesia composita</i> Dognin, 1912 <i>Hylesia fallaciosa</i> Lemaire, 2002 <i>Hylesia mortifex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia arayex</i> Dognin, 1922 <i>Hylesia leites</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia paulex</i> Dognin, 1922
		<i>Hylesia continua</i>	<i>Hylesia canopus</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia colimattfex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia continua</i> Walker, 1865 <i>Hylesia cressida</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia peigleri</i> Lemaire, 2002 <i>Hylesia zonex</i> Draudt, 1929 <i>Hylesia medfex</i> Dognin, 1916 <i>Hylesia rubrifrons</i> Schaus, 1911 <i>Hylesia venezuelensis</i> Lemaire, 2002
<i>Hylesia canitia</i>		<i>Hylesia metabus</i>	<i>Hylesia ascodex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia athlia</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia cedamribus</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia metabus</i> Cramer, 1775 <i>Hylesia natex</i> Draudt, 1929 <i>Hylesia oblonga</i> Lemaire, 2002 <i>Hylesia olivenca</i> Schaus, 1927 <i>Hylesia paraguayensis</i> Lemaire, 2002 <i>Hylesia melanops</i> Lemaire, 2002
		<i>Hylesia rex</i>	<i>Hylesia beneluzi</i> Lemaire, 1988 <i>Hylesia andensis</i> Lemaire, 1988 <i>Hylesia coex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia falcifera</i> Huebner, 1825 <i>Hylesia maurex</i> Draudt, 1929 <i>Hylesia terranea</i> Schaus, 1906 <i>Hylesia obtusa</i> Dognin, 1923 <i>Hylesia aratex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia vindex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia nigricans</i> Berg, 1875 <i>Hylesia orbifex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia remex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia rex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia munonia</i> Schaus, 1927 <i>Hylesia schuessleri</i> Strand, 1934 <i>Hylesia subcana</i> Walker, 1855 <i>Hylesia violactea</i> Draudt, 1929
		<i>Hylesia rufex</i>	<i>Hylesia rufex</i> Draudt, 1929
		Non classées	<i>Hylesia alticola</i> Lemaire, 1988 <i>Hylesia andrei</i> Dognin, 1923 <i>Hylesia angulex</i> Draudt, 1929 <i>Hylesia biolleya</i> Schaus, 1927 <i>Hylesia colombex</i> Dognin, 1923 <i>Hylesia discifex</i> Draudt, 1929 <i>Hylesia humilis</i> Dognin, 1923 <i>Hylesia invidiosa</i> Dyar, 1914 <i>Hylesia inficita</i> Walker, 1865 <i>Hylesia murex</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia nigripes</i> Draudt, 1929 <i>Hylesia pauper</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia pearsoni</i> Lemaire, 2002 <i>Hylesia tinturex</i> Schaus, 1921
		<i>Hylesia gamelioides</i>	<i>Hylesia gamelioides</i> Michener, 1952
		<i>Hylesia lineata</i>	<i>Hylesia bertrandi</i> Lemaire, 1982 <i>Hylesia hawksi</i> Lemaire, Wolfe and Monzon, 2001 <i>Hylesia hubbelli</i> Lemaire, 1982 <i>Hylesia isla</i> Dyar, 1913 <i>Hylesia lineata</i> Druce, 1886 <i>Hylesia subaurea</i> Schaus, 1900
		<i>Hylesia nanus</i>	<i>Hylesia metapyrrha</i> Walker, 1855 <i>Hylesia nanus</i> Walker, 1855 <i>Hylesia scortina</i> Draudt, 1929

Figure 4: Synthèse de la classification des espèces d'*Hylesia* du groupe I

	Sous-groupe	Espèce
<b>Groupe II</b>	<i>Hylesia acuta</i>	<i>Hylesia acuta</i> Druce, 1886
		<i>Hylesia dyarex</i> Schaus, 1921
		<i>Hylesia hamata</i> Schaus, 1911
		<i>Hylesia tapabex</i> Dyar, 1913
		<i>Hylesia tapareba</i> Dyar, 1913
		<i>Hylesia travassosi</i> Lemaire, 1988
	<i>Hylesia aeneides</i>	<i>Hylesia aeneides</i> Druce, 1897
		<i>Hylesia anchises</i> Lemaire, 1988
	<i>Hylesia annulata</i>	<i>Hylesia maranensis</i> Lemaire, 1976
		<i>Hylesia annulata</i> Schaus, 1911
	<i>Hylesia cottica</i>	<i>Hylesia cottica</i> Schaus, 1932
		<i>Hylesia ileana</i> Schaus, 1932
		<i>Hylesia penai</i> Lemaire, 1988
		<i>Hylesia subcottica</i> Lemaire, 2002
	<i>Hylesia dalina</i> <i>Hylesia ebalus</i>	<i>Hylesia dalina</i> Schaus, 1911
		<i>Hylesia ebalus</i> Cramer, 1775
<i>Hylesia gigantex</i>	<i>Hylesia gigantex</i> Draudt, 1929	
	<i>Hylesia gigantex arbana</i> Schaus, 1911	
<i>Hylesia indurata</i>	<i>Hylesia egrex</i> Draudt, 1929	
	<i>Hylesia indurata</i> Dyar, 1910	
<i>Hylesia melanostigma</i>	<i>Hylesia gyrex</i> Dyar, 1913	
	<i>Hylesia melanostigma</i> Herrich-Schaeffer, 1855	
<i>Hylesia praeda</i>	<i>Hylesia haxairei</i> Lemaire, 1988	
	<i>Hylesia index</i> Dyar, 1913	
	<i>Hylesia praeda</i> Dognin, 1901	
	<i>Hylesia rufipes</i> Schaus, 1911	
<i>Hylesia rosacea</i>	<i>Hylesia mymex</i> Dyar, 1913	
	<i>Hylesia pallidex</i> Dognin, 1923	
	<i>Hylesia rosacea</i> Schaus, 1911	
	<i>Hylesia thaumex</i> Draudt, 1929	
	<i>Hylesia subfasciata</i> Dognin, 1916	
	<i>Hylesia teratex</i> Draudt, 1929	
<i>Hylesia roseata</i>	<i>Hylesia tiphys</i> Dognin, 1916	
	<i>Hylesia nigridorsata</i> Dognin, 1912	
<i>Hylesia santaelenensis</i>	<i>Hylesia roseata</i> Dognin, 1914	
	<i>Hylesia santaelenensis</i> Lemaire, 1988	
<i>Hylesia umbrata</i>	<i>Hylesia ferrosex</i> Dognin, 1916	
	<i>Hylesia umbrata</i> Schaus, 1911	
	<i>Hylesia umbratula</i> Dyar, 1915	
<i>Hylesia vassali</i>	<i>Hylesia frederici</i> Lemaire, 1993	
	<i>Hylesia vassali</i> Lemaire, 1988	

Figure 5: Synthèse de la classification des espèces d'*Hylesia* du groupe II

## 2.2. Distribution géographique de l'espèce *Hylesia metabus*

*H. metabus* est une espèce fréquente à basse altitude en Amérique du sud, mais sa distribution géographique n'est pas connue avec précision. La carte présentée à la Figure 6 détaille l'aire de répartition d'*H. metabus* extrapolée à partir des don-

nées de Lemaire (2002) auxquelles j'ai ajouté les données disponibles sur *Bold data system*.

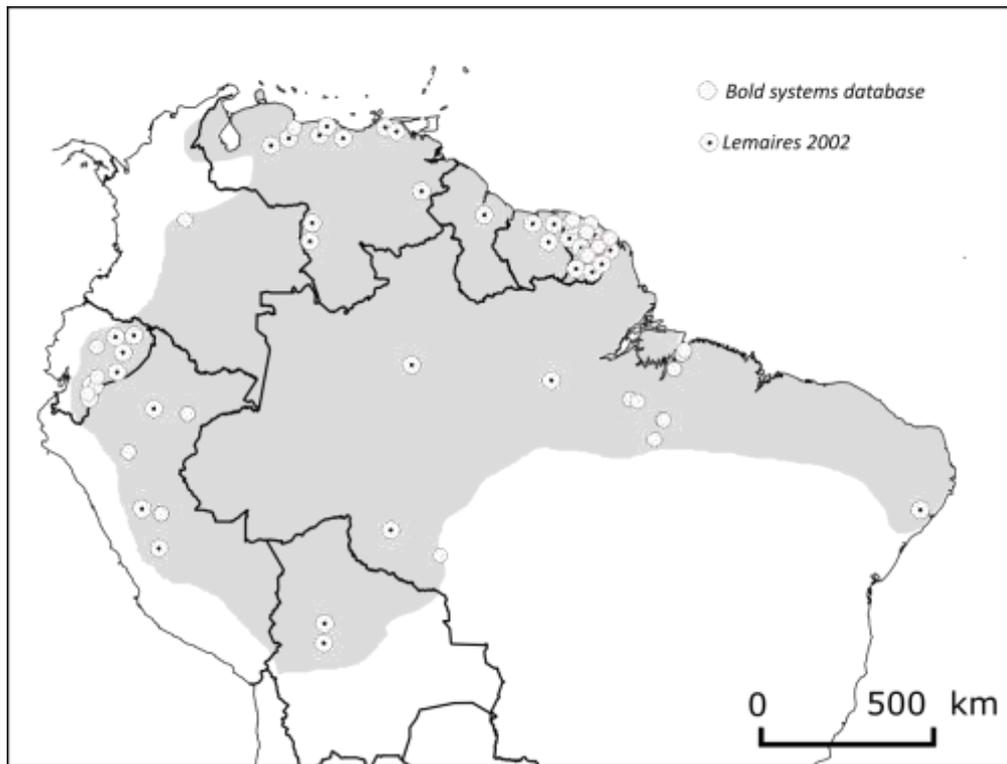


Figure 6 Aire de répartition d'*H. metabus* en gris, extrapolée à partir des zones de recensement d'*H. metabus* de Lemaire (2002) et des coordonnées géographiques des individus représentés dans la base de données Barcode Of Life Database (BOLD- BIN AAA3035)

L'aire de répartition géographique de l'espèce semble ainsi correspondre au nord du bassin amazonien, du Venezuela au nord du Brésil.

## 2.3. Biologie et écologie d' *Hylesia metabus*

### 2.3.1. Cycle de développement

Le cycle de développement d'*H. metabus* dure environ 3 mois, variant de 80 à 101 jours, et pouvant produire de trois à quatre générations non chevauchantes par an (Figure 7). Les femelles émettent une phéromone sexuelle capable d'attirer les mâles (Liendo-Barandiaran, Herrera and Hernández, 2007). Elles adoptent une posture caractéristique, ailes semi-dépliées, avec la dernière partie de l'abdomen tendue et déployant une glande à phéromones (Fornés *et al.*, 2000). L'accouplement

a lieu une seule fois au cours de la vie d'un individu et dure une dizaine d'heures environ (Fornés *et al.*, 2000). La nuit suivant l'accouplement les femelles volent jusqu'au lieu de ponte où elles déposent leurs œufs, le plus souvent sur une branche fine (Vassal, 1989).

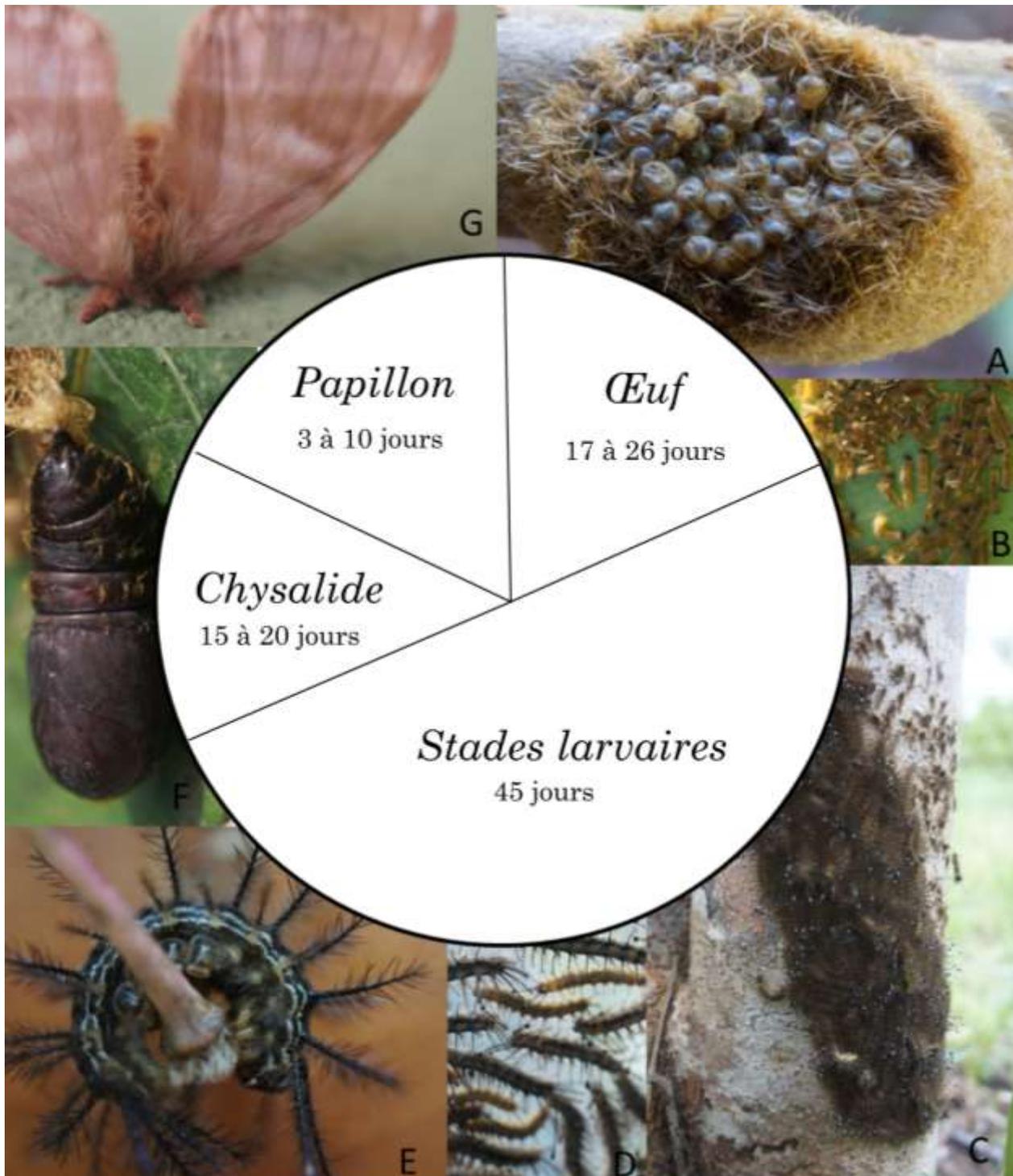


Figure 7: Cycle de développement d'*H. metabus*. Les photographies illustrent les différentes phases de développement : A- dôme de ponte ; B- chenilles néonates ; C- et D- chenilles en plaque ; E- chenille de dernier stade ; F- chrysalide extraite du cocon ; G- femelle adulte.

L'oviposition a lieu en une seule fois par paquet unique, de 200-300 œufs en moyenne, formant un dôme de ponte de 5 à 10 mm de long (Figure 9). Les œufs adhèrent entre eux à l'aide d'une matrice collante. La femelle recouvre la ponte de ses soies abdominales urticantes, créant une barrière dense, compacte et hautement urticante (Figure 9). Les propriétés physico-chimiques des soies protègent ainsi les œufs de la dessiccation et des attaques de prédateurs et pathogènes (Cabrera *et al.*, 2016). L'incubation des œufs dure de 17 à 26 jours en fonction de la température (Vassal, 1989).

L'éclosion des jeunes chenilles se produit durant les premières heures de la matinée, ces chenilles rongent le chorion et se regroupant sur le dôme de ponte jusqu'à l'éclosion de la totalité des œufs du dôme. Assemblées d'abord en plaque sur le tapis de soies, les chenilles se chargent passivement de ces soies urticantes en partant ensuite en procession pour se nourrir sur le feuillage de l'arbre. Les chenilles se nourrissent la nuit *sur les* feuilles et se regroupent le jour en plaques sur le tronc des arbres hôtes (Figure 7 C). Les chenilles du premier stade mesurent 3 mm de longueur et 0.5 mm de largeur. Le développement larvaire passe ensuite par sept stades, chacun durant environ une semaine pour une durée moyenne totale de 45 jours. A partir du 3<sup>ème</sup> stade les chenilles possèdent des épines urticantes (scoli). Les différents stades larvaires se distinguent par la taille de la capsule céphalique (Figure 8). A la fin de leur vie larvaire les chenilles perdent leur comportement grégaire et se dispersent dans le feuillage des arbres alentour pour se nymphoser.

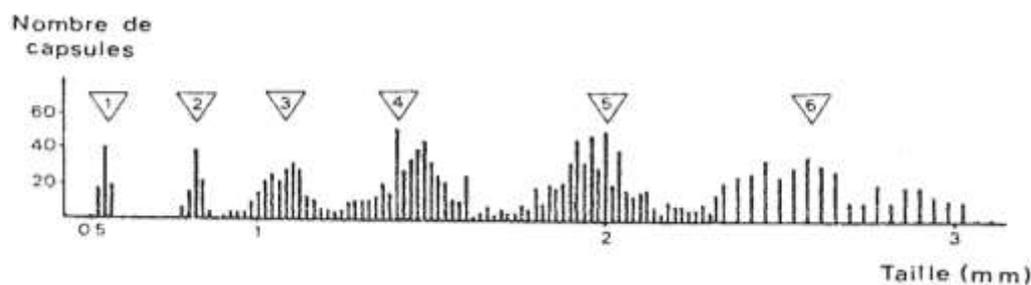


Figure 8: Variation de taille de la capsule céphalique des stades larvaires d'*H. metabus* tirée de (Vassal, 1989)

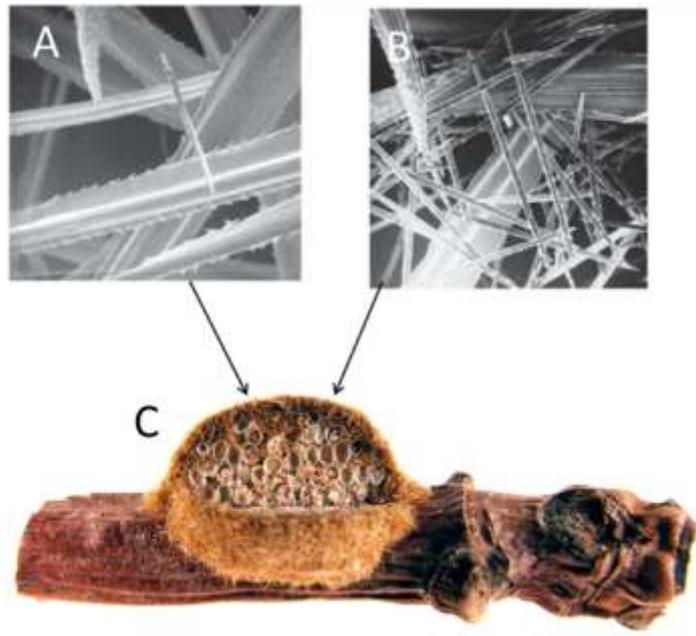


Figure 9 : Dôme de pont de *H. metabus* montrant les soies abdominales recouvrant la ponte, et détails des soies au microscope électronique. (adapté de (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2011) )

Avant la nymphose, la chenille tisse un cocon entre deux feuilles qu'elle relie avec de la soie. La chrysalide, de couleur brun foncé, pèse entre 500 et 600 mg chez la femelle et 300 à 400 mg chez le mâle. Le stade nymphal dure entre 15 et 20 jours.



Figure 10: A- Cocon d' *H. metabus* ; B- chrysalide d' *H. metabus*

L'émergence est caractérisée par un phénomène de protandrie, celle des mâles se produisant en moyenne cinq jours avant celle des femelles (Vassal, 1989). La sortie des imagos a lieu le matin sur une période temporelle différente selon le sexe : entre 7h à 12h pour les mâles et entre 9h et 10h pour les femelles. Selon les auteurs, la durée de vie des adultes varie de 3 à 10 jours (Vassal, 1989; Fornés *et al.*, 2000). Les *Hylesia* ont une activité crépusculaire, qui débute approximativement 30 minutes après le coucher du soleil. Les périodes de vol débutent vers 19h et s'étendent jusque 22h en Guyane (Vassal, 1989) mais au Venezuela deux périodes de vol ont été décrites entre 18h et 24h (Fornés *et al.*, 2000).

Les adultes d'*H. metabus* présentent un dimorphisme sexuel caractéristique. Les mâles, plus petits, possèdent des antennes pectinées alors que les femelles ont les antennes filiformes. Une forte variabilité morphologique existe au niveau de la coloration des ailes. Certains individus présentent un morphe dit « rosé », avec des ailes claires, presque transparentes. Le morphe dit « brun », plus sombre, tend vers le gris-noir. Les ailes présentent des motifs de couleur (rayures bandes, taches) qui peuvent être bien marqués ou pratiquement absents chez les deux morphes.

### 2.3.2. Plantes-hôtes d'*H. metabus*

*H. metabus* est une espèce décrite comme forestière par Lemaire (2002). De par son observation en mangrove lors des épisodes de pullulations, elle est souvent considérée comme inféodée au palétuvier (Vassal 1989; Jourdain *et al.* 2012). Cependant, les chenilles sont capables de se développer sur de nombreuses plantes-hôtes, représentant plus d'une vingtaine d'espèces d'arbres appartenant à 21 familles botaniques (Tableau 1). Des discordances de plantes-hôtes ont été signalées entre Guyane et Venezuela (Jourdain *et al.*, 2012), avec notamment des préférences alimentaires rapportées pour le palétuvier rouge (*Rhizophora mangle*) au Venezuela et pour le palétuvier blanc (*Avicennia germinans*) en Guyane. Au stade imaginal, *H. metabus* ne se nourrit pas.

Tableau 1 : Plantes- hôtes d'*H. metabus* et pays de signalement (adapté de (Vassal, 1989) pour la Guyane et de (Vásquez, 1994) pour le Venezuela.

<i>Famille</i>	<i>Espèces</i>	<i>Pays de recensement</i>
Anacardiacées	<i>Anacardium occidentale</i>	Guyane et Venezuela
	<i>Mangifera indica</i>	Guyane
	<i>Tapirira guianensis</i>	Guyane
Annonacées	<i>Annona squamosa</i>	Guyane
	<i>Guatteria sp.</i>	Guyane
Bignoniacées	<i>Jacaranda copaia</i>	Guyane
Bixacées	<i>Bixa orellana</i>	Guyane
Clusiacées	<i>Vismia guianensis</i>	Guyane

<i>Famille</i>	<i>Espèces</i>	<i>Pays de recensement</i>
Combrétacées	<i>Laguncularia racemosa</i>	Guyane et Venezuela
	<i>Terminalia catappa</i>	Guyane
Euphorbiacées	<i>Croton matourensis</i>	Guyane
	<i>Hura crepitans</i>	Guyane et Venezuela
	<i>Maprounea guianensis</i>	Guyane
	<i>Sapium glandulosum</i>	Guyane
Fabacées	<i>Erythina poeppigiana.</i>	Venezuela
	<i>Inga edulis.</i>	Venezuela
Hypericacées	<i>Vismia sp.</i>	Venezuela
Malpighiacées	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Guyane
Moracées	<i>Cecropia obtusa</i>	Guyane
Myristicacées	<i>Virola sebifera Aubl.</i>	Venezuela
Myrtacées	<i>Eucalyptus sp.</i>	Guyane
	<i>Psidium guajava</i>	Guyane
	<i>Psidium guava</i>	Venezuela
	<i>Syzygium cumini.</i>	Venezuela
	<i>Syzygium malaccence.</i>	Venezuela
Pipéracées	<i>Piper aduncum</i>	Guyane
Polygonacées	<i>Coccoloba latifolia</i>	Guyane
Rhizophoracées	<i>Rhizophora mangle</i>	Venezuela
Rubiacées	<i>Isertia coccinea</i>	Guyane
Rutacées	<i>Citrus sp.</i>	Guyane
Simaroubacés	<i>Simaba credron.</i>	Venezuela
Sterculiacées	<i>Theobroma cacao</i>	Guyane
Verbénacées	<i>Avicennia germinans</i>	Guyane et Venezuela

### 2.3.3. Ennemis naturels d'*H. metabus*

*Hylesia metabus* subit à tous les stades de son cycle de développement une mortalité due aux prédateurs, parasitoïdes et pathogènes, impactant la densité de ses populations. Parmi les prédateurs d'*H. metabus*, des hémiptères Reduviidae telles que *Arilus cristatus* (Hemiptera: Reduviidae) et *Harpactor angulosus* (Pereira et al., 2009) ont été rapportées s'attaquant aux chenilles. Les parasitoïdes principaux d'*H. metabus* comptent des diptères, *Belvosia* spp. (Tachinidae) et *Sarcodexia lambens* (Sarcophagidae), ainsi que des hyménoptères des genres *Enicospilus*, *Conura*, *Podogaster*, *Brachymeria* et *Tetrastichus* (Hernández et al., 2009b).

Les bactéries, les champignons et les virus jouent également un rôle très important dans la régulation naturelle des populations d'*H. metabus*. Les pupes et les chenilles peuvent être attaquées par le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Jourdain et al., 2012) et les souches de *Bacillus thuringiensis* sérotype «israelensis» ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* ont été considérées comme responsables d'épizooties chez *H. metabus* (Osborn et al. 2002; Vassal 1989). Des viroses ont également été observées mais leurs agents n'ont, à ce jour, pas fait l'objet d'identifications (Jourdain et al., 2012).

### 2.3.4. Impact sanitaire économique et écologique d'*H. metabus*

L'impact sanitaire des *H. metabus* est difficilement quantifiable car les cas de papillonite sont généralement sans gravité. Dans la majorité des cas, les personnes atteintes ne consultent ainsi pas de spécialistes. Les épisodes répétés de papillonite ont cependant des impacts sociaux-économiques pour les communes fréquemment touchées, notamment lorsque des couvre-feux sont instaurés, entraînant la fermeture des commerces et générant par conséquent, une possible atteinte à la sécurité des biens et des personnes (CNEV, 2011).

Au Venezuela (zone de Paria), le budget de mars 2004 pour la mise en œuvre de traitement biocide sur une superficie de 20 000 hectares infestés par *H. metabus*, s'est élevé à 1,5 milliard Bolivars ce qui, couplé aux coûts de la surveillance estimés à 680 millions de bolivars par an, représente une charge budgétaire très importante pour l'Etat Vénézuélien (Osborn, 2005).

Bien que les chenilles soient capables de défolier totalement un arbre, les impacts écologiques majeurs liés à la présence d'*H. metabus* proviennent essentiellement des traitements biocides utilisés pour prévenir la papillonite. A l'heure actuelle, aucun traitement ciblé n'est en effet disponible. Le *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) a été précédemment utilisé en Guyane pour lutter contre les chenilles d'*Hylesia metabus* (Vassal 1989), et l'est encore au Venezuela (Osborn *et al.*, 2002). Cet insecticide impacte toutes les chenilles de lépidoptères et représente donc un risque pour les espèces de lépidoptères non cibles (Osborn, 2005). Le malathion a également été utilisé (Jourdain *et al.*, 2012), ce produit est désormais interdit d'utilisation. Lors des pullulations dans la région de Kourou, la deltaméthrine a aussi été utilisée autour de l'aéroport de Rochambeau et sur la mangrove le long de la route menant à l'embarcadère Guatémala à Kourou (Vassal, 1989). Certains traitements de deltaméthrine ont été réalisés par épandages aériens au niveau des zones de mangroves proches de la ville de Kourou (Jourdain *et al.*, 2012). Ce produit possédant des propriétés toxiques sur les crustacés et autres organismes aquatiques, il n'est pas approprié pour le traitement des milieux de mangroves.

## 3. ECHANTILLONNAGE ET METHODES D'ANALYSE

---

### 3.1. Stratégie d'échantillonnage

Ma stratégie d'échantillonnage a été élaborée en fonction des hypothèses de travail formulées à la fin du premier chapitre. J'ai ainsi tenté de procéder à un échantillonnage systématique de toutes les zones où des épisodes de papillonite avaient été rapportées afin de préciser si une seule ou plusieurs espèces sont impliquées. J'ai également échantillonné en Guyane et au Venezuela par rapport aux différences de biologie répertoriées (plantes-hôtes notamment), et enfin mes échantillonnages ont concerné des zones écologiques différentes (mangrove, villes, forêt) et en conditions différentes de gradation pour tenter de comprendre les mouvements spatiaux et temporels.

#### 3.1.1. Les zones d'études et les méthodes de collectes

Les collectes d'échantillons ont porté sur deux zones néotropicales ayant abrité la majorité des épidémies de lépidoptérisme recensées depuis 1918 : a- la bande côtière Guyanaise, et b- la péninsule Paria située dans l'état de Sucre au Venezuela (Figure 11). Situées dans des régions côtières néotropicales, ces deux zones sont distantes l'une de l'autre de plus de 1000 km et, à elles deux, englobent cinq biomes différents (Olson and Dinerstein, 1998).

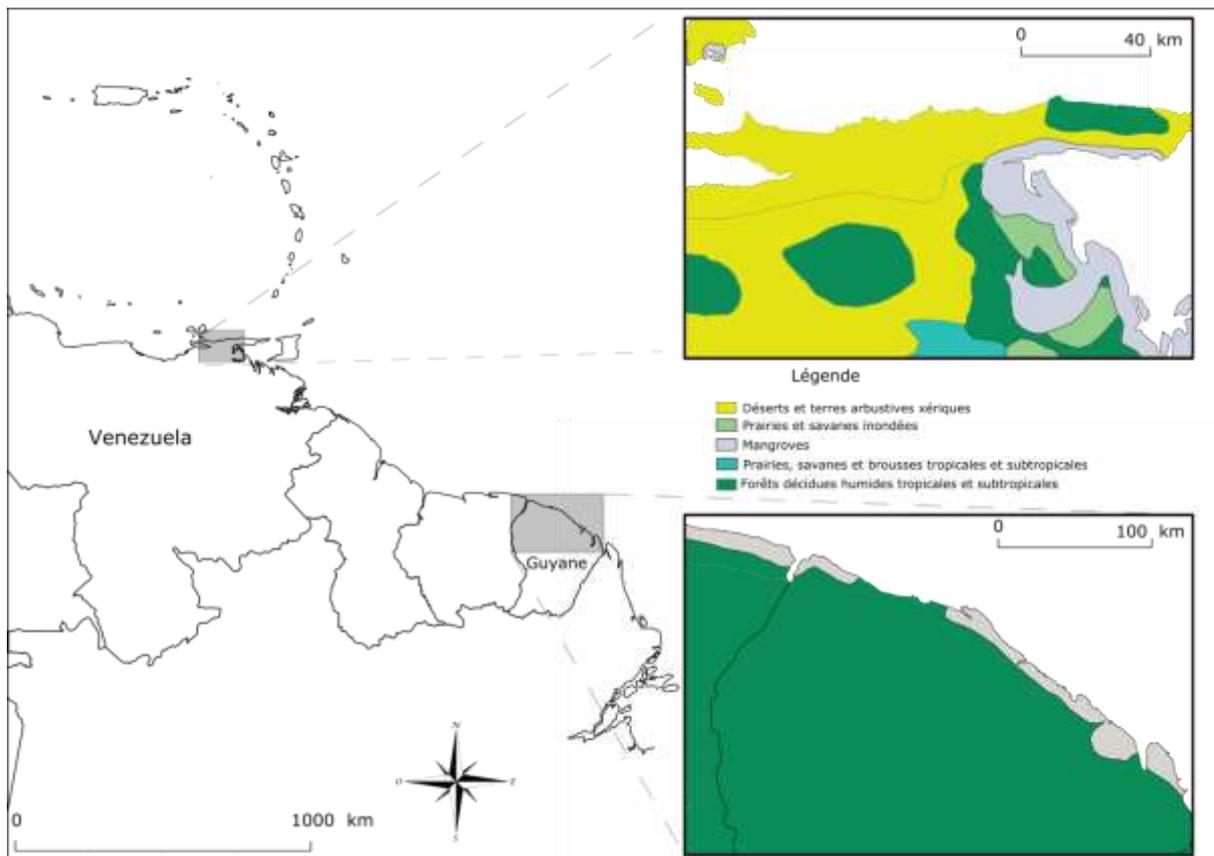


Figure 11: a- Position géographique des zones d'études et écorégions concernées ; b- Péninsule Paria ; c- bande côtière Guyanaise ; d'après ( <http://maps.tnc.org/>)

### 3.1.1.1. La bande côtière Guyanaise

#### 3.1.1.1.1. Caractéristiques bioclimatiques

La première zone correspond au littoral atlantique de Guyane, qui s'étend sur plus de 380 km de côte. La Guyane est située sur la côte Nord-Est du continent sud-américain, entre 2° - 5° de latitude Nord et 51° - 54° de longitude Ouest. Territoire français d'outre-mer de 90 000 km<sup>2</sup> elle est couverte à plus de 95 % par la forêt dense tropicale humide (Gond *et al.*, 2011). La Guyane présente une mosaïque d'habitats à l'échelle locale et régionale, qui possèdent des caractéristiques géomorphologiques, botaniques et faunistiques propres (Guitet, 2015) (Figure 12) . La bande littorale (10-20 km de la cote) représente 782.000 ha, recouvert à 73% de milieux naturels, dont 66,51 % constitués de forêts (Guitet *et al.*, 2015).

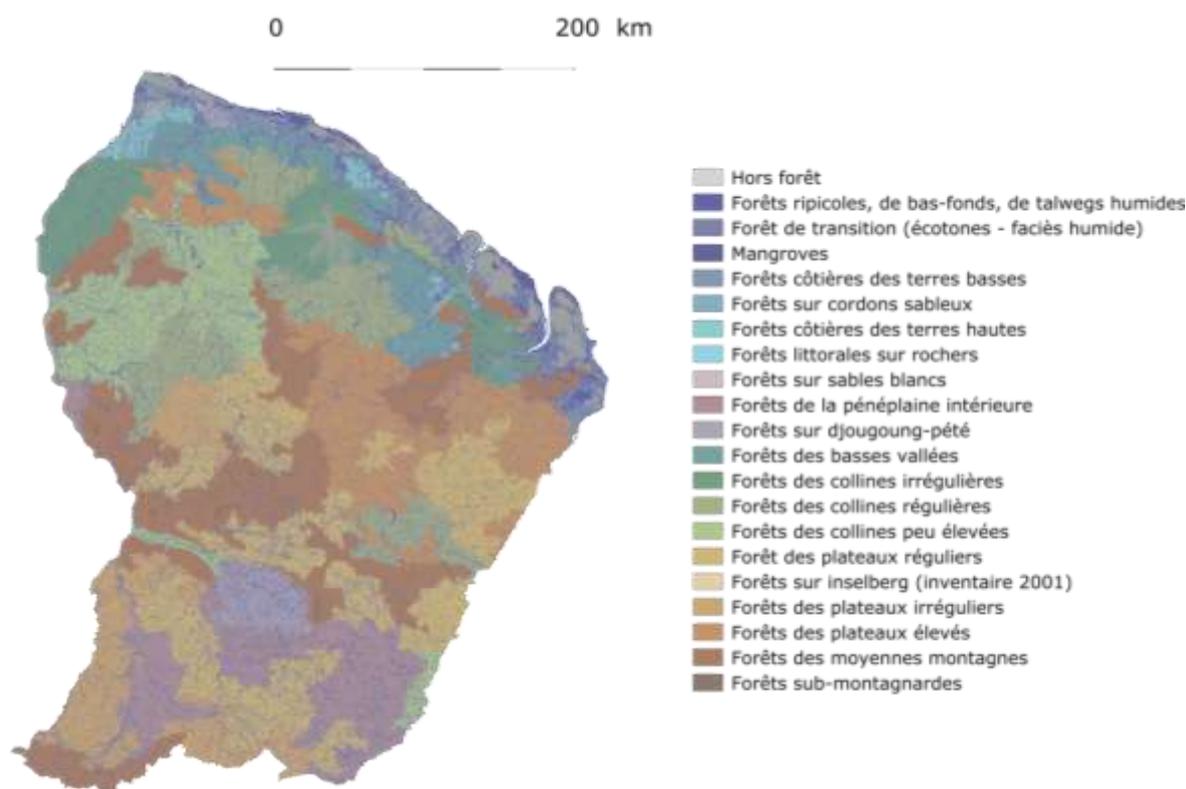


Figure 12 : Typologie des habitats de Guyane basée sur les formations végétales, les différents types de sols et l'assemblage de faunistique (Guitet *et al.*, 2015)

Située sur le bouclier des Guyanes, la Guyane possède un climat tropical caractérisé par deux saisons sèches inégales, la première en mars et la seconde, plus longue, de mi-juillet à novembre durant laquelle les précipitations sont inférieures à 50 mm (Bonal *et al.*, 2008). Les variations annuelles sont influencées par le mouvement ondulatoire saisonnier de la Zone Intertropicale de Convergence (ZIC), courant atmosphérique de basse pression où convergent les alizés des deux hémisphères (anticyclone des Açores et de Sainte Hélène) (Shaw, 1987). La pluviométrie annuelle varie de 2 000 à 4 000 mm sur l'ensemble du territoire mais de manière non homogène, avec un gradient Est-Ouest correspondant à un maximum de 4000 mm sur l'Est contre 1500 mm à l'Ouest (Héritier, 2011). La température moyenne annuelle en journée est de 27°C, variant de 4 à 5°C selon les saisons (Héritier, 2011).

#### 3.1.1.1.2. Méthodes de collecte en Guyane

En amont de cette thèse, des échantillons d'*Hylesia metabus* avaient été collectés en juillet 2012 par J.F Champenois, par prospection et capture « passive » d'individus en milieux urbains à proximité des lampadaires et habitations, de très fortes densités d'*Hylesia metabus* ayant été observées en 2011-2012 aux abords de la commune

de Cayenne, dans les communes de Kourou ainsi qu'à Sinnamary et Iracoubo. Aucun dispositif particulier de piégeage n'avait été mis en œuvre mais les communes d'Iracoubo, Sinnamary, Kourou, Cayenne, Remire- Montjoly et Roura avaient été prospectées menant à la capture de 408 individus. Les échantillons récoltés provenaient ainsi uniquement de zones péri-urbaines, et en phase de population décroissante.

Tableau 2: Détail du nombre de chenilles et d'imagos d'*Hylesia* capturés sur l'année 2012 en période de pullulation.

Code Localité	Nombre de spécimens	Année	Site ou Lieu- dit
KOU	10	2012	Kourou
IRA	10	2012	Iracoubo
CAY	113	2012	Cayenne

A partir de janvier 2014, j'ai utilisé des pièges lumineux pour capturer des adultes d' *Hylesia* de manière plus intensive. Ces pièges consistaient en deux ampoules à vapeur de mercure 125W disposées de part et d'autre d'un drap blanc, alimentées par un groupe électrogène (Figure 13).

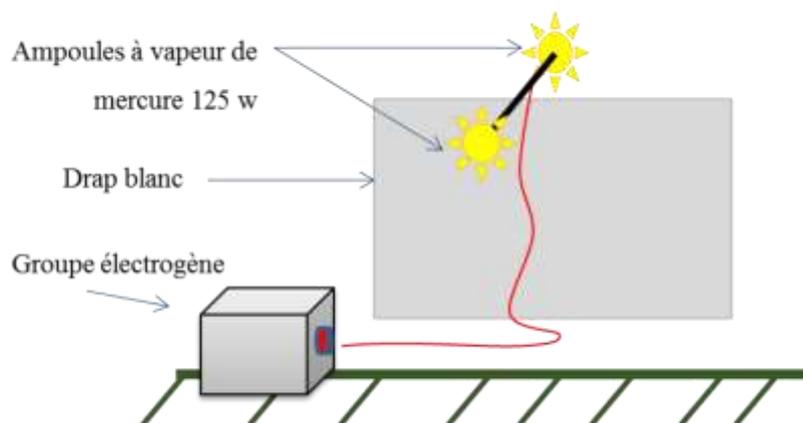


Figure 13 : Schéma du dispositif de piégeage lumineux.

Les adultes d' *Hylesia* ont en effet une activité crépusculaire qui débute approximativement 30 minutes après le coucher du soleil et sont attirés par-là lumière. L'attraction des lépidoptères est effective à partir de 350nm (UV) jusqu'à 600 nm (Rouge). Cependant, à l'intérieur de cette gamme il existe des longueurs d'ondes plus attractives pour les insectes, notamment aux alentours de 350nm, de 450nm et de 540nm (Eguchi *et al.*, 1982) . Les papillons attirés par la lumière ont été capturés, tués à l'aide d'acétate d'éthyle, puis conditionnés individuellement au congélateur. Les dates des piégeages ont été choisies de sorte à éviter la compétition avec la lumière de la lune, et ont ainsi été réalisés les nuits comprises cinq jours avant et cinq jours après la lune noire. En dehors de ces périodes, des piégeages ont cepen-

dant été réalisés avant que la lune ne se lève. Les ampoules ont été allumées avant le coucher du soleil, aux environs de 18h45, et sont restées allumées en continu jusqu'à 24h. Les pièges ont été disposés à une distance de 3 à 15 m des arbres.

Cet échantillonnage sur le territoire Guyanais a été réalisé sur 14 sites de piégeage couvrant d'Est en Ouest toute la bande côtière Guyanaise (Figure 14).

. Afin de prendre en compte de possibles différences de densité de populations en fonction du développement des gradations, l'échantillonnage a été répliqué en deux sessions: une développée courant janvier-février 2014, et la deuxième en avril 2014 (à l'exception du site de Cacao qui n'a pas pu être répliqué pour problèmes techniques) (Figure 15).

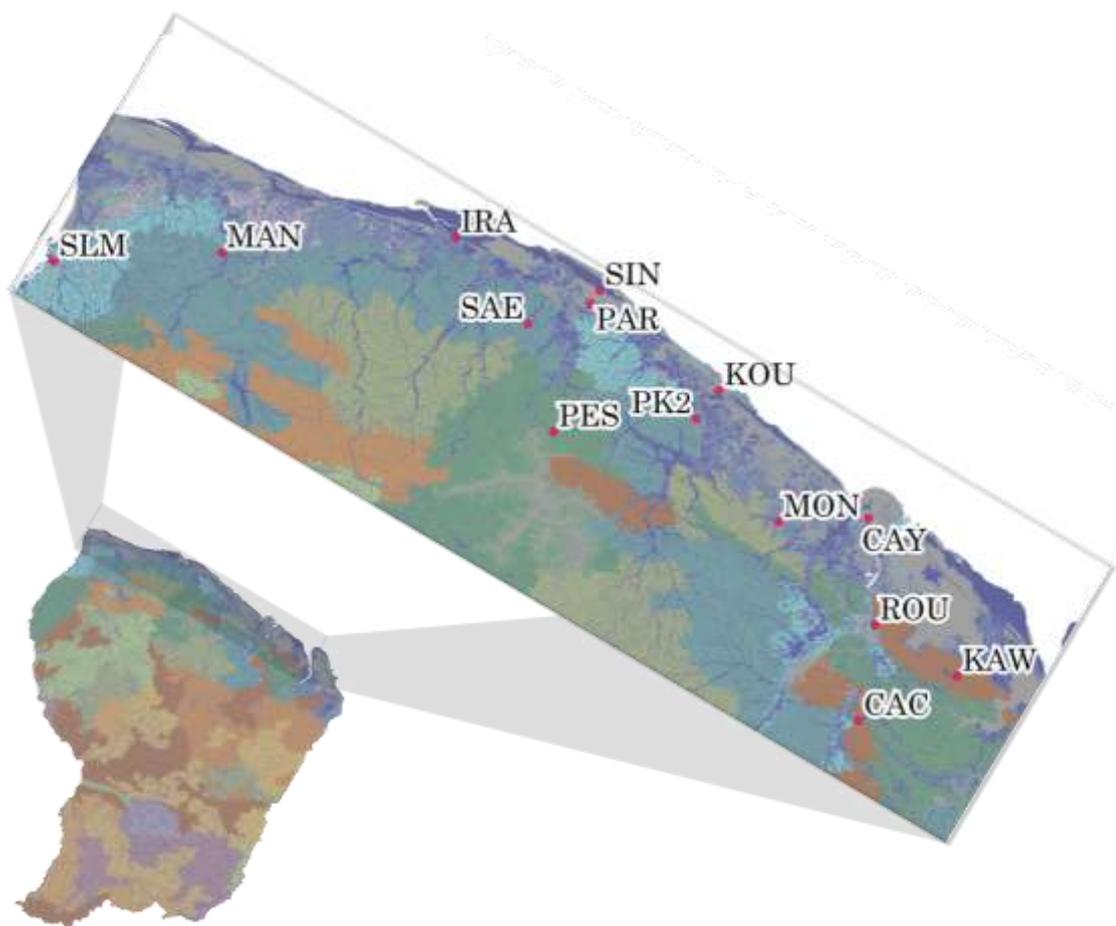


Figure 14: Position des 14 sites d'échantillonnage sur la bande côtière Guyanaise, Les noms des localités correspondant aux codes mentionnés sur la figure sont détaillés dans les Tableau 2 et 3.

L'échantillonnage a également été complété par la collecte de chenilles suite aux appels de citoyens et observations et captures occasionnelles lors de prospections de terrain représentant 8 chenilles pour 2014, soit à peine 5% des échantillons au total.

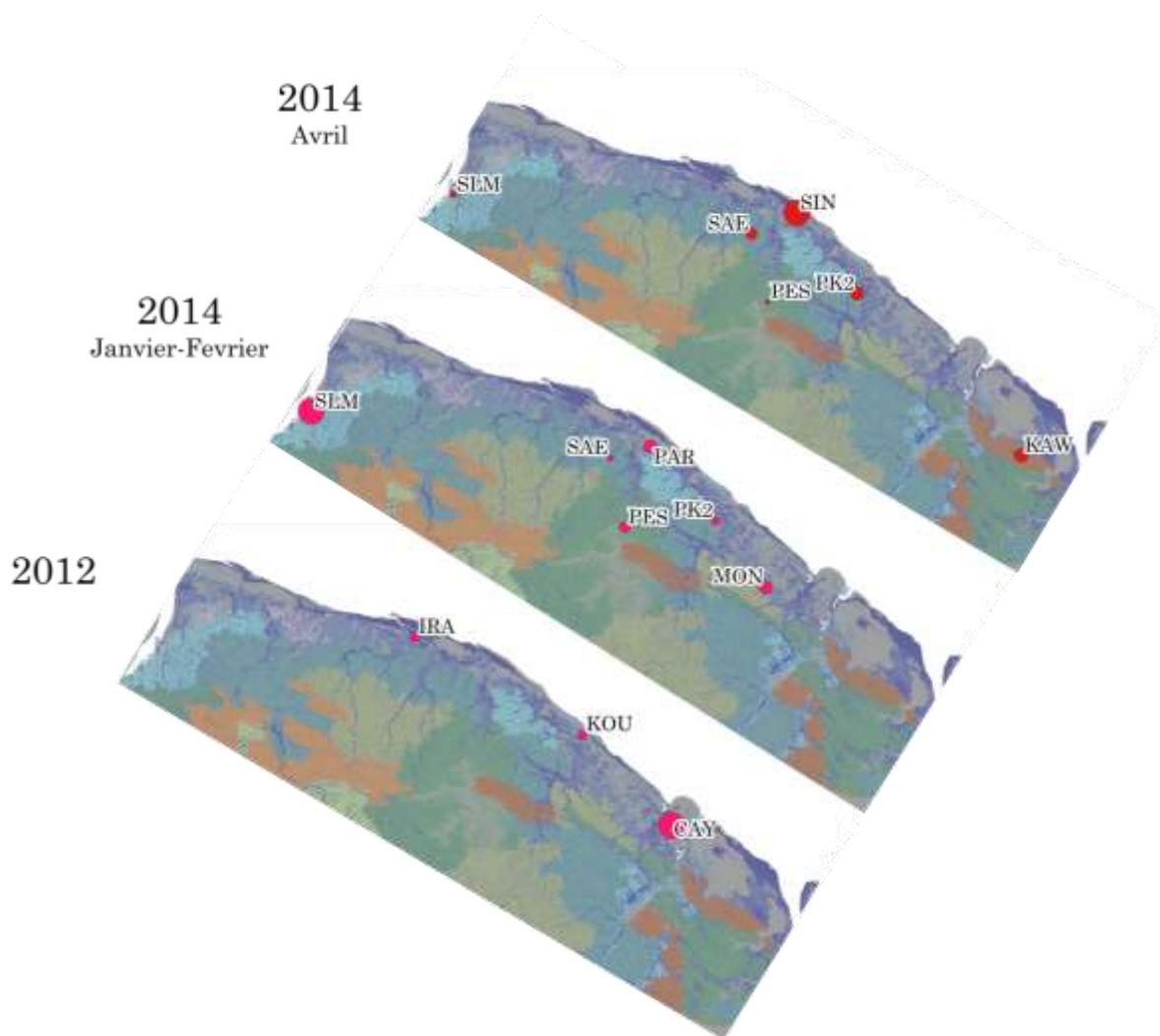


Figure 15: Variation spatio-temporelle des échantillonnages sur la bande côtière Guyanaise

Tableau 3 : Détail du nombre d'échantillons pour l'année 2014, pour les deux périodes de piégeages, les chiffres en gras représente les échantillons associés aux épisodes de papillonite en ville.

Site ou Lieu-Dit	Code Localité	Janvier 2014	Avril 2014	total
Route de Petit Saut	PES	17	1	18
Kourou dégrade PK21	PK2	9	24	33
Piste de Saint Elie	SAE	4	16	20
Iracoubo	IRA	1	0	1
Montsinéry	MON	26	0	26
Sinnamary, Paracou (Crique)	PAR	26	1	27
Saint-Laurent-du-Maroni	SLM	112	4	116
Sinnamary	SIN	1	<b>97</b>	98
Route de Kaw	KAW	0	24	24

### 3.1.1.2. La péninsule Paria au Venezuela

Cette deuxième zone d'études, située dans l'Etat de Sucre, correspond à la péninsule Paria séparant la mer des Caraïbes et le golf de Paria au Venezuela. Elle comprend des écorégions très diverses tout en étant très proches géographiquement (Figure 16).

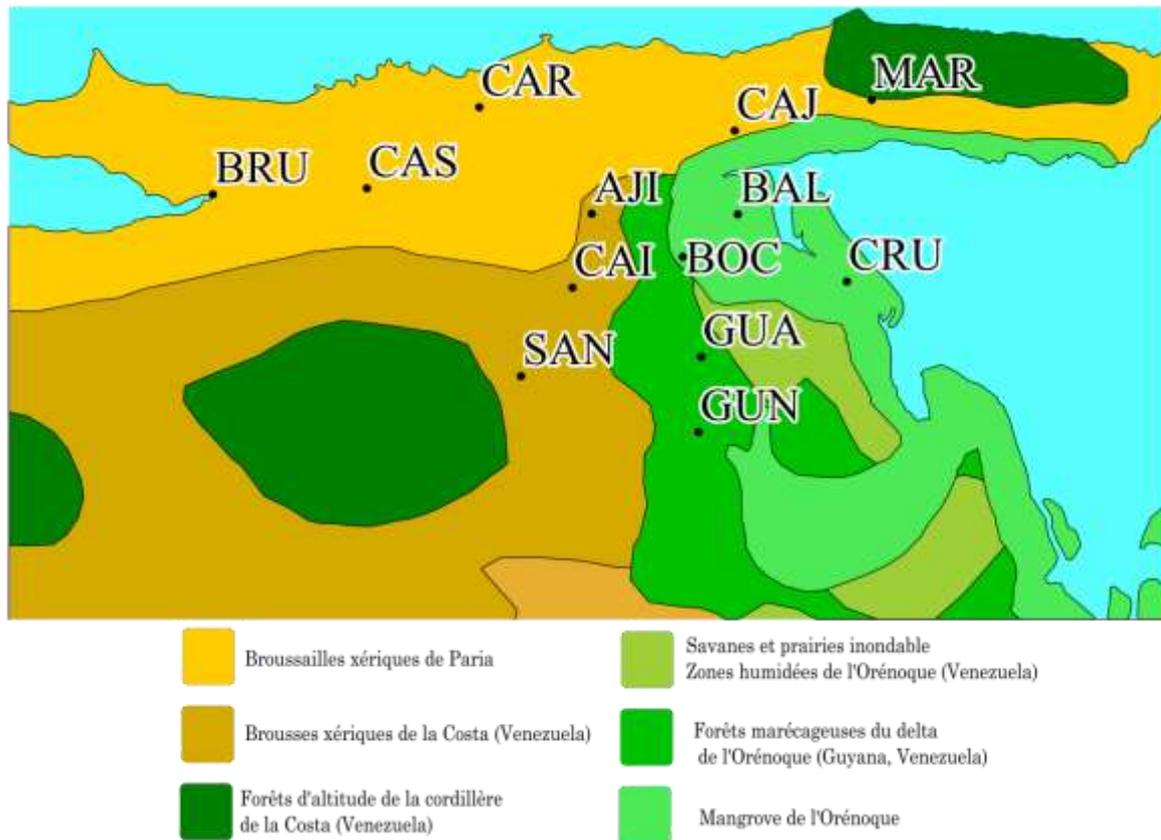


Figure 16: Ecorégions de la péninsule Paria et position des 13 sites d'échantillonnage. Les noms des localités correspondant aux codes mentionnés sur la figure sont détaillés dans le Tableau 4.

Les écorégions de type déserts et broussailles xérophytes se retrouvent dans la péninsule sous forme de milieux xériques dans lesquels les précipitations annuelles varient de 300 à 1000 mm, avec une température moyenne de 28°C. Les formations végétales sont constituées de savanes parsemées de palmiers et d'arbustes (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967). Le climat est semi-aride avec une végétation xérophile dense de 3 à 8 m de haut dominée par des Cactacées, Légumineuse et Capparidacée (Huber and Alarcón, 1988). Des brousses xériques existent aussi dans la région de la Costa. Les conditions climatiques varient cependant le long de la côte, entre Carúpano (CAR) et Cumaná (Figure 16) et sont marquées par deux saisons des pluies. La première s'étale de juin à août, et la seconde en décembre. Les précipitations sont comprises entre 900-375 mm, La partie interne de la péninsule est plus humide avec des précipitations annuelles entre 900 et 2000 mm. Les températures moyennes sont stables variant de 26 à 27° C. La végétation

est également de type xérophile, d'une hauteur moyenne de (0,5-5 m) de densité variable.

Les écorégions de type forêts tropicales et subtropicales humides se retrouvent dans les forêts d'altitude de la Cordillère de la Costa, qui correspondent à l'extrême Est de cette cordillère. Les températures de la Cordillère de la Costa dépendent de l'altitude et peuvent descendre jusqu'à -20°C. Les précipitations varient entre 1000-3000 mm. Le brouillard est fréquent au-dessus d'environ 800m, jusqu'à 1000-1200 m (Huber *et al.*, 1988). Les savanes et prairies inondables de l'Orénoque au Vénézuéla sont une zone humide constituée de prairies inondées intégrées dans une mosaïque de mangroves, forêts marécageuses et forêts humides. Le climat est de type tropical humide. Les précipitations sont irrégulières, variant entre 1 000 et 2 000 mm par an. Une saison des pluies se produit en avril / mai et dure généralement jusqu'à décembre, avec une brève pause en juillet. Cette prairie tropicale inondée contient très peu d'espèces ligneuses (Eva *et al.*, 2002). La mangrove de l'Orénoque subit un régime de précipitations annuelles variant de 1200 à 2500 mm. Les espèces d'arbres dominantes sont *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* et *Laguncularia racemosa*. Les épiphytes sont abondantes, comme la fougère *Acrostichum aureum*, indicatrices de faible salinité de la mangrove.

Les forêts marécageuses du delta de l'Orénoque (Guyana, Venezuela) se développent dans une région tropicale humide où les précipitations fluctuent entre 500 et 2000 mm par an. Les précipitations sont irrégulières, la saison des pluies commence en avril / mai et dure habituellement jusqu'en décembre. Les températures moyennes sont de 26°C, devenant légèrement plus fraîches la nuit. La forêt est fortement influencée par les systèmes fluviaux. La végétation est constituée d'arbres et de palmiers hydrophiles, ou les épiphytes sont abondantes.

### 3.1.1.3. Méthodes de collecte au Vénézuéla

Le prélèvement des échantillons a été réalisé par Melfran Herrera, Coordinador de Vigilancia Entomológica Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias Fundasalud, Estado Sucre Carúpano, Venezuela. Il bénéficie d'une longue expérience sur *H. metabus* (Osborn, 2005; Liendo-Barandiaran *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2016). Les échantillons ont été récoltés à l'aide de pièges lumineux, mis en place pour la surveillance dans l'état de Sucre, et les chenilles directement sur les troncs des arbres. Les échantillons ont tous été collectés en 2013 dans 13 sites d'échantillonnage se situant dans des écorégions variées (Figure 16). Le nombre d'échantillons est détaillé dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Détail des échantillonnages au Venezuela.

<i>Code Localité</i>	<i>Lieux dit site</i>	<i>Nombre de spécimens adultes</i>	<i>Nombre de che- nilles</i>	<i>Total</i>
CAJ	Río Seco (Cajigal)	14	1	15
GUN	Guanoco	10	1	11
BRU	La Bruja	11	0	11
GUR	Guariquén	12	1	13
CAR	Carúpano	3	1	4
MAR	Río Seco (Mariño)	7	2	9
GUQ	Guariquén	9	1	10
AJI	Ajies	12	1	13
BOC	Boca Grande	10	2	12
CAI	Caituco	3	2	5
CAS	Casanay	1	0	1
CRU	La Cruz	6	1	7
SAN	San Vicente	5	1	6

## 3.2. Outils d'analyse génétique

### 3.2.1. Introduction

Une première étape dans le choix de la technologie utilisée pour une étude est de cibler les technologies qui permettent de répondre aux objectifs scientifiques. Puis d'estimer la faisabilité liée aux contraintes de développement de séquençage et génotypage en termes de technicité et de coût. Les marqueurs moléculaires mettent en évidence les variations de séquences nucléotidiques de l'ADN. Les technologies sont nombreuses et permettent des analyses à différentes échelles. Ainsi, certains marqueurs sont plus appropriés pour l'analyse des variabilités génétiques à l'échelle interspécifique, et d'autres pour étudier les variabilités intraspécifiques. A chacun des niveaux évoqués ci-dessus, la diversité génétique peut être mesurée à l'aide de différents paramètres standardisés. L'emplacement du marqueur génétique joue un rôle important, certaines régions du génome peuvent être codante (adaptative) ou non codante (neutre) situé sur le génome nucléaire ou mitochondriale. Le génome

mitochondrial diffère dans le mode de transmission, uni-parentale maternelle, et permet donc d'inférer uniquement l'histoire évolutive des lignées maternelles.

Le séquençage nucléotidique de l'ADN des régions nucléaires et mitochondriales est très utilisé pour les études phylogénétiques, démographiques, biogéographiques et phylogéographiques chez les insectes. Dans ces domaines les marqueurs mitochondriaux sont de loin les marqueurs nucléotidiques les plus utilisés chez les insectes (Ashfaq, Hebert and Naam, 2016).

Pour l'étude des populations d'insectes, différents types de marqueurs peuvent être utilisés (Loxdale and Lushai, 1998). Je n'en citerais ici que quelques exemples :

- Le Polymorphisme de Longueur d'un Fragment de Restriction ou **RFLP** (Botstein, White and Skolnick, 1980) (Restriction Fragment Length Polymorphism), est une méthode selon laquelle l'ADN génomique est soumis à une digestion enzymatique. Les variations de taille des fragments révèlent la variabilité des nucléotides aux niveaux des sites de restrictions. La taille des fragments est mise en évidence par migration sur gel d'agarose.
- Une autre technique est basée sur l'ADN polymorphe amplifié aléatoirement (Williams *et al.*, 1990) ou **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic). Cette technique vise à l'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) de fragments d'ADN à l'aide d'amorces courtes (10 pb), et ne nécessite aucune connaissance préalable de l'ADN de l'organisme cible. Le polymorphisme des amplifications est dû aux variations des séquences amplifiées et à l'hybridation des amorces. Cette technique est peu reproductible car dépendante de la concentration de l'ADN ainsi que des conditions d'amplification. Presque tous les marqueurs RAPD sont dominants, c'est-à-dire qu'il n'est pas possible de distinguer un hétérozygote d'un homozygote (Black, 1993).
- La méthode **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) ou polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Vos *et al.*, 1995) est, elle, basée sur l'amplification de fragments de restriction de l'ADN génomique. Il est cependant difficile d'estimer la fréquence des hétérozygotes et des homozygotes pour l'allèle dominant.
- Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont des variations au niveau d'une base de l'ADN. La majorité du polymorphisme du génome est constituée de SNP. Ces marqueurs co-dominants permettent des analyses de grande précision, leur développement nécessite un génome de référence de bonne qualité.
- Les marqueurs microsatellites **SSR** (Simple Sequence repeats) sont des marqueurs variables au sein des individus de la même espèce, ils sont largement utilisés pour des études de génétiques des populations. Ce sont des marqueurs nucléaires présents sur l'ensemble du génome, principalement dans les zones non codantes de l'ADN (marqueurs neutres). Ils correspondent à des répétitions d'un motif nucléotidique de 2 à 5 nucléotides. Dans l'exemple ci-dessous, le microsatellite est constitué de 8 répétitions de 2 nucléotides.

AGGCTAGATACTGTC**CACACACACACACACAC**CGTGATAATGCA  
Séquence flanquante                      8 répétitions                      Séquence flanquante

Le polymorphisme détecté est la longueur du fragment, un allèle correspondra le plus souvent à un nombre particulier de répétition, déduit de la taille d'amplification. Ces marqueurs sont co-dominants, à hérédité biparentale, et sont souvent très polymorphes. Ils constituent donc un outil puissant pour estimer la diversité et la structure génétique à l'échelle de la population.

L'analyse combinée de l'ADN mitochondrial et des microsatellites a été utilisée avec succès chez plusieurs insectes pour mettre en évidence l'existence d'espèces cryptiques ainsi que pour déterminer la structure génétique des populations. Pour cette étude j'ai choisi d'utiliser l'analyse combinée de ces deux types de marqueurs car ils possèdent une bonne reproductibilité et un fort pouvoir discriminant.

### 3.2.2. Les marqueurs utilisés pour mon étude

#### 3.2.2.1. L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial est très utilisé en analyse de phylogénie et de diversité génétique à grande échelle car ses caractéristiques (haploïdie, hérédité maternelle, taux de mutation élevé, taux de recombinaison faible) le rendent extrêmement informatif. Le gène mitochondrial codant pour une sous-unité de la Cytochrome Oxydase I (ou Cox 1) est un complexe protéique de la membrane interne mitochondriale impliquée dans la respiration aérobie.

En plus des caractéristiques liées à sa localisation sur le génome mitochondrial, ce gène possède l'avantage d'être largement utilisé dans les campagnes de *barcoding*, offrant l'accès aux bibliothèques de références associant séquences d'ADN et identification morphologique. Ainsi, l'initiative *Barcoding of Life* (CBOL) a créé une base de données de référence mondiale pour l'identification moléculaire des espèces de tous groupes animaux et végétaux basée sur la collecte de ces séquences ADN Cox 1 (BOLD, <http://www.barcodinglife.org>). Ainsi, le système BOLD comprend en 2017 plus de 106 000 séquences de lépidoptères. Cette base de données contient des séquences d'au moins 500 pb contenant un pourcentage de bases manquantes inférieur à 1% (Ratnasingham and Hebert, 2007).

Le gène Cox 1 est un marqueur fréquemment utilisé comme première approche pour détecter l'existence d'espèces cryptiques (Dincă *et al.*, 2015). Bien que sujet à controverse, plusieurs études montrent que ce fragment permet l'identification sans ambiguïté de plus de 90 % des espèces animales (Hajibabaei *et al.*, 2006; Hebert, Dewaard and Landry, 2010). Ce court fragment d'ADN a ainsi été utilisé pour la discrimination des espèces de lépidoptères des familles Sphingidae et

Saturniidae au Costa Rica, régions tropicales à forte biodiversité (Hajibabaei *et al.*, 2006).

La délimitation spécifique par barcoding moléculaire réside dans le pourcentage de différences observées entre des séquences de référence et la séquence observée. Cependant, le pourcentage de différence entre les espèces pour le gène considéré peut fortement varier en fonction du groupe d'organismes pris en compte. Par exemple, chez les lépidoptères ce pourcentage de différences intra-spécifiques est rarement supérieur à 2% et il fait donc généralement office de seuil (ou threshold), en deçà duquel les individus concernés sont considérés comme appartenant à la même espèce. Pour que cette méthode soit applicable, il est donc nécessaire que les variations interspécifiques soient distinctement plus importantes que les variations intra-spécifiques. Ce seuil, encore appelé «Barcoding Gap», correspond à une rupture dans la distribution des différences de séquences ADN (Figure 17)

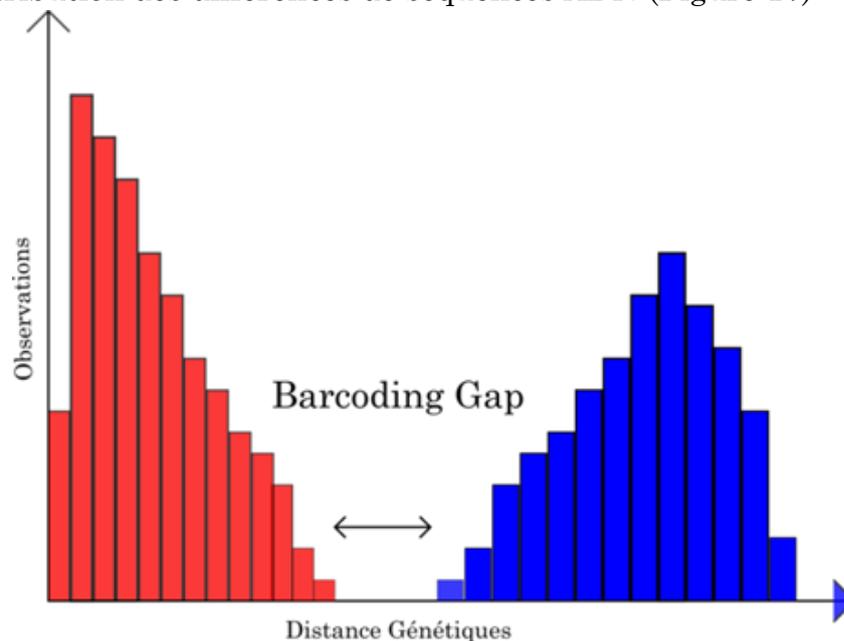


Figure 17: Schéma du Barcoding Gap : écart entre la divergence intra-spécifique (rouge) et les distances interspécifiques (bleu)

Pour définir ce seuil au sein d'un taxon taxonomiquement bien connu, la distribution des distances peut être estimée empiriquement. Chez les taxa moins connus ou difficilement identifiables sur la base de critères morphologiques, la distinction des espèces est parfois problématique. Pour ces taxa, des méthodes de regroupement hiérarchique des séquences basées sur les séquences ADN permettent de définir des groupes ou «clusters génétiques», utilisés comme unités taxonomiques moléculaires opérationnelles (MOTU). L'avantage de ces méthodes est de pouvoir s'affranchir des hypothèses d'appartenance des individus à une espèce *a priori*. Les MOTU sont applicables pour des groupes souffrant d'un déficit taxonomique. Les approches automatisées basées sur l'ADN pour la désignation de MOTU ont vu leurs applications dans des groupes considérés «exempts de taxonomie» tels que les bactéries (Birrer *et al.*, 2017) ou les champignons (Powell *et al.*, 2011), et sont de plus en plus appliquées dans des groupes ou lignées où la taxonomie basée sur la morphologie est difficile (Blaxter *et al.*, 2005).

Différentes méthodes permettent la définition des MOTU sur la base unique de leur séquence barcode (ex. ABGD, GMYC, RESL/BINs (Ratnasingham and Hebert, 2013)). La méthode RESL/BINs permet ainsi d'assigner les séquences à une MOTU en utilisant les ruptures dans la distribution des distances génétique par paires. La procédure se fait en deux phases pour créer les MOTU. Initialement un regroupement utilisant un seuil de 2,2% permet d'établir les limites préliminaires du MOTU, puis une analyse secondaire utilisant le clustering de Markov permet d'ajuster le seuil (Ratnasingham *et al.*, 2013). Ces estimations en deux temps permettent l'ajustement, si nécessaire, du seuil et la redéfinition des MOTU de la première phase. Cette méthode est utilisée pour la gestion des séquences barcode dans BOLD, les MOTU ou BIN étant ajustés au fur et à mesure que les données sont chargées dans la base. Les séquences qui établissent un nouveau BIN ajoutent une entrée à l'index BIN, tandis que les séquences assignées à un BIN existant y apportent leurs métadonnées. La base de donnée BOLD utilise un algorithme de regroupement de type « Clustering » pour distinguer les partitions de distances génétiques entre un groupe d'individus appelé BIN (BIN; Ratnasingham & Hebert 2013).

La diversité du genre *Hylesia* étant très importante et à petite échelle, j'ai sélectionné ce marqueur Cox1 pour tenter d'identifier la ou les espèces(s) d'*Hylesia* responsables d'épisodes de papillonite en Guyane et au Venezuela. Une partie du gène codant pour le Cytochrome oxydase I (Cox1) a donc été amplifié pour 144 individus. L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant le couple d'amorces : LCO-HYL (5'-ATA TTG GAA CTT TAT ATT TCA TTT TTG G-3') et HCO-HYL (5'-CCT ACA GTA AAT ATA TGA TGA GC-3'). Ces amorces ont été dessinées avec le logiciel Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) à partir de l'alignement des génomes mitochondriaux de cinq espèces de Saturniidae (*Samia cynthia cynthia*; *Samia cynthia ricini*, *Antheraea pernyi*, *Eriogyna pyretorum* et *Actias selene*, GenBank accession numbers: KC812618 NC017869 JN215366 NC004622 AY242996 FJ685653 NC012727 NC018133 JX186589).

Pour un sous-ensemble d'échantillons, qui présentaient un ADN dégradé, les amplifications ont été effectuées avec les amorces MLep F1: (5' GCT TTC CCA CGA ATA AAT AAT A 3' ) (Hajibabaei *et al.*, 2006) et LepR1: (5' TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA 3' ) (Hebert *et al.*, 2010). Les amplifications ont été réalisées dans un volume final de 25 µL à une concentration de 0.025 unités/µl de *Taq* polymerase, 1× PCR buffer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de chaque dNTP, et 0.2 µM d'amorce et de 0.1-0.6 ng d'ADN. Les conditions d'amplification utilisées ont été les suivantes : une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min, 35 cycles d'amplifications (94 ° C pendant 30 s, 51 ° C pendant 35 s, 72 ° C pendant 45 s), suivie d'une étape d'extension finale de 72 ° C. Les produits PCR ont été purifiés en utilisant les plaques Multiscreen 96-Well Filter de Millipore et séquencés dans les deux sens en utilisant un analyseur génétique ABI3130XL DNA (Applied Biosystems). Les séquences sens et anti-sens ont été assemblées en contigs et vérifiées vi-

suellement en utilisant le logiciel CodonCode aligner (CodonCode Corporation). L'alignement final a été tronqué pour ne pas contenir de données manquantes.

### 3.2.2.2. Les marqueurs microsatellites

Aucun marqueur microsatellite n'avait été précédemment développé pour *H. metabus*, ni même pour aucune autre espèce de ce genre. Le développement de marqueurs spécifiques de type microsatellite a donc constitué une étape importante de cette étude. La réalisation d'une banque enrichie en microsatellites permet de découvrir des motifs microsatellites pour des espèces sans génome de référence. L'ADN total d'un individu d'*Hylesia metabus* provenant de Cayenne a donc été extrait en utilisant le kit DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN™, Hilden, Germany). La préparation de la librairie enrichie en microsatellites a été réalisée suivant le protocole de Techen *et al.* 2010 (

Figure 18). L'ADN génomique (ADNg) total a été digéré par deux enzymes de restriction Hae III et Alu I, capable de générer des extrémités à bout franc ; dans ce cas l'ADN double-brin est coupé au niveau de la même paire de bases sur les deux brins. Des queues poly(A) (succession de ribonucléotides de type Adénosine (A)) ont été ajoutés aux extrémités 3' des fragments d'ADNg et liés à des adaptateurs par une ligase. Les adaptateurs ont été utilisés pour amplifier les fragments d'ADNg. Des oligonucléotides biotinylés présentant des motifs répétés d'intérêt, caractéristiques des régions microsatellites ont été hybridés au fragment d'ADNg préalablement dénaturé (AG, AC, ACAG, ACCT, ATC, AAGC). Les oligonucléotides biotinylés ont la capacité de se fixer sur la streptavidine qui recouvre des billes magnétiques. Le transfert sur support magnétique permet la capture des billes, sur lesquelles sont fixés les motifs répétés, eux même hybridés, au fragment d'intérêt (motifs microsatellites). Les fragments ne contenant pas de motif répété ont été éliminés par élution dans l'eau. Un traitement par température de 95°C libère l'ADN par dénaturation des fragments d'ADNg/oligonucléotides biotinyles. Une amplification des ADNg est réalisée avant séquençage.

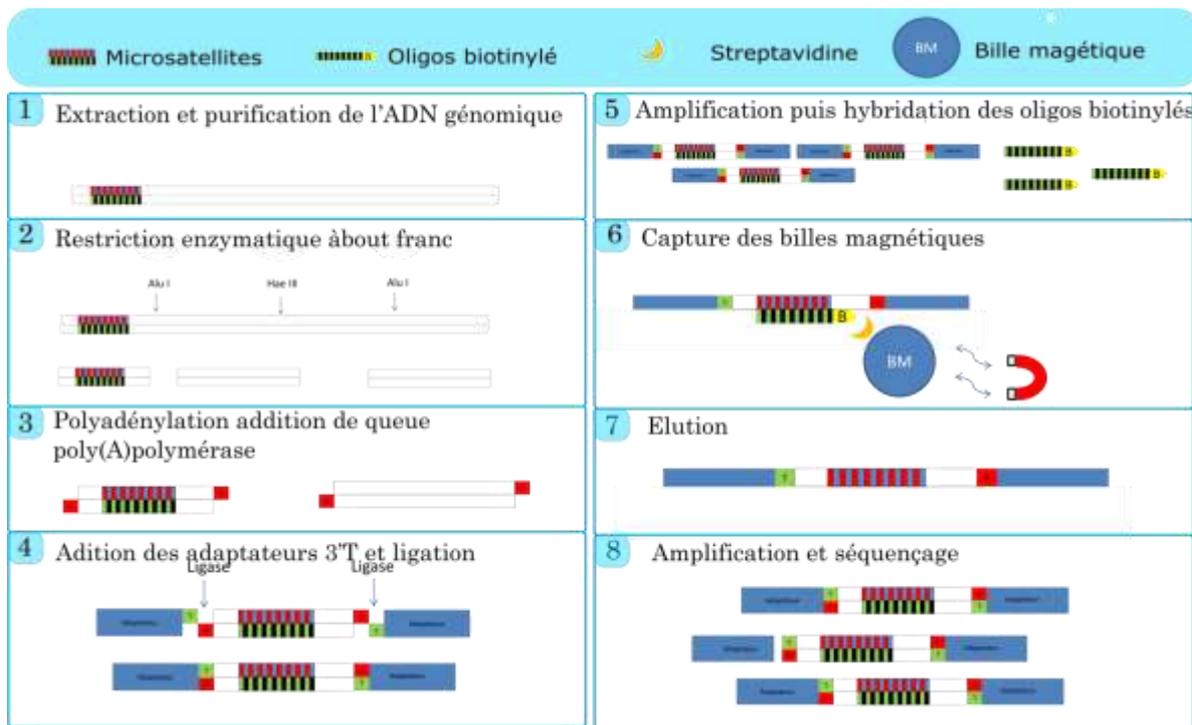


Figure 18: Etapes de la réalisation d'une banque enrichie en microsatellites

Le Séquençage de la librairie enrichie en microsatellites a été réalisé en utilisant un séquenceur Ion Proton™ à la plateforme Génome Transcriptome (PGTB) of the Center for Functional Genomics of Bordeaux (CGFB). La qualité globale du séquençage a été vérifiée à l'aide du logiciel FastQc (Andrews, 2010). Ce logiciel permet une visualisation des indices représentatifs de la qualité du séquençage, les scores de qualité phred (Q) (aussi appelé scores phred), sont assignés à chaque base nucléique en fonction de la forme et de la résolution du pic d'électrophorèse de chaque base. Les scores phred sont reliés de façon logarithmique à la probabilité d'erreur d'identification d'une base; ainsi un score de Q20 représente une probabilité d'erreur de 1%.

L'élimination des adaptateurs de librairie a été réalisée en utilisant le logiciel Cutadapt version 1.2.1 (Martin, 2011). Les séquences n'atteignant pas une score de qualité moyenne de Q20 (1% d'erreur) et une longueur de 80 paires de bases ont été exclues (Nielsen *et al.*, 2011). Un assemblage *de novo* a été réalisé à l'aide du programme CAP 3 (Contig Assembly Program) (Huang and Madan, 1999). Cette étape permet d'aligner les séquences courtes, dites « reads », se chevauchant et de les assembler en séquences génomiques continues et ordonnées, dites « contigs ». Enfin la recherche de motifs microsatellites et le dessin d'amorces sur les régions flanquantes a été réalisé en utilisant le logiciel QDD (Megléczy *et al.*, 2014). Trente paires d'amorces entourant un motif microsatellite ont été sélectionnées en fonction des propriétés du motif (motif pur, longueur minimale de l'amplicon de 100 pb, et

température d'hybridation des amorces). Les tests d'amplification sur amorces non marquées ont été réalisés sur 30 couples d'amorces. Les 15 couples produisant des produits PCR de tailles attendues ont été testés sur huit individus et ont ensuite été génotypés en utilisant l'amorce sens marquée d'un fluorochrome (NED®, PET®, 6-FAM), à la fois seule puis en multiplexage, afin de vérifier le polymorphisme des marqueurs.

Au total, 399 individus d'*H. metabus* provenant de 24 localités ont été génotypés pour sept microsatellites. Les amplifications ont été réalisées en utilisant le kit de multiplexage de Qiagen dans un volume final de 6 µl contenant 1x Master Mix, 0.2 µM de chaque amorce, et les amorces sens marquées à l'extrémité 5' avec un fluorochrome (6-FAM, VIC®, ou NED®) (Table S1), et contenant entre 0.1-0.3 ng d'ADN. Les conditions suivantes d'amplification ont été utilisées: 95°C pendant 15 min, suivi de 26 cycles de trois phases : 94 °C pendant 30 s, 58 °C pendant 1.5 min, et une extension à 72 °C pendant une minute, suivie d'une extension finale à 60 °C pendant 30 min. Le génotypage a été réalisé avec un analyseur génétique ABI3130XL DNA (Applied Biosystems), en incluant dans chaque réaction un marqueur de taille GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Applied Biosystems). La lecture des tailles des pics correspondant aux microsatellites a été réalisée avec le logiciel Gene Mapper 3.7 (Applied Biosystems)

### 3.2.3. Méthodes d'analyse

#### 3.2.3.1. Approche Barcoding

Pour estimer la divergence du Cox1 au sein du genre, les séquences de 814 *Hylesia* ont été téléchargées sur la plateforme BOLD, puis alignées en utilisant le logiciel Mega (clustal W). Les séquences de moins de 500 pb, ou contenant plus de 1% de données manquantes, ont été supprimées. L'alignement final de 774 séquences comprenant 514 pb a été utilisé pour les analyses de « Barcoding gap » au sein du genre. Parmi ces 774 séquences utilisées, 61 morpho-espèces étaient représentés, et notamment *H. metabus* par 27 séquences.

J'ai utilisé la méthode de l'ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery method (Puillandre et al. 2011,2012), réalisable sur l'interface en ligne disponible sur le site <http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>. Les paramètres utilisés ont été les suivants: Pmin0.001 ; Pmax0.1 ; Steps 10; X ( relative gap width): 1.5 ; Nb bins (for distance distribution): 20). La distance utilisée a été celle de Kimura (K80). Le nombre de clusters représentés par les 27 séquences d'*H. metabus* a été estimé par la méthode de l'ABGD. J'ai également utilisé les informations de la plateforme BOLD qui possède un système d'indexation par unités MOTU produites par la méthode de RESL-BIN, appelé le système de numéro de code-barres (BIN). C'est un index unique, associant des d'échantillons à des BIN avec leurs métadonnées. J'ai donc également utilisé les données disponibles sur cette plateforme pour vérifier que les séquences d'*H. metabus* référencées étaient assignées à un seul BIN. Le regroupement des séquences d'*H. metabus* au sein du genre a également été visualisé par la construction

d'un arbre phylogénétique avec la totalité des 774 séquences en utilisant la méthode du Neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987), J'ai utilisé les séquences du Saturniidae *Lonomia obliqua* en groupe externe, les paramètres ayant été laissés par défaut en choisissant la distance de Kimura deux Paramètres (Kimura, 1980) dans le logiciel MEGA Version 2.6 (Tamura *et al.*, 2013) et 1000 bootstraps. L'arbre et le regroupement des séquences *H. metabus* ont été visualisées et éditées en utilisant la plateforme en ligne ITol, (<https://itol.embl.de/>).

Les séquences Cox 1 obtenues sur 144 individus ont été alignées en utilisant le logiciel ClustalW disponible dans MEGA 6. Ces séquences barcodes ont été individuellement soumises à une identification par BLAST (Basiqne local alignement) sur la plateforme BOLD. La présence de codons indiquant la fin de la lecture de gènes codants, dites codon 'stop', a été vérifiée en utilisant le logiciel MEGA 6, et la distance des 144 séquences a été finalement calculée en utilisant la méthode de calcul de distance de Kimura 2 (Tamura *et al.*, 2013).

Le nombre de sites variables, les sites informatifs, la diversité haplotypique ( $Hd$ ) ainsi que la diversité nucléotidique ( $\pi$ ) ont été estimés en utilisant le logiciel DnaSP V5 (Librado and Rozas, 2009). Les différences entre haplotypes ont été représentés par un réseau d'haplotypes en utilisant la méthode de *median-joining network*, disponible dans le logiciel Popart (Leigh and Bryant, 2015). Une analyse de variance moléculaire a été réalisée (AMOVA) en utilisant le logiciel Arlequin (Excoffier and Lischer, 2010).

### 3.2.3.2. Approche microsatellites

Le nombre d'allèle par locus, l'hétérozygotie attendue et observée a été calculé avec Genalex 6.41 (Peakall & Smouse 2006). Les tests de conformité à l'équilibre de Hardy-Weinberg et le déséquilibre de liaison ont été estimés à l'aide du logiciel Genepop v 4.3 (Raymond and Rousset, 1995a). Les allèles nuls et les autres biais potentiellement dus à des problèmes de lecture des pics microsatellites ont été estimés avec le logiciel Micro-Checker v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Le degré de différenciation entre les sites d'échantillonnages a été estimé par calcul des valeurs de  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham, 1984), leur significativité ayant été estimée par 10,000 bootstraps en utilisant le logiciel Arlequin (Excoffier, L. and Lischer, 2010). Les valeurs de  $G''_{ST}$  (Meirmans and Hedrick, 2011) ont été calculées avec le paquet Diversity du logiciel R (Keenan *et al.*, 2013). Les  $F_{ST}$ 's (Weir, 1996) corrigés pour les allèles nuls ont été calculés par la méthode d'Excluding Null Alleles (ENA) du logiciel FreeNA (Chapuis and Estoup, 2007).

La structure génétique des populations a été inférée par plusieurs méthodes de clustering, en utilisant deux approches différentes : une approche utilisant un modèle génétique explicite (Guillot, GillesMortier & Estoup 2005) et une approche multidimensionnelle (Jombart, Devillard and Balloux, 2010):

La première approche consiste à supposer que les données génétiques peuvent être expliquées par un modèle probabiliste où chaque population se trouve à

l'équilibre de Hardy-Weinberg et sans déséquilibre de liaison. Le modèle basé sur les lois de génétique des populations détermine le nombre de  $k$  populations en minimisant le déséquilibre de Hardy-Weinberg pour estimer les probabilités d'appartenance des individus à des groupes. Pour détecter la structure génétique des populations, j'ai utilisé la méthode développée dans le paquet R GENELAND (Guillot, GillesMortier and Estoup, 2005). Il s'agit d'un modèle hiérarchique bayésien qui suppose l'existence de  $k$  populations caractérisées à chaque locus par leurs fréquences alléliques. Chaque individu échantillonné est assigné à une population et la probabilité qu'un individu appartienne aux différentes populations est appelé « probabilité d'appartenance ». Pour cela, l'algorithme estime la distribution du jeu de données par méthode de Monte Carlo par chaîne de Markov (Markov Chain Monte Carlo, MCMC). Pour vérifier que la structure de notre jeu de données ne dépend pas du modèle et des algorithmes, j'ai donc estimé le nombre de  $k$  en prenant successivement en compte ou non des données spatiales. En effet, lorsque les données spatiales sont incluses les échantillons spatialement proches ont une probabilité a priori plus élevée d'appartenir à la même population. Dans ce cas le logiciel met en évidence la localisation géographique des discontinuités génétiques au sein des échantillons. J'ai également utilisé successivement un modèle supposant que les populations sont caractérisées à chaque locus par les fréquences alléliques corrélées ou non corrélées. Le nombre de  $k$ , et la convergence des chaînes de Markov, ont été visualisées pour ces quatre conditions.

La deuxième méthode utilisée est l'Analyse Discriminante (DAPC) qui repose sur l'analyse discriminante des axes principaux d'une analyse en composantes principales (Jombart et al. 2010; Jombart 2012). Cette méthode permet de mettre en évidence la structuration génétique sans se baser sur des lois de génétique des populations, mais sur la distribution des allèles en permettant de projeter les données sur un nombre réduit d'axes orthogonaux tout en maximisant la variance des données projetées sur chacun des clusters. Cette analyse a été réalisée grâce à l'aide du paquet ADEGENET v1.3.4 (Jombart 2008) du programme R v.2.14 (R-Development-CoreTeam 2011). Les composantes principales permettant d'expliquer plus de 90% de la variance cumulative ont été conservées. Les individus assignés ensembles par GENELAND et ADEGENET ont été comparés entre les deux méthodes. Pour vérifier la concordance des deux méthodes, le pourcentage d'individus assignés au même cluster par les deux méthodes avec une probabilité supérieure à 80 % a été calculé.

Pour mieux comprendre la similitude génétique, j'ai visualisé l'organisation de ces similitudes entre les différents sites échantillonnés par des arbres phylogénétiques. J'ai en particulier réalisé un arbre phylogénétique basé sur l'algorithme de Neighbor-Joining proposé par Saitou et Nei (1987), implémenté dans le paquet R *poppr* (Kamvar, Tabima and Grünwald, 2013). La construction de cet arbre a été réalisée à partir d'une matrice de distances génétiques pour chaque paire d'individus. Ces distances génétiques ont été calculées à l'aide de la méthode de Cavalli-Sforza et Edwards (1967). Enfin, une analyse de la variance (AMOVA) a été réalisée sur les données microsatellites en utilisant le logiciel Arlequin afin d'estimer le taux de variance génétique expliqué par les clusters identifiés par GE-

NELAND, les sites d'échantillonnage parmi ces clusters, et la variance résiduelle expliquée par les individus (Excoffier *et al.*, 2010).

### 3.3. Méthodes d'études du comportement sexuel d'*Hylesia metabus*

#### 3.3.1. Elevage des *Hylesia metabus*

L'étude du comportement sexuel des *H. metabus*, et notamment du comportement d'appel des femelles (Chapitre 6), impose de disposer d'un nombre suffisant d'individus vierges. Or, la capture des adultes par piégeage lumineux ne permet pas d'obtenir des femelles vierges. La mise au point d'un élevage à partir des chenilles s'est donc imposée.

#### 3.3.2. Conditionnement

Des chenilles au stade L4-L6 ont été prélevées sur la commune de Sinnamary quelques mois avant la pullulation de Juillet 2014. Les chenilles ont été placées dans des bacs en plastique translucide de dimensions 30cm x 20cm x 13cm, possédant un couvercle percé pour permettre la circulation de l'air (Figure 19).



Figure 19: Bacs d'élevages des chenilles d'*Hylesia*.

Ces boîtes ont été stockées à température ambiante dans une serre ombragée. Les individus ont été placés par groupes de plusieurs centaines pour les plus jeunes (3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stades) puis disposés en groupes de 5-20 chenilles dans les derniers stades, à partir du 5<sup>ème</sup> stade. Les chrysalides nouvellement formées ont été collectées quotidiennement et débarrassées de leur cocon. Cette étape permet le sexage, opération consistant à différencier les mâles des femelles par critères anatomiques. Une différence de poids existe entre chrysalides mâles et femelles, celles des femelles étant plus grosses et plus arrondies (Vassal, 1989). Les chrysalides ont ensuite été suspendues dans des éclosiers collectifs (Figure 20). Le couvercle des boîtes est alors remplacé par un tissu à moustiquaire, qui permet la circulation de l'air et limite le développement des champignons. Lors de l'émergence des adultes, les individus ont été conditionnés individuellement dans des boîtes de 10cm x 15 cm.



Figure 20 : Photographie des éclosoirs collectifs

### 3.3.3. Alimentation des chenilles et mesures d'hygiène (désinfection des élevages)

Les chenilles ayant été récoltées sur différentes essences d'arbres, notamment *Tapiririra* spp. et *Inga* spp, elles ont été nourries avec un mélange de feuillage de ces mêmes arbres, légèrement humidifié à l'aide d'un pulvérisateur. Les boîtes d'élevage ont été quotidiennement nettoyées. Les feuilles non consommées et séchées, les fèces, les soies ainsi que les exuvies post mues ont été éliminées. Les boîtes d'élevage ont été désinfectées avec de l'eau faiblement javellisée pour limiter la prolifération des pathogènes, puis rincées à l'eau claires. Dans les derniers stades larvaires, quand les chenilles ont commencé à confectionner des rouleaux de feuille « stade pré-pupal », les feuilles n'ont pas été retirées pour ne pas perturber le mécanisme de nymphose.

### 3.3.4. Identification de la période d'appel des femelles

Les chrysalides issues d'individus collectés dans la commune de Sinnamary en 2014 ont été conditionnées dans des éclosoirs collectifs (cf. 2.4.1). Une fois émergés, les adultes ont été disposés dans des bacs individuels de 15×10 cm recouverts de tissu moustiquaire. A partir de 18h48, heure du coucher du soleil, ces individus ont

été placés dans l'obscurité à  $29^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Leur activité a ensuite été observée, à l'aide d'une lumière rouge, à intervalles réguliers de 10 minutes, ce jusqu'à minuit. L'expérience a été renouvelée sur plusieurs nuits consécutives jusqu'à la mort des insectes. Les femelles présentant un comportement d'appel ont été recensées, et le moment du début d'appel comme la durée de celui-ci ont été enregistrés pour chaque insecte. Les moyennes de durée d'appel en fonction de l'âge des femelles ont été comparées à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney (Mann and Whitney, 1947).

### 3.3.5. Tentative d'identification de la phéromone sexuelle

Deux techniques complémentaires ont été utilisées. La première procédure a consisté en une extraction totale des composés dans un solvant apolaire, l'hexane. Pour cela, la glande à phéromone de dix femelles en appel depuis plus de 15 minutes, a été disséqué sous une loupe binoculaire puis plongée dans 100 $\mu\text{l}$  d'hexane pendant 3 minutes.

Une micro-extraction sur phase solide (SPME- Solid Phase Micro Extraction) a également été utilisée. Cette technique permet de capturer les composés volatiles se trouvant à l'état de traces. Cette technique, plus récente que la précédente, a été utilisée avec succès pour identifier les composés phéromonaux chez un certain nombre d'espèces de lépidoptères (Frérot, Malosse and Cain, 1997). Elle possède plusieurs avantages, notamment de ne pas nécessiter l'emploi de solvants et d'être applicable à des échantillons liquides, solides ou gazeux (Arthur and Pawliszyn, 1990). Une seringue contenant une fibre SPME, constituée de silice fondue sur laquelle est greffée une phase stationnaire de polymère, a été utilisée pour tenter de capturer les composés émis par la glande à phéromone. Pour ce faire, la dernière partie de l'abdomen de 6 femelles réalisant un comportement d'appel depuis plus de 15 minutes a été mis en contact avec une sonde SPME pendant un temps d'équilibration de 3 minutes au minimum. Au total 6 fibres ont été utilisées. Deux d'entre elles ont été mises en contact avec la surface de la glande à phéromone d'une femelle seule tandis que deux autres fibres ont chacune été mises en contact avec la glande à phéromone de deux femelles différentes. Enfin, deux fibres ont été chacune été appliquées sur l'extrémité abdominale d'un mâle.

Les composés retenus dans ces fibres ainsi que dans l'extrait ont été résorbés et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS ; SCION 436 SQ – Bruker®), à l'Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de l'INRA de Versailles par Brigitte FREROT. Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (GC-MS) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. La chromatographie en phase gazeuse permet une séparation des composants d'un mélange au moyen d'une colonne capillaire à température contrôlée. Le mélange a été chauffé suivant un gradient de température de  $50^{\circ}\text{C}$  à  $300^{\circ}\text{C}$  pendant 31,25 min soit  $8^{\circ}\text{C}$  par minutes. Les molécules passent dans le capil-

laire et le temps que met une molécule entre l'injecteur et le détecteur est appelé « temps de rétention ». Ce temps de rétention (RT) est caractéristique de la nature des composants notamment la solubilité de celui-ci dans la phase stationnaire mais dépend aussi des conditions de réalisation de la chromatographie (température).

La spectrométrie de masse (MS) consiste, elle, à ioniser un échantillon, les molécules se brisent et les différents ions formés sont ensuite accélérés par un potentiel avant d'être déviés par un champ magnétique. La spectrométrie de masse permet d'identifier les différents composants dans leur spectre de masse en utilisant le ratio masse/charge ( $m/z$ ). L'ionisation a été réalisée par impact électronique (bombardement d'électrons) (IE), à 70eV et par ionisation chimique (IC) à 150eV. Les spectres de masse ainsi obtenus ont ensuite été comparés en utilisant le programme AMDIS (Système d'Identification et de Déconvolution des spectres de Masse Automatique) (Davies, 1998), aux spectres de masse de molécules présentes dans les bibliothèques de références NIST (National Institute of Standards and Technology), ainsi qu'à une librairie interne du laboratoire de L'INRA de Versailles comprenant des données de références des phéromones de lépidoptères. L'identification des composés n'a été possible que lorsque les spectres de masse des constituants et ses indices de rétention coïncident avec ceux des bibliothèques. Dans ce cas l'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté. Dans certains cas l'identification est rendue impossible en raison de données spectrales et d'indices de rétention correspondant à plusieurs, ou inversement à aucun, composés des bibliothèques. Les composés extraits chez les mâles et les femelles ont été comparés, et les composés chimiques présents chez les deux sexes ont été considérés comme ne faisant pas partie de la phéromone sexuelle d'*H. metabus* émise par la glande à phéromones.

## 4. IDENTIFICATION DES ESPECES D'*HYLESIA* RESPONSABLES DE LA PAPILLONITE EN GUYANE ET AU VENEZUELA

---

L'espèce *H. metabus* a été considérée responsable des épisodes de lépidoptérisme massifs signalés en Guyane et au Venezuela depuis le siècle dernier (Polar *et al.*, 2010). Cependant, cette considération se fonde sur un nombre limité de travaux de recherches en Guyane (Vassal, 1989; Vassal *et al.*, 1993). En effet, la majorité des connaissances actuelles repose sur des données acquises au Venezuela (Jourdain *et al.*, 2012), notamment concernant le comportement d'accouplement (Fornés *et al.*, 2000), la communauté des parasitoïdes (Hernández *et al.*, 2009a), ou encore l'évaluation de l'efficacité des méthodes de traitement larvicides (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2011).

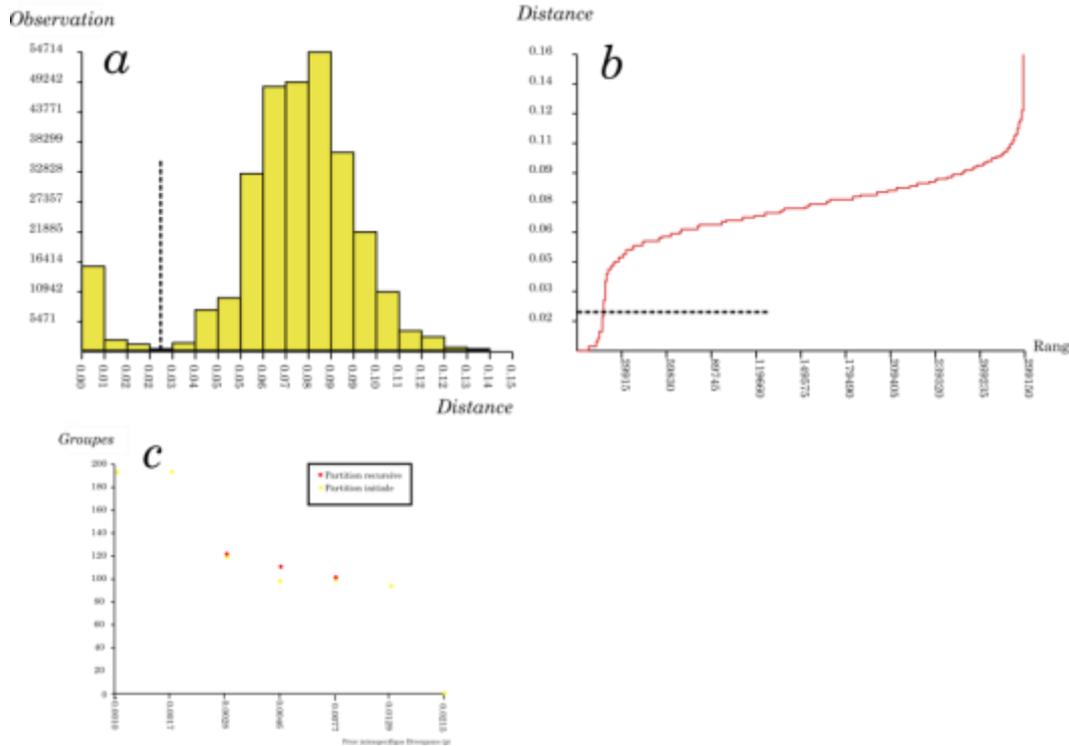
Les dispositifs de veille et de régulation des *Hylesia* en Guyane sont ainsi restés marginaux et limités (Jourdain *et al.*, 2012) bien que leurs pullulations y constituent un problème récurrent avec des enjeux socio-économiques liés à la présence de ces papillons en zones urbaines. Les derniers travaux de recherche sur la biologie des *H. metabus* Guyanais datent de 1989-1993 (Vassal, 1989; Vassal *et al.*, 1993). Les données acquises par le Venezuela font donc office de référence pour développer des moyens de lutte en Guyane (Jourdain *et al.*, 2012). Néanmoins les espèces d'*Hylesia* impliquées dans les épisodes de papillonite ne sont pas faciles à identifier avec certitude car les critères morphologiques sont peu diagnostiques. La définition de méthodes spécifiques de régulation des populations de ce papillon en Guyane implique donc de préciser si les *Hylesia* des deux pays appartiennent à la même espèce et, si oui, s'ils représentent une seule population. C'est dans cette optique que ce chapitre rapporte les résultats des travaux que j'ai entrepris afin d'estimer la pertinence de transposer les données biologiques et les moyens de lutte des *H. metabus* du Venezuela en Guyane.

### 4.1. *Hylesia metabus* : une unité taxonomique au sein du genre

La séquence d'ADN du gène mitochondrial Cox1 a été utilisée pour estimer les divergences génétiques interspécifiques au sein du genre et estimer une « valeur seuil » de divergence génétique entre espèces. Pour cela, l'approche d'unité taxonomique opérationnelle (OTU) a été utilisée comme proxy des espèces (Blaxter *et al.*, 2005). J'ai téléchargé 714 séquences d'*Hylesia* de la plateforme BOLD, dont 721 séquences de 61 morpho-espèces, parmi lesquelles 27 séquences d'*H. metabus* et 53 non identifiées. La méthode de l'ABGD a révélé, au sein de ces 714 séquences,

l'existence d'une rupture dans la distribution des distances par paires, située entre 2 et 3%

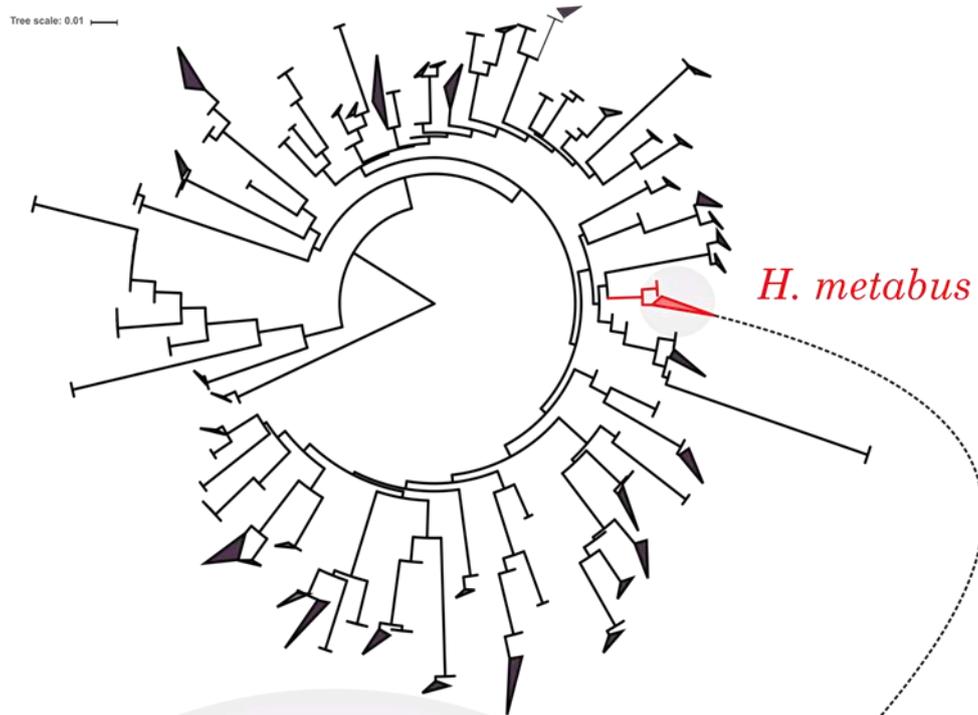
Figure 21).



**Figure 21:** Distribution de la distance génétique (K80) par paire du fragment Cox 1 de 714 séquences d'*Hylesia* spp.. b, distance par paire classées, c, nombre de groupe parmi lesquels les séquences ont été partitionnées en fonction des valeurs de divergence intra-spécifiques.

Aussi, les 774 séquences soumises à l'analyse de l'ABGD ont été partitionnées entre 96 et 120 groupes pour les priors de divergence interspécifique compris respectivement entre 0.007 et 0.019. Parmi ces 96 groupes, les 27 séquences d'*H. metabus* ont été regroupées en un seul groupe. La réalisation d'un arbre de Neighbour joining, basé sur les séquences code-barres des 774 séquences de 510 pb, a montré également le regroupement des 27 séquences d'*H. metabus* au sein des *Hylesia* (Figure 22).

a



b

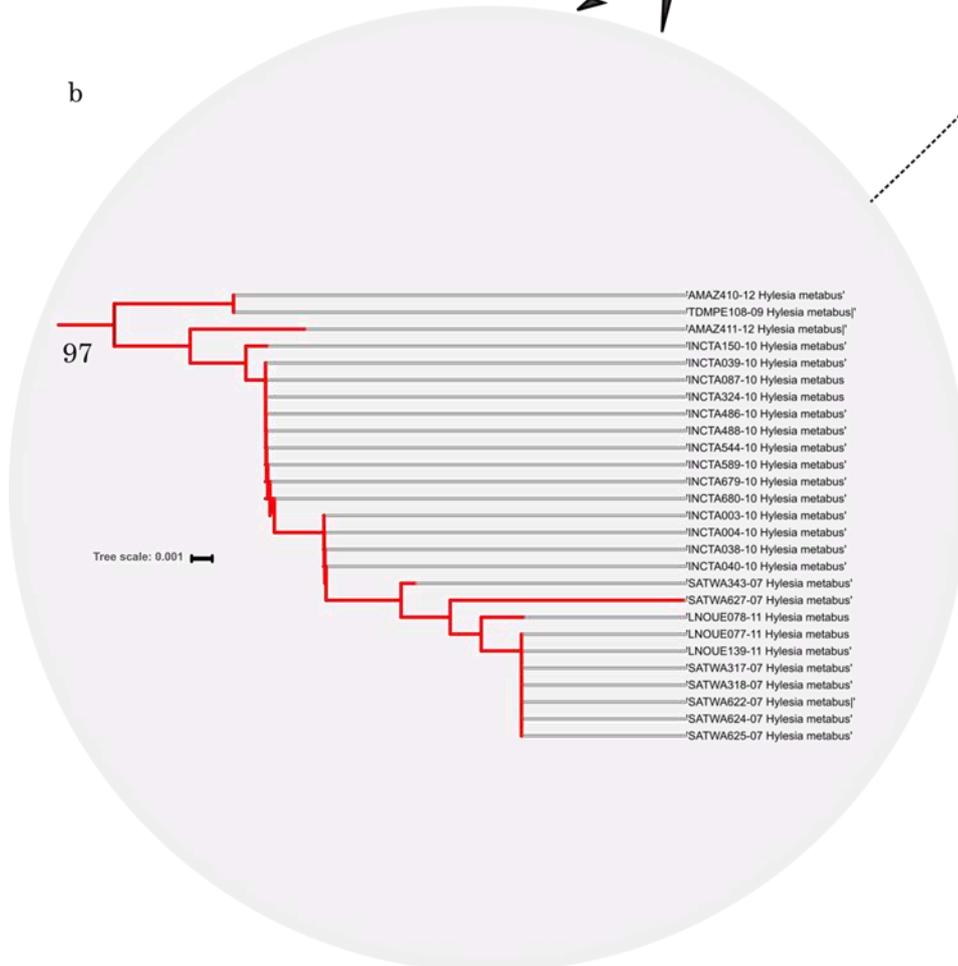


Figure 22 : a) Arbre Neighbour Joining de 774 séquences d'*Hylesia* (téléchargement à partir de BOLD en rouge des séquences appartenant à *H. metabus* ; B) Détail du nœud de l'arbre qui regroupe toutes les séquences d'*H. metabus*.

Les séquences présentes sur BOLD identifiées morphologiquement comme appartenant à *H. metabus* sont associées à un seul groupe/BIN (AAA3035). Ce BIN AAA3035 contient notamment les métadonnées de 88 autres séquences, dont 59 séquences identifiées morphologiquement comme *H. metabus* et 15 séquences identifiées comme *Hylesia* sp. Le bin BIN AAA3035 contient des séquences d'individus de Guyane, du Pérou, du Venezuela, du Brésil, de Trinidad, de Bolivie, d'Equateur et de Colombie. La divergence maximale au sein du BIN AAA3035 n'excède pas 2.33%, et se distingue de son bin voisin le plus proche par une divergence minimale de 2.45% (Figure 23). La concordance du regroupement basée sur la morphologie des *H. metabus* et leur regroupement en BIN dans BOLD, en Cluster par l'ABGD et dans l'arbre de Neighbour-joining a permis de mettre en évidence qu'*H. metabus* représente un groupe distinct et unifié par leurs barcodes au sein du genre. Cette indication m'a permis d'ajuster le seuil de divergence interspécifique, qui est généralement fixé à 2 % pour le Cox1 chez les lépidoptères (Burns, Janzen and Hajibabaei, 2008). Ce seuil a été utilisé pour permettre d'infirmer la présence d'espèces autres que *H. metabus* au sein d'un groupe de séquences en estimant leurs divergences.

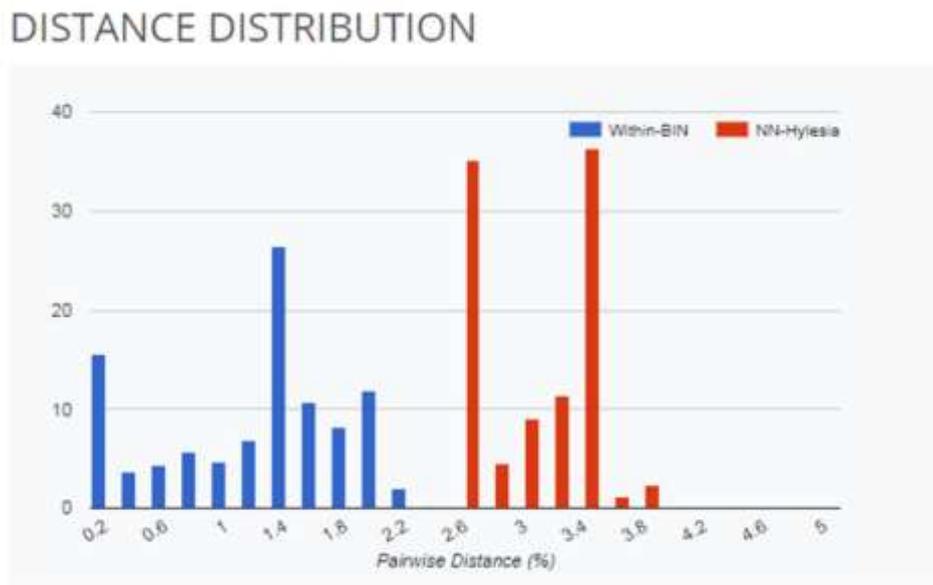


Figure 23: Distance génétiques par paires des séquences du BIN AAA3035 (bleu) et de son BIN le plus proche, tiré de BOLD (rouge).

## 4.2. Identification des espèces d'*Hylesia* responsables de la papillonite en Guyane et au Venezuela.

Pour préciser l'implication éventuelle d'autres espèces d'*Hylesia* en Guyane et au Venezuela dans les épisodes de papillonite, l'analyse des séquences de 414 pb du fragment Cox1 des d'individus d'*Hylesia* issus d'épisodes de pullulations en Guyane

et au Venezuela a été réalisé. Les séquences de 144 individus ont été utilisées, dont 29 appartenant à des individus issus des pullulations de 2012, 35 d'individus issus des pullulations de 2014, et 29 appartenant à des individus du Venezuela. Un dernier groupe de 52 individus a été ajouté, correspondant à des séquences de papillons que j'ai identifiés comme appartenant à *H. metabus* capturés hors période de pullulation. Une analyse par BLAST (Basic Local Alignment Tool) sur la plateforme BOLD des 144 séquences a renvoyé un pourcentage de similitude compris entre 99.4% et 100 %. La totalité des séquences a ainsi renvoyé une correspondance avec une séquence de l'espèce *H. metabus* associée au BIN AAA3035. Les divergences des 144 séquences ont montré une divergence inférieure à 0.01% pour les séquences du Cox1.

L'assignation systématique des barcodes des *Hylesia* retrouvés dans les phénomènes de pullulation en Guyane et au Venezuela a donc révélé de manière non ambiguë la présence d'une seule OTU au sein de nos quatre groupes. De par les différences morphologiques subtiles des *Hylesia*, l'utilisation des barcodes ADN a représenté une précieuse source d'information complémentaire et indépendante pour corroborer les résultats de l'approche traditionnelle. Dans ce cas précis, la proximité des séquences des individus responsables des pullulations, en accord avec les observations rapportant l'implication d'*H. metabus* de papillonite en Guyane et au Venezuela, nous a permis de recentrer notre étude sur les *H. metabus* et nous a amené à étudier plus spécifiquement la structure génétique de ses populations.

Ces résultats ont été présentés de manière préliminaire dans le poster qui suit, accepté lors du 25<sup>ème</sup> Congrès International d'Entomologie, tenu à Orlando (Floride, USA) du 25 au 30 Septembre 2016.

# Genetic structure of *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae), moths responsible for lepidopterism outbreaks in French Guiana and Venezuela

Marina Carrasco<sup>1</sup>, Marie-Anne Auger-Rozenberg<sup>2</sup>, Melhian Herrera<sup>1</sup>, Niklas Tykhalin<sup>3</sup>, Alain Roques<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CNRS, Entom, French Guiana; <sup>2</sup>INRA, Orléans, France; <sup>3</sup>Coordinación de Epidemiología Entomológica, Gerencia de Servicios Ambiental y Control de Endermas, FUNDASALUD, Venezuela; <sup>4</sup>INRA, Avignon, French Guiana



Poster #113657

## Introduction

The genus *Hylesia* Hübner (Lepidoptera Saturniidae) are **moths of human health importance** in South America, inducing **epidemic outbreaks of lepidopterism**, a pruriginous dermatitis caused by the urticating properties of the females' abdominal setae. They are also considered as an **agricultural pest** due to their potential to defoliate plants in agriculture and forest systems. *Hylesia metabus* are considered as responsive of major outbreaks of lepidopterism reported in Venezuela and French Guiana since the last century. However, the exact species undergoing individual outbreaks are not easy to pinpoint with certainty: the *Hylesia* genus is quite complex, owing to its incredible local diversity in Amazonia, high intraspecific morphological variances and lack of interspecific diagnostic traits.

## Objectives

Identify the **number of *Hylesia* species** involved in pest moth outbreaks of public health importance, and study the **genetic population structure** to improve our understanding of outbreak patterns and design effective **outbreak control programs**.



## Methods

### Collection sites

**399 samples** throughout the two major outbreak areas in Venezuela (n=117) and French Guiana (n=282) Figure 1.



### Mitochondrial marker

DNA barcoding sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene was used for species delimitation of outbreaking *Hylesia*.

### Microsatellite markers

Seven polymorphic microsatellite loci were developed for *H. metabus* by using next generation sequencing of a microsatellite-enriched DNA library.

### Genetic structure

Population genetic structure was investigated using two approaches:

- (1) The **Bayesian approach** conducted using the software GENELAND (Gaillardet et al. 2005), written in R, used to infer the number of populations in Hardy-Weinberg and linkage equilibrium (with the correlated allele frequency model, and without spatial information).
- (2) **Multivariate approach** by performing a Discriminant analysis of principal components (DAPC) (Jombon et al. 2010)



## Results

The mean genetic distance of mtDNA within outbreaking *Hylesia* was below 1%, and comparison with barcoding databases identified all individuals as *H. metabus*. Bayesian and multivariate analyses suggest 3 significant genetic clusters: GENELAND reached convergence of the MCMC with the most likely value of K at K=3 (Fig.2). The DAPC give similar result to those detected by the Bayesian clustering analysis, where 94 % of individuals were assigned identically using both methods (Fig.3).

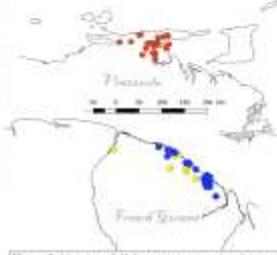


Figure 2: Mapping of *Hylesia* specimens assigned to each cluster with a posterior probability of membership > 90 %. Individuals are shown by different colors, one dot can represent from one to 50 individuals.

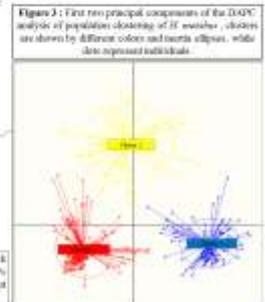


Figure 3: First two principal components of the DAPC analysis of population clustering of *H. metabus*: clusters are shown by different colors and convex ellipses, while dots represent individuals.

## Conclusion

Genetic data suggest the presence of **three sub-populations**: One encompassing all individuals from **Venezuela**, and two spatially overlapping clusters in **French Guiana**. All moths sampled during outbreak events in French Guiana belonged to a single species, *H. metabus*, and notably were all assigned to a single cluster (3), revealing the source of lepidopterism outbreaks and which populations need to be the target of control programs. These findings emphasize the utility of molecular approaches for designing specific moth regulation policies aimed at protecting local residents.

## 5. STRUCTURE GENETIQUE ET DIVERSITE DES POPULATIONS D'*H. METABUS* LEPIDOPTERE RESPONSABLE DE LA PAPILLONITE EN GUYANE ET AU VENEZUELA.

---

Bien que *H. metabus* soit considérée comme l'espèce responsable des épisodes de lépidoptérisme au Venezuela et en Guyane depuis le XXème siècle, aucun article scientifique ne mentionne l'utilisation des outils moléculaires afin d'étudier la connectivité génétique des individus de ces deux pays, outils pouvant pourtant s'avérer précieux à l'établissement des stratégies de lutte optimale contre cet insecte urticant.

Dans cette optique, j'ai utilisé la méthodologie du séquençage haut débit d'une banque à ADN, que j'ai enrichie en motif microsatellites, ce qui m'a permis de dessiner les amorces encadrant plus de 4000 microsatellites potentiels. Parmi ceux-ci, 30 ont été testés en laboratoire, et le multiplexage de sept microsatellites polymorphes a été analysé. La collaboration que j'ai mise en place avec le Venezuela, a permis d'intégrer à cette étude des *H. metabus* provenant du Venezuela. J'ai finalement utilisé les sept microsatellites développés en association avec un marqueur mitochondrial pour analyser les *H. metabus* prélevés dans ces deux zones majeures de pullulation en d'Amérique du Sud. L'étude présentée dans l'article qui suit détaille les résultats de ces analyses. Elle confirme notamment les résultats du chapitre précédent en montrant que les individus des deux pays appartiennent probablement à une même espèce génétiquement structurée en plusieurs populations. Les marqueurs microsatellites, validant les résultats mitochondriaux, suggèrent la présence de trois populations : l'une englobant tous les individus du Venezuela, et deux autres en Guyane.

Les *H. metabus* échantillonnés en Guyane semblent ainsi structurés en deux populations, la première regroupant les individus issus des sites de collectes proches de la côte, et la deuxième incluant des sites plus éloignés de la côte. Les individus issus des pullulations de 2012 et 2014, ont tous été assignés au même cluster, formant un seul cluster avec les individus des autres sites côtiers. Ces analyses révélant que les *H. metabus* sont génétiquement structurés en plusieurs clusters ont fourni une information capitale à la définition des unités de gestion de cet insecte. En effet, l'étude suggère que le déplacement des adultes d'*H. metabus* est très faible entre sites proches (quelques km) et n'est pas suffisante pour homogénéiser génétiquement les populations à l'échelle régionale et locale ainsi que pour synchroniser les dynamiques intra-cluster. Les clusters génétiques d'*H. metabus* identifiés en Guyane sont en accord avec les observations antérieures des villes touchées par le passé par la papillonite, notamment Cayenne, Sinnamary, Iracoubo, Kourou, et certaines paradoxalement moins impactées telles que Montsinéry et Saint-Lau-

rent du Maroni. Cela suggère que les pullulations s'initient à partir de sites côtiers qui, indépendamment les uns des autres, voient leur densité augmenter de manière très localisée, cela bien que l'ensemble fonctionne comme une seule population.

Cette structuration génétique observée est inhabituelle chez les insectes pullulants qui présente généralement une homogénéité génétique. Les clusters génétiques identifiés pouvant différer dans leur réponse aux stratégies de lutte, tels que les taux de résistance aux biocides, ou dans la composition de leurs phéromones sexuelles, nécessitent en conséquence la définition d'unités distinctes de gestion.

La mise en évidence du caractère asynchrone et hétérogène de pullulations des *H. metabus* à petite échelle (10-20km), est un élément capital à prendre en compte dans la gestion de cet insecte. Notamment pour la surveillance et les relevés de terrain permettant l'estimation des densités de chenille et la prévision des pullulations, qui de ce fait, doit s'effectuer à l'échelle d'une dizaine de km. Il est également important de souligner la mise en évidence de l'homogénéité génétique du groupe côtier traduisant la connectivité génétique des individus de la côte ce qui, dans ce cas de figure, peut favoriser le transfert des gènes de résistances à un produit biocide.

A l'avenir, les marqueurs développés pourront être utilisés pour améliorer la compréhension du fonctionnement des populations d'*H. metabus*, et enrichir la compréhension de leur dynamique et ainsi participer à la conception de programmes de lutte intégrés. *H. metabus* étant largement répandu en Amérique du Sud, l'étude de la susceptibilité de ses populations à pulluler sous certaine condition, permettra plus largement d'améliorer les connaissances de la dynamique des populations d'insectes phytophages en milieu tropicale hyper diverse. Tout ceci permettant à son tour d'évaluer le lien entre l'augmentation de la fréquence des pullulations des insectes phytophages généralistes et la perte de biodiversité.

Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit qui a été soumis dans le journal *Tropical Ecology*.

# Genetic variation and differentiation of *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae): moths of public health importance in French Guiana and in Venezuela.

**Running title:** Population genetics of *Hylesia metabus*

Marina Ciminera<sup>1</sup>, Marie-Anne Auger-Rozenberg<sup>2</sup>, Henri Caron<sup>3</sup>, Melfran Herrera<sup>4</sup>, Caroline Scotti-Saintagne<sup>5</sup>, Ivan Scotti<sup>5</sup>, Niklas Tysklind<sup>3</sup>, Alain Roques<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>CNRS, UMR0745 Ecologie des Forêts de Guyane (EcoFoG), AgroParisTech, Cirad, INRA, Université des Antilles, Université de Guyane, Campus Agronomique, Avenue de France, BP97387 Kourou Cedex, France

<sup>2</sup>INRA, UR633, Zoologie Forestière, 45075 Orléans, France

<sup>3</sup>INRA, UMR0745 Ecologie des Forêts de Guyane (EcoFoG), AgroParisTech, Cirad, CNRS, Université des Antilles, Université de Guyane, Campus Agronomique, Avenue de France, BP97387 Kourou Cedex, France

<sup>4</sup>Coordinación de Vigilancia Entomológica, Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias, FUNDASALUD, Carúpano, Estado Sucre, Venezuela.

<sup>5</sup>INRA, UR629, Unité de Recherches Forestières Méditerranéennes, Avignon, France

Corresponding author: marina.ciminera@ecofog.gf

## Abstract:

*Hylesia* moths impact human health in South America, inducing epidemic outbreaks of lepidopterism, a puriginous dermatitis caused by the urticating properties of females' abdominal setae. The classification of the *Hylesia* genus is complex, owing to its high diversity in Amazonia, high intraspecific morphological variance, and lack of interspecific diagnostic traits which may hide cryptic species. Outbreaks of *Hylesia metabus* have been considered responsible for the intense outbreaks of lepidopterism in Venezuela and French Guiana since the C20, however, little is known about genetic variability throughout the species range, which is instrumental for establishing control strategies on *H. metabus*. Seven microsatellites and mitochondrial gene markers were analysed from *Hylesia* moths collected from two major lepidopterism outbreak South American regions. The mitochondrial gene sequences contained significant genetic variation, revealing a single, widespread, polymorphic species with distinct clusters, possibly corresponding to populations evolving in isolation. The microsatellite markers validated the mitochondrial results, and suggest the presence of three populations: one in Venezuela, and two in French Guiana. All moths sampled during outbreak events in French Guiana were assigned to a single coastal population. The causes and implications of this finding require further research.

**Keywords:** Human health, *Hylesia metabus*, Lepidoptera, lepidopterism outbreak, microsatellites, mitochondrial barcodes, Neotropics, population genetics, population outbreak.

## Abstracto:

Las polillas del género *Hylesia* impactan la salud humana en Sudamérica, induciendo brotes epidémicos de lepidopterismo, una dermatitis pruriginosa causada por las propiedades urticantes de las setas abdominales de las hembras. La clasificación del género *Hylesia* es compleja, debido a su gran diversidad en Amazonía, la alta variabilidad morfológica

intraespecífica y la falta de características diagnósticas interespecíficas que pueden ocultar especies crípticas. Se considerada a los aumentos explosivos de la población de *Hylesia metabus* como responsable de los intensos brotes de lepidopterismo en Venezuela y la Guayana Francesa desde el S.20, sin embargo, se sabe poco sobre la variabilidad genética en toda su área de distribución, que es fundamental para establecer estrategias de control de *H. metabus*. Siete microsatélites y marcadores de genes mitocondriales se analizaron en polillas de *Hylesia* recolectadas en dos regiones principales de brotes de Sudamérica. Los genes mitocondriales contenían una variación genética significativa, que revela una única especie, diseminada geográficamente y polimórfica con grupos distintos, posiblemente correspondiendo a poblaciones evolucionando de forma aislada. Los microsatélites validaron los resultados mitocondriales y sugieren la presencia de tres poblaciones: una en Venezuela y dos en la Guayana Francesa. Todas las polillas muestreadas durante los brotes en la Guayana Francesa fueron asignadas a una sola población costera. Las causas y las implicaciones de este hallazgo requieren más investigación.

### **Introduction:**

Moths in the genus *Hylesia* Hübner, (Hübner, 1820)(Lepidoptera: Saturniidae) affect human health in South America (Carrera, 1991; Battisti *et al.*, 2017), as both larvae and adults have urticating properties. Setae of mature larvae can cause dermatitis, an irritating skin rash, when in contact with human skin. Adult females, however, constitute a major human health concern. Their abdomen can release extremely urticating setae into the surrounding air, causing severe disease outbreak events known as ‘lepidopterism’, including: itchy dermatitis, lesions of buccal mucosa, conjunctivitis, and respiratory distress (Lamy *et al.*, 1982; Battisti *et al.*, 2011). *Hylesia* are also considered agricultural pests as they can defoliate plants in agriculture and forest systems (Zanuncio *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1996; Specht *et al.*, 2006). The genus *Hylesia* is complex, with more than 110 recognised species, displaying intraspecific morphological variances, sexual dimorphism, and few and minor interspecific diagnostic traits (Lemaire, 2002). These characteristics have led to numerous homonyms and several rearrangements within the genus (Lemaire, 2002). The lack of clear and easily identifiable diagnostic traits has resulted in lepidopterism reported without identification of the *Hylesia* species involved. The biology is partially known only for the few species that cause human health problems (Lemaire, 2002). One of these species, *Hylesia metabus* (Cramer 1775), is frequent at low altitudes in the Guianas, Venezuela, Brazil, Ecuador, Peru, and Bolivia, with the exception of the pacific side of the Andes mountains, the southeast of Brazil, and arid and semi-arid zones (Lemaire, 2002). Like many other moths, *H. metabus* is attracted to artificial light. Combined with the species’ potential for outbreaking, this results in serious invasion events in human settlements. Although *H. metabus* has a large distribution range, population outbreaks and the associated lepidopterism outbreaks are mainly reported from French Guiana (Vassal, 1989; Lemaire, 2002) and Venezuela (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2011) near the coast. Despite its impact on human health, many aspects of the biology of *H. metabus* remain unclear and its systematic status is still confused, with at least seven morphologically closely related species in the genus displaying minor differences in their genitalia and their wing patterns (Lemaire, 2002). *H. metabus* has been described as polyphagous, with host plant records including more than twenty-five tree species belonging to 16 different genera (Vassal, 1989; Lemaire, 2002). In French Guiana, *H. metabus* is found in the coastal anthropized zones and in inland forests, displaying ecosystem-specific colour variation: the “pink and dull yellow” form, most commonly en-

countered in coastal areas, and the “brown” form, occurring mainly in inland forests (Vassal, 1989; Lemaire, 2002). The morphological variations and the occurrence of population outbreaks associated with particular ecotypes could indicate the existence of cryptic species. Cryptic species are usually understood to be two or more species classified as a single one based on morphological similarity (Pfenninger and Schwenk, 2007). Effective integrated insect management depends on accurate species delimitation, therefore, the first step of such management programmes must be the identification of all species involved (Irwin, 1999). Given *H. metabus* is a native species with a large geographical range that can experience rapid increases in local population density, the understanding of its movement patterns and population dynamics is also of critical importance to management programmes. Incorrect identification of species or of intraspecific entities can lead to pest control failures, by improper use of pesticides or incorrect introduction of host-specific control agents (Rosen, 1986; Van Toor *et al.*, 2008). The recognition of cryptic species has increased rapidly in the C21 with advances in DNA sequencing technologies. Mitochondrial DNA (mtDNA) markers are the most commonly used genetic marker to approach the delimitation of insect species thanks to the mtDNA high mutation rate, maternal inheritance, and high copy number (Ashfaq *et al.*, 2016). Accordingly, mtDNA has been successfully used to identify and detect cryptic species complexes in Lepidoptera (Burns *et al.*, 2008; Wilson, Sing and Sofian-Azirun, 2013; Huemer, Karsholt and Mutanen, 2014; Dincă *et al.*, 2015). However, the use of mtDNA as a sole species identifier can be misleading in case of closely related species, introgression, or hybridization (Kekkonen *et al.*, 2015). The issue can be resolved by using additional genetic markers, such as microsatellite markers, to assess the amount of gene flow among divergent lineages (McKendrick *et al.*, 2017). Microsatellites are co-dominant and highly polymorphic nuclear markers that allow the detection of high-resolution population genetic structure, and have thus been widely used to assess the genetic structure of populations, and to inform the management of insect pest species. However, developing microsatellite markers in non-model species can be costly, time consuming, and especially problematic for some taxa such as butterflies and moths, mosquitoes, mites, ticks, nematodes, bivalves, and birds (Primmer *et al.*, 1997; Fagerberg, Fulton and Black, 2001; Cruz, Perez and Presa, 2005; Sinama *et al.*, 2011). The high similarity of flanking regions among microsatellite loci, microsatellite association with transposable elements, and high frequency of null alleles are common issues encountered during the development of microsatellite markers for Lepidoptera (Meglec *et al.*, 2004; Nowak, Brown and Hellmann, 2009; Sinama *et al.*, 2011). Nevertheless, advances in high throughput sequencing technologies, and its application to microsatellite-enriched libraries, has promoted the development of microsatellites for Lepidoptera (Franck *et al.*, 2005; Torres-Leguizamon *et al.*, 2009). Using mitochondrial markers, we investigate the existence of cryptic species in *Hylesia* moths involved in outbreaks of lepidopterism in French Guiana and Venezuela. Then, to specify the scale of population genetic structuring, we develop polymorphic microsatellite markers for *H. metabus*. Finally, we compare mitochondrial and microsatellites markers to analyse the genetic variation within and among 24 sampling sites in two areas where intense outbreak events have been recorded frequently over the last century, focusing on assessing which populations to target with control programmes.

## Methods

### *Sampling sites and DNA extraction*

A total of 399 individuals, morphologically identified as *H. metabus*, were collected in Venezuela and French Guiana, the main areas of reported *H. metabus* population out-

breaks (Fig. 1). Samples were obtained from 11 sampling sites in French Guiana and 13 sampling sites in Venezuela (VEN) between 2012 and 2015. Outbreak events were recorded in French Guiana in 2012 in the area of Cayenne (CAY) and in 2014 near Sinnamary (SIN). Larvae were collected by direct sampling on host plants, while moths were collected using light traps. Only one larva per caterpillar patch was analysed to avoid sampling of related larvae. Moths and larvae collected in the field were preserved in 70 % ethanol and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Total genomic DNA was extracted from one moth leg or from caterpillar Malpighian tubes using DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN<sup>TM</sup>, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol.

#### *Mitochondrial DNA sequencing and sequence analysis*

Primers to amplify a 614 base pair region of the mitochondrial cytochrome oxidase I (Cox1) gene were designed with Primer3 (Rozen *et al.*, 2000) based on a ClustalW (Thompson, Gibson and Higgins, 2002) alignment of complete mitochondrial Cox1 gene sequences of *Samia cynthia cynthia*, *Samia cynthia ricini*, *Antheraea pernyi*, *Eriogyna pyretorum* and *Actias selene* available on GenBank (GenBank accession number: KC812618, NC017869, JN215366, NC004622, AY242996, FJ685653, NC012727, NC018133, and JX186589). The specifically-designed primers for *H. metabus*, LCO-HYL (5' -ATA TTG GAA CTT TAT ATT TCA TTT TTG G-3' ) and HCO-HYL (5' -CCT ACA GTA AAT ATA TGA TGA GC-3' ), were used to amplify the Cox1 gene in 144 samples (Table 1) through polymerase chain reaction (PCR). For a subset of samples with degraded DNA, a shorter 430 base pair region of the Cox1 was amplified with primers MLep F1: (5' GCT TTC CCA CGA ATA AAT AAT A 3' ) (Hajibabaei *et al.*, 2006) and LepR1: (5' TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA 3' ) (Hebert *et al.*, 2010). PCR cocktails of 25  $\mu\text{L}$  reactions had a final concentration of 0.025 units/ $\mu\text{L}$  of *Taq* polymerase (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 1 $\times$  PCR buffer (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 2 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM of each dNTP, 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, and 0.1-0.6 ng of DNA. PCR conditions were as follows: initial denaturing step at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, 35 amplification cycles ( $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $51^{\circ}\text{C}$  for 35 s,  $72^{\circ}\text{C}$  for 45 s), and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$ . PCR product were purified using Multiscreen 96-Well Filter Plates (EDM Millipore<sup>TM</sup>) and then sequenced in both directions using the same primer pairs on an ABI3130XL DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Forward and reverse sequences were assembled into contigs and visually checked using CodonCode aligner version 4.2.4 (CodonCode Corporation). The final alignment was truncated to omit missing base pairs. The 144 Cox1 sequences were aligned using ClustalW in MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), and the genetic distances among sequences calculated with the Kimura 2-parameter model in MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). The number of variable and parsimony-informative sequence sites, haplotype diversity ( $Hd$ ), and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were determined using the program DnaSP V5 (Librado *et al.*, 2009). Genetic differences among haplotypes were represented by median-joining network using popart (Leigh *et al.*, 2015) according to sampling sites of the 144 individuals. An analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted using Arlequin (Excoffier *et al.*, 2010), according to clusters inferred by the analysis of microsatellite data (see below).

#### *Microsatellite development, genotyping, and data analyses*

The total genomic DNA of six individuals from French Guiana was used to construct the microsatellite-enriched DNA library using an enrichment method for amplifying specific microsatellite repeats (Teuchen *et al.*, 2010a). Briefly, genomic DNA was digested with two

restriction enzymes, and the resulting fragments ligated to specific adapters. Biotinylated oligo repeats (AG, AC, ACAG, ACCT, ATC, AAGC) were hybridised to select those containing microsatellite motifs, and subsequently amplified to construct the enriched library. The microsatellite-enriched DNA library was sequenced on an Ion Proton™ sequencer at the Platform Genome Transcriptome (PGTB) of the Center for Functional Genomics of Bordeaux (CGFB) generating 402,683 reads. Adaptors were removed using cutadapt version 1.2.1 (Martin, 2011) and reads were trimmed using Sickle (Joshi and Fass, 2011): bases with a Phred score of <20 were filter out and reads shorter than 80 bases after trimming were removed. The quality of the remaining reads was checked using FastQC version 0.10.0 (Andrews, 2010). The resulting reads were assembled into contigs using the default options of CAP3 (Huang *et al.*, 1999), and microsatellite loci were identified using QDD pipeline version 3.0 (Megléczy *et al.*, 2010). Primer pairs were designed matching the flanking sequences of microsatellites repeats with Primer3 version 0.4.0 (Rozen *et al.*, 2000). PCR primers were designed if (i) the resulting PCR product was between 100 and 350 bp long, (ii) the flanking region contained, at most, five repeats of any di-hexa base-pair motif, (iii) the annealing temperature of primers was between 57 and 63 °C, (iv) the self-complementarities of primers and the complementarities between primers matched the quality criteria used as default parameters in Primer3. Primer pairs for the best 30 microsatellites were synthesised for initial validation. Primer pairs that successfully PCR-amplified and produced polymorphic amplicons were selected and genotyped on 399 individuals of *H. metabus* collected from 24 sampling sites. Amplification was carried out using Multiplex PCR Kits (Qiagen). PCR cocktails of 6 µl were composed of a final concentration of 1x Master Mix, 0.2 µM of each R and F primer where the forward primer 5' -end was labelled with one of three fluorophores (6-FAM, VIC, or NED) (supplementary Table S1), and 0.1-0.3 ng of DNA template. The thermocycler conditions were as follows: initial denaturation at 95 ° C for 15 min, followed by 26 cycles of denaturation at 94 ° C for 30 s, annealing at 58 ° C for 1 min 30 s, extension at 72 ° C for 1 min and final extension at 60 ° C for 30 min. Amplicons were sequenced on a ABI3130XL DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems), with a GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Applied Biosystems) and fragments were sized with GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). Number of alleles per locus, and population heterozygosity statistics were calculated using Genalex 6.41 (Peakall & Smouse 2006). Departures from Hardy–Weinberg equilibrium and linkage equilibrium were tested using Genepop v 4.3 (Raymond and Rousset, 1995b). Null alleles and other potential technical biases were tested using Micro-Checker v2.2.3 (Van oosterhout *et al.* 2004). The level of genetic differentiation between sampling sites was estimated by computing pairwise  $F_{ST}$  (Weir *et al.*, 1984) and the significance of each pairwise  $F_{ST}$  value was assessed by 10,000 bootstrap permutations using Arlequin (Excoffier, L. and Lischer, 2010).  $G''_{ST}$  (Meirmans *et al.*, 2011) values were calculated using the DiveRsity package (Keenan *et al.*, 2013) in the R programming language (R Core Team, 2017). Unbiased Global  $F_{ST}$ 's (Weir, 1996) were also estimated following the Excluding Null Alleles (ENA) method using FreeNA (Chapuis *et al.*, 2007). Population structure was inferred using two complementary clustering methods implemented in R packages: *Geneland* (Guillot, Mortier and Estoup, 2005) and *Adegenet* (Jombart, 2008). *Geneland* estimates the number of populations (k) based on a model assuming population conformance to Hardy–Weinberg and linkage equilibrium, and assigns probabilistically individual genotypes to their population of origin; *Geneland* was run under both the correlated and uncorrelated allele frequency model, to evaluate the impact of genetic assumptions on the estimation of k, and under the spatial and non-spatial model, to evaluate the impact of geographical distribution of individuals. The spatial model assumes that populations are spatially organized as a set of non-overlapping polygons. For all com-

binations of conditions (allele frequency and spatial data) we allowed  $k$  to vary between 1 and 10 in 10 independent runs, each with 100,000 iterations and a thinning of 100. The algorithm takes into account the presence of null alleles, hence all loci were retained (Guillot, Santos and Estoup, 2008). *adeigenet* allows genetic-assumptions-free multivariate analysis of allele distributions. Population structure of the total dataset was inferred using multiple K-means clustering of discriminant analysis of principal component (DAPC) (Jombart *et al.*, 2010), followed by assessment of the Bayesian information criterion (BIC), run for  $k$  values ranging from 1 to 10 using the function *find.clusters*. The curve of Bayesian information criterion (BIC) values for each  $k$  was visually examined and the elbow in the curve of BIC was chosen as the best  $k$  value. Principal components that explained more than 90 % of the cumulative variance were retained, as well as all discriminant functions. The frequencies of individuals assigned to the most probable cluster were mapped as pie charts to visualize the geographic distribution of the inferred clusters. To check reliability of the results, correspondence among the individual assignments to clusters estimated with both approaches was compared. The percentage of individuals assigned to the same cluster (up to 80 % of assignment probability) was calculated. A neighbour-joining (NJ) tree (Saitou *et al.*, 1987) was constructed from microsatellite data using the chord distance (Cavalli-Sforza *et al.*, 1967) with 1,000 bootstrap replications using *poppr* package in R (Kamvar *et al.*, 2013). An analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted based on an average over seven microsatellite loci using *Arlequin* (Excoffier *et al.*, 2010).

## Results

The final alignment of the mitochondrial Cox 1, lead to 413 base pairs without gaps, with an average genetic distance of 0.005 (uncorrected p-distance) within the 144 individual samples. The mitochondrial gene revealed a total of 16 haplotypes separated by one to seven mutations steps in the 144 individual samples (Fig 2), with 15 polymorphic sequence sites, and nine parsimony-informative sequence sites. Haplotype diversity of the total dataset was estimated to  $Hd=0.774$  and a nucleotide diversity of  $\pi=0.052$  (Table 1). Intra-sampling site haplotype diversity varied from  $Hd=0.000$  to  $Hd=0.700$  and nucleotide diversities ( $\pi$ ) ranging from 0.001 to 0.007. The median-joining network of mtDNA shows that Haplotype 11 is the most frequent haplotype of French Guiana samples, shared among eight of the 11 sampling sites. Eleven haplotypes were private to single sampling sites. Haplotype 7 is the most frequent haplotype in Venezuela sampling sites and was restricted to Venezuela.

Of the 402,683 reads sequenced from the microsatellite-enriched library, 294,471 passed the quality checks and had lengths between 80 and 466 bp. The cleaned reads were then assembled into 37,443 contigs with an average length of 271 bp and an average coverage depth of 4.10 reads per nucleotide position. A total of 4,117 microsatellite loci were identified, and 23,258 primer pairs were designed according to the flanking sequences of 1,398 microsatellites repeats. Of the 30 primer pairs initially tested, 8 loci produced identifiable amplicons, whilst 22 failed to produce a PCR product. Of the eight loci tested, seven are polymorphic microsatellites (Table S1 for primers sequences, repeat motif, and allele size range). The microsatellite dataset contained several alleles, ranging from three to seven alleles per locus, with a mean number of 2,40 alleles per locus, and an average observed heterozygosity ( $H_o$ ) of 0.280. No significant linkage disequilibrium among loci was detected.

Significant departures from Hardy–Weinberg equilibrium ( $p < 0.001$ ) were observed in 13 of 168 single-locus exact tests (Supplementary table S2). Analysis with Micro-Checker revealed that 13 departures could be due to null alleles. No locus showed evidence of scoring error due to stuttering or large allele dropout. The global value of  $F_{ST}$  ( $F_{ST}=0.305$ ),  $F_{ST}$  calculated with ENA ( $F_{STENA}=0.307$ ) and  $G''_{ST}$  ( $G''_{ST}=0.426$ ), indicates the existence of genetic structure in the dataset. The repartition of pairwise  $F_{ST}$  and  $G''_{ST}$  values among sampling sites (Table 2), shows strong and significant genetic differentiation between Venezuela and French Guiana samples and among French Guiana sampling sites. The pairwise  $F_{ST}$  calculated with ENA method give similar results (supplementary Table S3).

The number of clusters inferred with the genetic-assumption-model-based approach implemented in the software Geneland indicated the best possible  $k$  was  $k=3$ , with 92.5 % of the runs of the different models converging to  $k=3$ . The remainder of the runs indicated a best possible  $k$  for  $k=4$  when assuming a correlated allele frequency and non-spatial model. However, those settings show lack of MCMC convergence, where the replicate chains lead to different estimation of the best possible  $k$  (supplementary file Table S4). Because all models identify generally similar structure patterns, identifying one cluster in Venezuela and two in French Guiana, only the map of posterior probabilities of *H. metabus* membership defined by Geneland using the uncorrelated allele frequency model with spatial information for  $k=3$  are shown in Figure 3. Those result agree with the DAPC analysis showing an elbow of BIC values for  $k=3$ , the curve of BIC value continue to decrease after  $k>3$ , suggesting possible finer organization levels or complex patterns of population genetic structure. The spatial distribution of those clusters corresponds to those inferred by Geneland (Figure 4). The NJ-tree organization also confirms the same genetic structure (Figure 3). Three groups are again identified: one for Venezuela and two for French Guiana. All methods split French Guiana sampling sites into two clusters, one containing Cayenne (CAY), Iracoubo (IRA), Kaw (KAW), Kourou (KOU), Saint-Elie (SAE), Sinnamary (SIN), which includes all samples associated with outbreak events (CAY, IRA, KOU, SIN). The other French Guiana cluster contained the sampling sites of Montsinery (MON), Paracou (PAR), Petit-Saut (PES), Kourou PK21 (PK2), and Saint-Laurent-du-Maroni (SLM) where no outbreak events have been reported since the beginning of the C20. The comparison of the percentage of individuals assigned to the same three clusters using the DACP and *Geneland* showed that more than 91 % of individuals were assigned to the same cluster with up to 80 % assignment probability with both approaches. The AMOVA detected significant differentiation among clusters inferred by Bayesian analysis in the mtDNA dataset. The result of the AMOVA (Table 2) show that 35 % of variability detected with microsatellites and 51 % ( $p<0.001$ ) of variability detected with mtDNA was found among the three clusters of populations defined by *Geneland* and the DACP. Variance among sampling sites within these three clusters, explained 6.25% ( $p<0.001$ ) and 19% ( $p<0.001$ ) of the total variability for microsatellites and mtDNA respectively. The remainder of the variability was explained by individuals within sampling sites, 58.34% of the microsatellite variability and 28.49% in the mtDNA dataset (all  $p$  values  $p<0.001$ ).

## Discussion

As with many other examples of tropical forest species engaging in population outbreaks only known through non-peer-reviewed literature (Dyer *et al.*, 2012), scientific data available on *H. metabus* and on its population demographic patterns remain scarce, despite the frequent impact of *H. metabus* on human health since the beginning of the C20 (Jourdain *et al.*, 2012). Here, we provide the first evaluation of the number of *Hylesia* spe-

cies involved in outbreak events in French Guiana and Venezuela confirmed by genetic markers. Furthermore, we provide evidence of the lack of connectivity among identified populations at the continental and local scale for an insect known to engage in asynchronous outbreaks, contributing to the knowledge of population functioning and dynamics of tropical insects and the sources of outbreaks of lepidopterism (Dyer *et al.*, 2012).

*Evaluation of microsatellite markers, null alleles, and overall low levels of genetic diversity.*

We have developed the first set of microsatellite markers for a species in the genus *Hylesia*, that have proven to be useful for detecting population genetic structure and connectivity among populations. The microsatellites markers revealed that the *H. metabus* sample set exhibited low genetic diversity (consistently across loci and samples) compared to other Lepidoptera, as indicated by a relatively low mean number of alleles per locus (~2-3) and a low mean observed heterozygosity ( $H_o = 0.270$ ). Such low genetic diversity estimates can be caused by presence of null alleles (failed amplifications) leading to apparent heterozygote deficit (Chapuis *et al.*, 2007), and biased estimates of demographic parameters, particularly overestimating within-population inbreeding (Gomes *et al.*, 1999). Nevertheless, null alleles are expected to affect loci and populations heterogeneously, while in our study the low diversity congruence across loci and populations suggest a generally low diversity system. The F-statistics are potentially more affected by null alleles than Bayesian analysis of spatial genetic structure (Dakin and Avise, 2004; Dewoody, Nason and Hipkins, 2006; Wagner, Creel and Kalinowski, 2006), and has a limited effect on NJ-tree topologies based on Cavalli-Sforza and Edwards (1967) genetic distances (Chapuis *et al.*, 2007). In our analyses, all methods result in comparable patterns. Furthermore, the correction of allele frequencies for the presence of null alleles resulted in undistinguishable population structure patterns, altogether indicating that the observed genetic organization is not due to the effects of null alleles, but reflect the demographic and evolutionary history of *H. metabus* populations. Regardless of the potential bias on our microsatellite data, the analyses based on genetic models, multivariate analysis, and genetic distances provided congruent results. Furthermore, the microsatellite differentiation patterns we found among *H. metabus* samples are in concordance with the mitochondrial results, which also support genetic differentiation among the sampled sites.

Even if most other Lepidoptera species show higher levels of genetic diversity, low levels comparable to those found in *H. metabus* have been reported in some lepidopteran species with small and fragmented populations (Debinski, 1994). For example, in Lepidoptera that have experienced genetic bottlenecks during the process of speciation: *Aglaope infausta* (Schmitt and Seitz, 2004). Another explanation for the low genetic diversity we observe in our study could be that our sampling sites are located in the eastern part of the *H. metabus* geographic distribution range and the genetic diversity of animal populations has been shown to decline from the centre of its species distribution range to the periphery (Eckert, Samis and Loughheed, 2008). A more geographically exhaustive sampling would indicate whether the low genetic diversity we found for *H. metabus* is common throughout the species range, whether it signals the impact of low effective population sizes, or whether it is specific to the peripheral sites sampled.

*Hylesia metabus, a widespread species with differentiated populations*

Here we use mtDNA to assess the possibility that cryptic species are involved in different areas affected by episodes of population outbreaks causing lepidopterism outbreaks.

The mtDNA revealed a total genetic p-distance below 0.1%. This corresponds to the range of intraspecific genetic distances found in tropical Saturniidae species (Janzen *et al.*, 2012), which, combined with the presence of intermediate mtDNA haplotypes, supports the hypothesis that *Hylesia* collected from two regions in South America experiencing population outbreaks of moths morphologically identified as *H. metabus*, belong to a single, wide-spread, and polymorphic species with distinct clusters, possibly corresponding to populations evolving in isolation from one another.

Both mitochondrial and nuclear data suggest differentiation between French Guianan and Venezuelan samples, with unshared mitochondrial haplotypes, and significant strong differentiation detected with microsatellites, indicating that these populations are effectively isolated from one another.

All samples collected in Venezuela share a common, private, and dominant mtDNA haplotype, and form a single cluster according to the microsatellite data, indicating that *H. metabus*, at least in the State of Sucre, Venezuela, belong to a single population. Our findings also suggest that *H. metabus* in French Guiana comprise at least two different populations that are maintained despite their geographic proximity (few km). *H. metabus* mtDNA haplotypes are heterogeneously distributed in the French Guiana territory. Even though the most common haplotype (*Hap11*) represents more than 50 % of French Guiana individuals, *Hap11* is absent in the samples collected in Cayenne (CAY). Conversely, the most frequent haplotype in CAY is a private haplotype Hap 5, which is a possible indication of possible sub-structuring. *Geneland*, the DAPC, and the NJ-tree analyses provide concordant results: splitting French Guiana sampling sites into two clusters. The congruence of individual assignment using *Geneland* with correlated and uncorrelated allele frequency models indicates that there is a strong genetic structure signal in the dataset and that the inferred pattern does not depend on the choice of genetic models and algorithms. Furthermore, the results of the AMOVA of the mtDNA haplotypes show significant genetic differentiation among the three clusters inferred by microsatellite data, corroborating low gene flow at continental and at French Guiana scales.

#### *Drivers of population structure, population dynamics patterns, and management implications*

The factors that can generate genetic differentiation of phytophagous insects are geographical barriers, low dispersal ability, habitat fragmentation, and host plant availability (Mopper, 1996). These are not mutually exclusive and are most likely interrelated. All play a role in the management of insect regulation programmes. Gene flow in insect pest populations is an important factor for insect pest management programmes, as gene flow can facilitate the spreading not only of population increases, but also of insecticide-resistant genes (Herzig, 1995). The estimates of global  $F_{ST}$  ( $F_{ST}=0.305$ ,  $p<0.001$ ) for *H. metabus* are comparable to populations of Lepidoptera known to exhibit a low degree of dispersal (Franklin *et al.*, 2014). The dispersal range of adult *H. metabus* is not precisely known, but Saturniidae are considered poor flyers compared to other Lepidoptera (Bouvier, 1928), and a maximum record of flight dispersal of about 14 km with the help of wind has been reported (Polar *et al.*, 2010). Indeed, the exclusion of common mtDNA haplotypes and high genetic differentiation between Venezuelan and French Guiana sampling sites is indicative of very limited connectivity between these distant locations. Whether *H. metabus* exhibits an isolation-by-distance pattern or strong barriers to gene flow along the northern coast of South America would require sampling of intermediate locations along the coast. Given the geographical distances among Venezuelan sampling sites, the population genetic structure found here is in accordance with that expected in evolutionary time with the reported adult dispersal

ranges (Polar *et al.*, 2010). The level of genetic structure between the two French Guiana clusters of *H. metabus* found here indicates strong restrictions to gene flow between the coast and inland sites (otherwise the genetic structure would be quickly erased) and hence, that population outbreaks of moths causing lepidopterism events are unlikely to spread between coastal and inland sites. The biological interpretation of *H. metabus* segregation among French Guiana sampling sites, where the two identified clusters split coastal entropized zones from the rest of sampling sites, is more complex and cannot be explained on adult dispersal ranges alone. Genetic homogeneity appears to be typical of species of forest Lepidoptera experiencing cyclic population outbreaks, nevertheless, most studies are based on species displaying synchronous temporal patterns of population dynamics associated with high dispersal ability (Franklin *et al.*, 2014). Contrarily, the recorded patterns of *H. metabus* outbreaks show that these events are generally restricted to a few km<sup>2</sup> and, therefore, do not necessarily impact different countries, or even localities within countries, during the same year or the same month. The mtDNA and microsatellite data suggest that all moths captured during outbreak events belong to the coastal cluster, which also contains moths captured during periods where no population increase of outbreaks of lepidopterism were reported. Given the patterns of genetic structure found, the source of the *H. metabus* population increases seem to come from local populations which experience a demographic increase, known as a pulse gradient outbreak (Berryman, 1987), as opposed to wide-ranging individuals from other localities such as is the case in other insects experiencing population increases (Chapuis *et al.*, 2009). Such genetic similarity among coastal locations indicates some connectivity along the French Guiana coast, but the very localised independent population dynamics suggest a metapopulation scenario (Hanski, 1997), perhaps driven by habitat heterogeneity. Several studies of native insect pests show that outbreak events seem to be more regulated by local micro-environmental conditions than by the neutral genetic characteristics of the local population (Mun, Bohonak and Roderick, 2003; Chapuis *et al.*, 2008, 2009; Kobayashi *et al.*, 2011). One critical environmental variable for phytophagous insects is host plant availability. Insect outbreaks are more frequent when host plants are aggregated or dense, while herbivory of host plants is significantly reduced in more diverse forests, as suitable hosts are geographically dispersed (Carson, Cronin and Long, 2004; Jactel and Brockerhoff, 2007). Hence, forest heterogeneity and stability environmental factors in the Neotropics might maintain low density *H. metabus* populations (Eveleigh *et al.*, 2007). Conversely, entropized coastal ecosystems, characterized by more homogenous vegetation and larger climatic variations, may enable outbreaks of the *H. metabus* coastal genetic cluster. Although, *H. metabus* is reported to be a polyphagous species (Lemaire, 2002), host plant specialization has been shown to affect the adaptive population genetic structure of phytophagous insects (Boecklen and Mopper, 1998). The high level of genetic differentiation between geographically proximal coastal and inland *H. metabus* populations could possibly be driven by ecological isolation based on host plant heterogeneity (Gond *et al.*, 2009), and an increased retention of habitat-specific adaptations (Lenormand, 2002; Janzen *et al.*, 2009) in different *H. metabus* populations in French Guiana. Our sampling scheme does not allow us to reach firm conclusions on such host specificity between coastal and inland sites, as most individuals were captured at imago stage which have already dispersed from larvae development host plants. Such host plant-population association deserves further exploration, as identifying host-specific populations of *H. metabus* that experience outbreaks would be of strategic importance in management plans.

## **Conclusion:**

Our analyses reveal that *H. metabus* is divided into several populations, which is highly relevant for defining management units. We conclude that movement of *H. metabus* moths from populations experiencing a sudden demographic increase is not sufficient to genetically homogenise populations at regional and local scales and to synchronize their dynamics. The genetic clusters of *H. metabus* identified in French Guiana are in good agreement with the observation of sites previously experiencing sudden moth population increases and outbreaks of lepidopterism and sites that did not. Such accordance prompts the definition of distinct management units that could differ in their response to pest control strategies, such as population-specific rates of biocide resistance, or population-specific variances of pheromones composition which would impact their susceptibility to pheromone-based traps. In the future, the markers developed here will be invaluable in understanding the demographic dynamics and connectivity patterns of *H. metabus*, which is essential for the design of integrated control programmes.

### Acknowledgments

The authors thank Lary Ciminera for his contribution in field work, and Jean-Philippe Champenois for collecting *Hylesia* from Cayenne. This research project has been financially supported by the European Union, the Center for the study of biodiversity in Amazonia (Labex CEBA, ANR-10-LABX-0025) and by the Collectivité Territoriale de Guyane. The UMR EcoFoG is supported by the Investissement d'Avenir of the ANR (CEBA: ANR-10-LABX-25-01). We thank Timothy Chubb for English proofing previous versions of this manuscript.

### Literature cited:

- ANDREWS, S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
- ASHFAQ, M., HEBERT, P. D. N. & NAAUM, A. 2016. DNA barcodes for bio-surveillance: Regulated and economically important arthropod plant pests1. *Genome* 59:933–945. NRC Research Press.
- BATTISTI, A., HOLM, G., FAGRELL, B. & LARSSON, S. 2011. Urticating hairs in arthropods: their nature and medical significance. *Annual Review of Entomology* 56:203–220. Annual Reviews.
- BATTISTI, A., LARSSON, S. & ROQUES, A. 2017. Processionary Moths and Associated Urtication Risk: Global Change?Driven Effects. *Annual Review of Entomology* 62:323–342. Annual Reviews .
- BERRYMAN, A. A. 1987. The theory and classification of outbreaks. P. pp.3-30 ref.69 *Insect outbreaks*.
- BOECKLEN, W. J. & MOPPER, S. 1998. Local Adaptation in Specialist Herbivores: Theory and Evidence. Pp. 64–88 *Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations*. Springer US, Boston, MA.
- BOUVIER, E. 1928. No Title. Pp. 449–715 *Faune des colonies françaises (Volume 2)*. Société d'éditions géographiques, maritimes et coloniales, Paris.
- BURNS, J., JANZEN, D. & HAJIBABAEI, M. 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the*.
- CARRERA, M. 1991. *Insetos de interesse médico e veterinário*. Universidade Federal do Paraná. 228 pp.

- CARSON, W., CRONIN, J. & LONG, Z. 2004. 10 A General Rule for Predicting When Insects Will Have Strong Top-Down Effects on Plant Communities: On the Relationship Between Insect Outbreaks and Host. *Ecological Studies*, Vol. 173.
- CAVALLI-SFORZA, L. L. & EDWARDS, A. W. F. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *The American Journal of Human Genetics* 19:233–257.
- CHAPUIS, M.-P. & ESTOUP, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution* 24:621–31.
- CHAPUIS, M.-P., LOISEAU, A., MICHALAKIS, Y., LECOQ, M., FRANC, A. & ESTOUP, A. 2009. Outbreaks, gene flow and effective population size in the migratory locust, *Locusta migratoria*: a regional-scale comparative survey. *Molecular ecology* 18:792–800.
- CHAPUIS, M. P., LECOQ, M., MICHALAKIS, Y., LOISEAU, A., SWORD, G. A., PIRY, S. & ESTOUP, A. 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology* 17:3640–3653.
- CRUZ, F., PEREZ, M. & PRESA, P. 2005. Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* 346:241–247.
- DAKIN, E. & AVISE, J. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509.
- DEBINSKI, D. M. 1994. Genetic diversity assessment in a metapopulation of the butterfly *Euphydryas gillettii*. *Biological Conservation* 70:25–31.
- DEWOODY, J., NASON, J. D. & HIPKINS, V. D. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations.
- DINCĂ, V., MONTAGUD, S., TALAVERA, G., HERNÁNDEZ-ROLDÁN, J., MUNGUIRA, M. L., GARCÍA-BARROS, E., HEBERT, P. D. N. & VILA, R. 2015. DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. *Scientific Reports* 5:12395.
- DYER, L., CARSON, W. & LEIGH, E. 2012. Insect outbreaks in tropical forests: patterns, mechanisms, and consequences. *Insect Outbreaks Revisited*.
- ECKERT, C. G., SAMIS, K. E. & LOUGHEED, S. C. 2008, March. Genetic variation across species' geographical ranges: The central-marginal hypothesis and beyond. Blackwell Publishing Ltd.
- EVELEIGH, E. S., MCCANN, K. S., MCCARTHY, P. C., POLLOCK, S. J., LUCAROTTI, C. J., MORIN, B., MCDOUGALL, G. A, STRONGMAN, D. B., HUBER, J. T., UMBANHOWAR, J. & FARIA, L. D. B. 2007. Fluctuations in density of an outbreak species drive diversity cascades in food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:16976–81.
- EXCOFFIER, L. AND LISCHER, H. E. L. 2010. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10:564–7.
- FAGERBERG, A. J., FULTON, R. E. & BLACK, W. C. 2001. Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: Analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 10:225–236.

- FORNÉS, L. & HERNÁNDEZ, J. 2000. Some aspects of the biology of *Hylesia metabus* (Cramer 1775)(Lepidoptera: Saturniidae). *Boletín de Entomología Venezolana*.
- FRANCK, P., GUÉRIN, F., LOISEAU, A. & SAUPHANOR, B. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Molecular Ecology Notes* 5:99–102. Blackwell Science Ltd.
- FRANKLIN, M. T., MYERS, J. H. & CORY, J. S. 2014. Genetic similarity of island populations of tent caterpillars during successive outbreaks. *PLoS ONE* 9.
- GOMES, I., COLLINS, A., LONJOU, C., THOMAS, N. S., WILKINSON, J., WATSON, M. & MORTON, N. 1999. Hardy-Weinberg quality control. *Annals of human genetics* 63:535–8.
- GOND, V., BERNARD, J., BROGNOLI, C. & BRUNAU, O. 2009. Analyse multiscalaire de la caractérisation des écosystèmes forestiers guyanais et des impacts anthropiques à partir de la télédétection spatiale. *forestiers des Caraïbes*.
- GUILLOT, G., MORTIER, F. & ESTOUP, A. 2005. GENELAND: A computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5:712–715.
- GUILLOT, G., SANTOS, F. & ESTOUP, A. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics (Oxford, England)* 24:1406–7.
- HAJIBABAEI, M., JANZEN, D. H., BURNS, J. M., HALLWACHS, W. & HEBERT, P. D. N. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:968–971.
- HANSKI, I. 1997. 4 - Metapopulation Dynamics from Concepts and Observations to Predictive Models. *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution*:69–91.
- HEBERT, P. D. N., DEWAARD, J. R. & LANDRY, J.-F. 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology letters* 6:359–62.
- HERZIG, A. L. 1995. Effects of population density on long-distance dispersal in the goldenrod beetle *Trirhabda virgata*. *Ecology* 76:2044–2054.
- HUANG, X. & MADAN, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9:868–877.
- HÜBNER, J. 1820. Verzeichniss bekannter Schmettlinge [sic]. (Signatures). Augsburg. pp. 177-208. pp.
- HUEMER, P., KARSHOLT, O. & MUTANEN, M. 2014. DNA barcoding as a screening tool for cryptic diversity: an example from Caryocolum, with description of a new species (Lepidoptera, Gelechiidae). *ZooKeys*.
- IRWIN, M. E. 1999. Implications of movement in developing and deploying integrated pest management strategies. *Agricultural and Forest Meteorology* 97:235–248.
- JACTEL, H. & BROCKERHOFF, E. 2007. Tree diversity reduces herbivory by forest insects. *Ecology letters*.
- JANZEN, D. H. D., HALLWACHS, W., HARVEY, D. D. J., DARROW, K., ROUGERIE, R., HAJIBABAEI, M., SMITH, M. A., BERTRAND, C., GAMBOA, I. C., ESPINOZA, B., SULLIVAN, J. B., DECAENS, T., HERBIN, D., CHAVARRIA, L. F., FRANCO, R., CAMBRONERO, H., RIOS, S., QUESADA, F., PEREIRA, G., VARGAS, J., GUADAMUZ, A., ESPINOZA, R., HERNANDEZ, J., RIOS, L., CANTILLANO, E., MORAGA, R., MORAGA, C., RIOS, P., RIOS, M., CALERO, R., MARTINEZ, D., BRICEÑO, D., CARMONA, M., APU, E., ARAGON, K., UMAÑA, C., PEREZ, J., CORDOBA, A., UMAÑA, P., SIHEZAR, G., ESPINOZA, O., CANO, C., ARAYA, E., GARCIA, D., RAMIREZ, H., PEREIRA, M. M., CORTEZ, J., PEREIRA, M. M., MEDINA, W. &

- HEBERT, P. D. N. 2012. What happens to the traditional taxonomy when a well-known tropical saturniid moth fauna is DNA barcoded? *Invertebrate Systematics* 26:478–505.
- JANZEN, D. H., HALLWACHS, W., BLANDIN, P., BURNS, J. M., CADIOU, J. M., CHACON, I., DAPKEY, T., DEANS, A. R., EPSTEIN, M. E., ESPINOZA, B., FRANCLEMONT, J. G., HABER, W. A., HAJIBABAEI, M., HALL, J. P. W., HEBERT, P. D. N., GAULD, I. D., HARVEY, D. J., HAUSMANN, A., KITCHING, I. J., LAFONTAINE, D., LANDRY, J. F., LEMAIRE, C., MILLER, J. Y., MILLER, J. S., MILLER, L., MILLER, S. E., MONTERO, J., MUNROE, E., GREEN, S. R., RATNASINGHAM, S., RAWLINS, J. E., ROBBINS, R. K., RODRIGUEZ, J. J., ROUGERIE, R., SHARKEY, M. J., SMITH, M. A., SOLIS, M. A., SULLIVAN, J. B., THIAUCOURT, P., WAHL, D. B., WELLER, S. J., WHITFIELD, J. B., WILLMOTT, K. R., WOOD, D. M., WOODLEY, N. E. & WILSON, J. J. 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9:1–26.
- JOMBART, T. 2008. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24:1403–1405.
- JOMBART, T., DEVILLARD, S. & BALLOUX, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* 11:94. BioMed Central.
- JOSHI, N. A. & FASS, J. N. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files.
- JOURDAIN, F., GIROD, R., VASSAL, J. M., CHANDRE, F., LAGNEAU, C., FOUQUE, F., GUIRAL, D., RAUDE, J. & ROBERT, V. 2012. The moth *Hylesia metabus* and French Guiana lepidopterism: centenary of a public health concern. *Parasite (Paris, France)* 19:117–28.
- KAMVAR, Z. N., TABIMA, J. F. & GRÜNWARD, N. J. 2013. The poppr R package for genetic analysis of populations with mixed (clonal/sexual) reproduction. *Phytopathology* 103:70.
- KEENAN, K., MCGINNITY, P., CROSS, T. F., CROZIER, W. W. & PRODÖHL, P. A. 2013. DiveRsite: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution* 4:782–788.
- KEKKONEN, M., MUTANEN, M., KAILA, L., NIEMINEN, M. & HEBERT, P. D. N. 2015. Delineating species with DNA barcodes: a case of taxon dependent method performance in moths. *PloS one* 10:e0122481. Public Library of Science.
- KOBAYASHI, T., SAKURAI, T., SAKAKIBARA, M. & WATANABE, T. 2011. Multiple origins of outbreak populations of a native insect pest in an agro-ecosystem. *Bulletin of entomological research* 101:313–24. Cambridge University Press.
- LAMY, M., MICHEL, M., PRADINAUD, R., DUCOMBS, G. & MALEVILLE, J. 1982. L'appareil urticant des papillons *Hylesia urticans* Floch et Abonnenc et *H. umbrata* Schaus (Lepidopteres : Saturniidae) responsables de la papillonite en Guyane Française.
- LEIGH, J. W. & BRYANT, D. 2015. Popart: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6:1110–1116.
- LEMAIRE, C. 2002. Saturniidae of America: Hemileucinae. Goecke & Evers. 1388 pp.

- LENORMAND, T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 17:183–189.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.
- LONGCORE, T. & RICH, C. 2004. Ecological light pollution. Pp. 191–198 *Frontiers in Ecology and the Environment*. Ecological Society of America.
- MARTIN, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17:10.
- MCKENDRICK, L., PROVAN, J., FITZPATRICK, Ú., BROWN, M. J. F., MURRAY, T. E., STOLLE, E. & PAXTON, R. J. 2017. Microsatellite analysis supports the existence of three cryptic species within the bumble bee *Bombus lucorum sensu lato*. *Conservation Genetics* 18:573–584. Springer Netherlands.
- MEGLÉCZ, E., COSTEDOAT, C., DUBUT, V., GILLES, A., MALAUSA, T., PECH, N. & MARTIN, J.-F. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics (Oxford, England)* 26:403–4.
- MEGLECZ, E., PETENIAN, F., DANCHIN, E., D'ACIER, A. C., RASPLUS, J. Y. & FAURE, E. 2004. High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology* 13:1693–1700.
- MEIRMANS, P. G. & HEDRICK, P. W. 2011. Assessing population structure: FST and related measures.
- MOPPER, S. 1996. Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends in Ecology & Evolution* 11:235–238.
- MUN, J., BOHONAK, A. J. & RODERICK, G. K. 2003. Population structure of the pumpkin fruit fly *Bactrocera depressa* (Tephritidae) in Korea and Japan: Pliocene allopatry or recent invasion? *Molecular Ecology* 12:2941–2951.
- NOWAK, C., BROWN, C. M. & HELLMANN, J. J. 2009. Microsatellite markers for the hybridizing tiger swallowtails, *Papilio glaucus* and *P. canadensis*, and their applicability to historic specimens and congeneric species. *Molecular ecology resources* 9:800–3.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P., & S. 2004. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.
- PANIZ-MONDOLFI, A. E., PÉREZ-ALVAREZ, A. M., LUNDBERG, U., FORNÉS, L., REYES-JAIMES, O., HERNÁNDEZ-PÉREZ, M. & HOSSLER, E. 2011. Cutaneous lepidopterism: Dermatitis from contact with moths of *Hylesia metabus* (Cramer 1775) (Lepidoptera: Saturniidae), the causative agent of caripito itch. *International Journal of Dermatology* 50:535–541.
- PEAKALL, R. O. D. & SMOUSE, P. E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288–295.
- PFENNINGER, M. & SCHWENK, K. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC evolutionary biology* 7:121.
- POLAR, P., COCK, M. J., FREDERICKSON, C., M, H. & KRAUSS, U. 2010. Invasions of *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae, Hemileucinae) into Trinidad, West Indies. *Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club*.

- PRIMMER, C. R., RAUDSEPP, T., CHOWDHARY, B. P., MØLLER, A. P. & ELLEGREN, H. 1997. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7:471–482.
- R CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- ROSEN, D. 1986. The role of taxonomy in effective biological control programs. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 15:121–129.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 132:365–386.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo* 4:406–425.
- SANTOS, G. P., ZANUNCIO, T. V., DIAS, O. S. & ZANUNCIO, J. C. 1996. Biology of *Hylesia nanus* (Walker)(Lepidoptera: Attacidae). *ANAIS-SOCIEDADE ENTOMOLOGICA DO BRASIL* 25:479–482.
- SCHMITT, T. & SEITZ, A. 2004. Low diversity but high differentiation: the population genetics of *Aglaope infausta* (Zygaenidae: Lepidoptera). *Journal of Biogeography* 31:137–144. Blackwell Science Ltd.
- SINAMA, M., DUBUT, V., COSTEDOAT, C., GILLES, A. A., JUNKER, M., MALAUSA, T., MARTIN, J.-F. F., NÈVE, G., PECH, N., SCHMITT, T., ZIMMERMANN, M., MEGLÉCZ, E., NEVE, G., PECH, N., SCHIMTT, T., ZIMMERMANN, M. & MEGLÉCZ, E. 2011. Challenges of microsatellite development in Lepidoptera: *Euphydryas aurinia* (Nymphalidae) as a case study. *European Journal of Entomology* 108:261–266. EJE.
- SPECHT, A., FORMENTINI, A. C. & CORSEUIL, E. 2006. Biologia de *Hylesia nigricans* (Berg) (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). *Revista Brasileira de Zoologia* 23:248–255. Sociedade Brasileira de Zoologia.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30:2725–9. Oxford University Press.
- TECHEN, N., ARIAS, R. S., GLYNN, N. C., PAN, Z., KHAN, I. A. & SCHEFFLER, B. E. 2010. Optimized construction of microsatellite-enriched libraries. *Molecular Ecology Resources* 10:508–515.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2002. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. Pp. 1–22 *Current Protocols in Bioinformatics*.
- VAN TOOR, R. F., FOSTER, S. P., ANSTEAD, J. A., MITCHINSON, S., FENTON, B. & KASPROWICZ, L. 2008. Insecticide resistance and genetic composition of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on field potatoes in New Zealand. *Crop Protection* 27:236–247.
- TORRES-LEGUIZAMON, M., SOLIGNAC, M., VAUTRIN, D., CAPDEVIELLE-DULAC, C., DUPAS, S. & SILVAIN, J. F. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the Potato Tuber Moth *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Molecular Ecology Resources* 9:1167–1169. Blackwell Publishing Ltd.

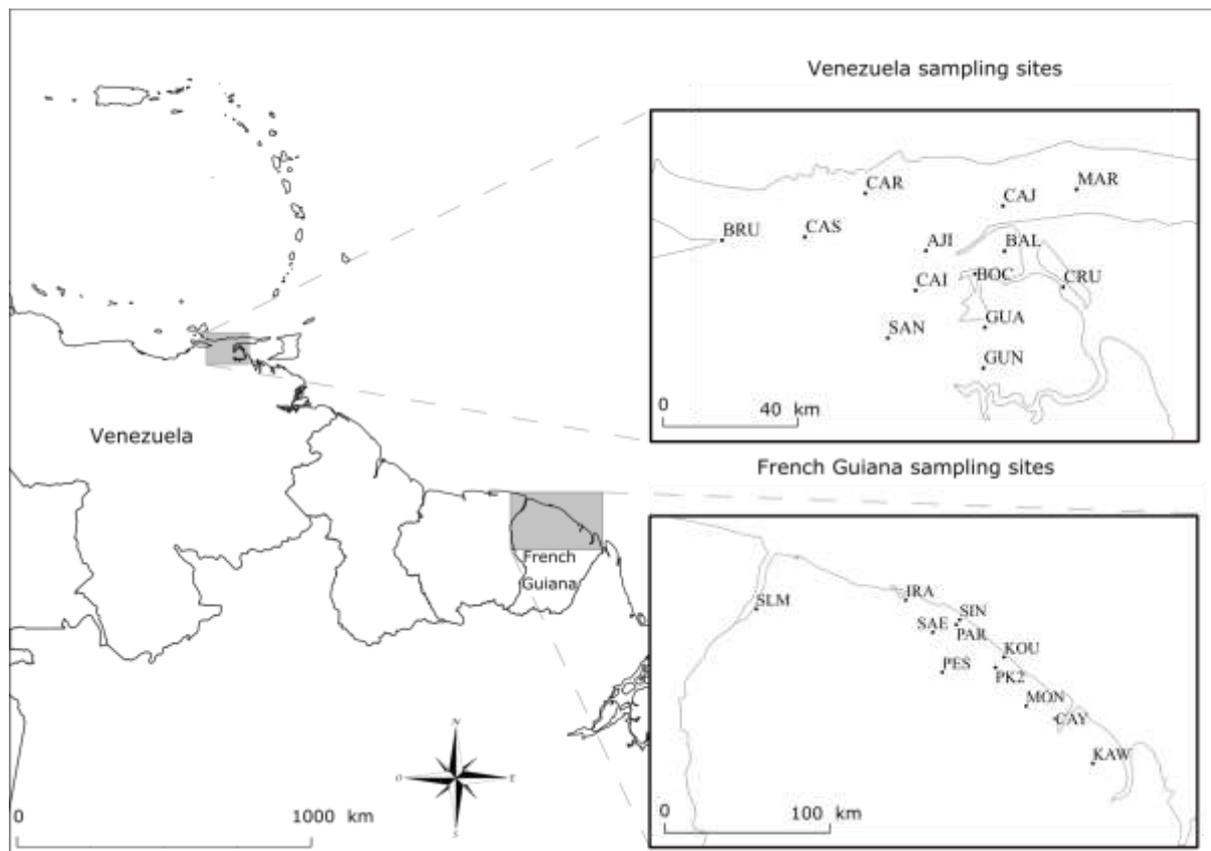
- VASSAL, J.-M. 1989. Biologie, écologie et pathologie d'*Hylesia metabus* (Cramer 1775) (Lépidoptères : Saturniidae), agent de la 'papillonite' en Guyane Française: Mise en place d'une structure de lutte intégrée. Doctorat en Biologie des Organismes et des Populations Biologie d:249 + planches.
- WAGNER, A P., CREEL, S. & KALINOWSKI, S. T. 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity* 97:336–345.
- WEIR, B. & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure Author ( s ): B . S . Weir and C . Clark Cockerham. *Evolution* 38:1358–1370.
- WEIR, B. S. 1996. Intraspecific differentiation. *Molecular Systematics* 2nd editio:385–405.
- WILSON, J. J., SING, K. W. & SOFIAN-AZIRUN, M. 2013. Building a DNA barcode reference library for the true butterflies (Lepidoptera) of Peninsula Malaysia: What about the subspecies? *PLoS ONE* 8.
- ZANUNCIO, J., DO NASCIMENTO, E. C., GARCIA, J. F. & ZANUNCIO, T. V. 1994. Major lepidopterous defoliators of eucalypt in southeast Brazil. *Forest Ecology and Management* 65:53–63.

**Table 1.** Locality represents the site code where sample was collected, n is the number of individuals; P, percentage of polymorphic loci; Na, mean number of alleles observed by locus; Ho and He are observed and expected heterozygosity, respectively; F is within-site inbreeding coefficients, P-val, indicates P-values from a global test of heterozygote deficiency, under the null hypothesis that the populations are at Hardy-Weinberg Equilibrium significant values ( $P < 0.001$ ) are in bold. S, number of segregating sites; Ht, the number of haplotypes; Hd, haplotype diversity;  $\pi$ , nucleotide diversity; K, average number of nucleotide difference; HAP Haplotype name (haplotype frequency).

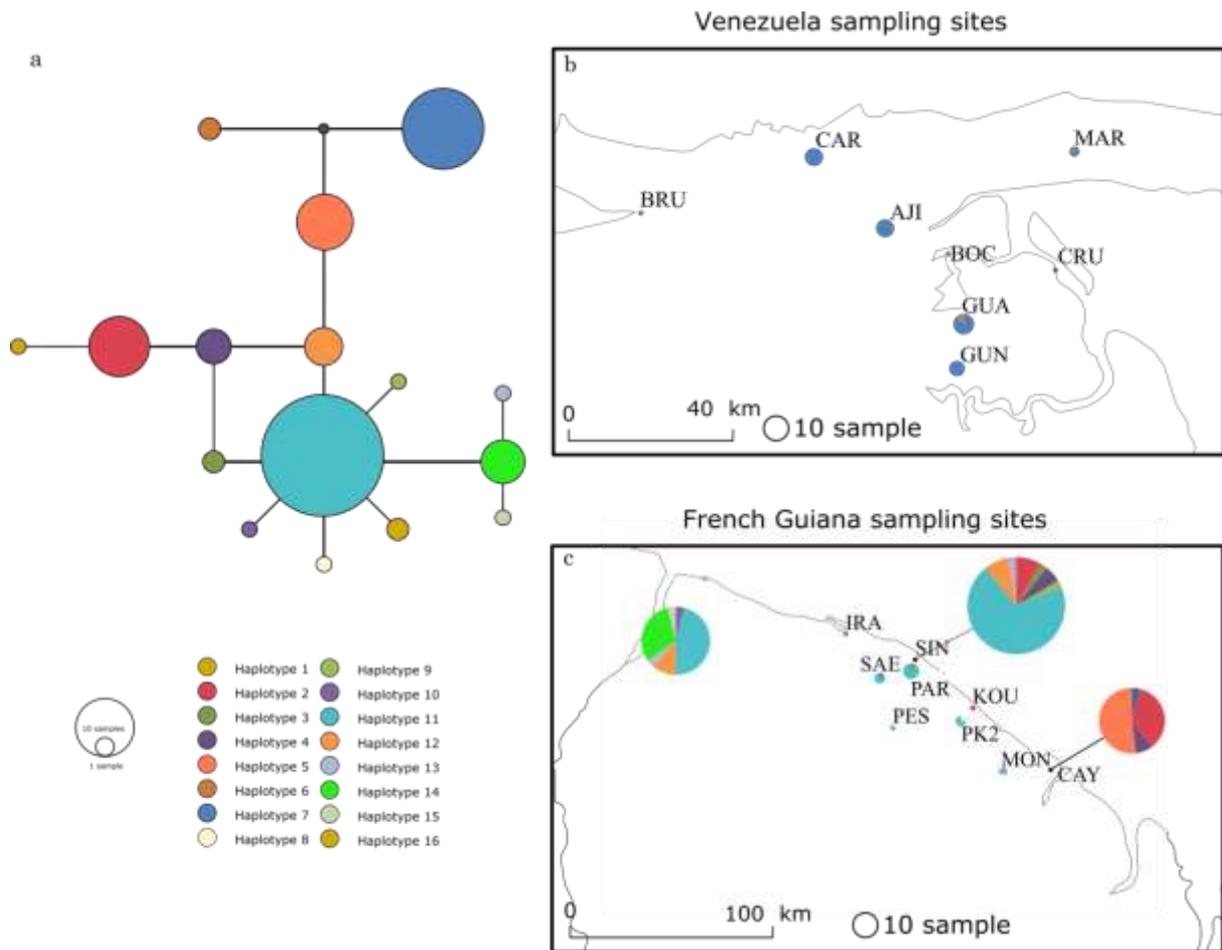
Region	Locality	Microsatellite markers							Mitochondrial markers					Hap	
		n	Na	P	Ho	He	F is	P-val	n	S	Ht	Hd	$\pi$		K
VEN		117							29	2	2	0.13	0.0006	0.266	Hap6 (2) & Hap7 (27)
	AJI	13	2	87	0.233	0.285	0.146	0.092	7						Hap7(7)
	BAL	10	2	71	0.221	0.265	0.195	0.144							
	BOC	12	2	71	0.226	0.242	-0.056	0.660	1						Hap7(1)
	BRU	11	3	86	0.361	0.351	-0.035	0.657	1						Hap7(1)
	CAI	5	2	71	0.486	0.335	-0.302	0.915							
	CAJ	15	3	56	0.300	0.318	-0.015	0.750							
	CAR	4	2	57	0.274	0.242	0.046	0.451							
	CAS	1	1	42	0.429	0.214	-	-							
	CRU	7	2	71	0.163	0.206	0.213	0.261	2						Hap7(2)
	GUA	13	2	57	0.183	0.181	0.029	0.242	8						Hap6 (1) & Hap7(7)
	GUN	11	2	57	0.357	0.306	-0.147	0.791	6						Hap7(6)
MAR	9	2	57	0.212	0.334	0.387	<b>0.005</b>	4						Hap6 (1) & Hap7(3)	
SAN	6	2	85	0.238	0.264	0.245	0.128								
FG		282							115	12	14	0.70	0.0036	1.50	
	CAY	103	3	100	0.202	0.279	0.270	<b>0.000</b>	25	4	4	0.62	0.0039	1.62	Hap1 (1), Hap2 (9), Hap4 (2), Hap5 (13)
	IRA	8	2	71	0.174	0.243	0.322	0.046	2	3	2	1.00	0.0073	3.00	Hap2 (1) & Hap11 (1)
	KAW	19	3	71	0.359	0.337	-0.039	0.222							
	KOU	9	2	100	0.261	0.303	0.149	0.184	2	0	1	0.00	0.0000	0.00	Hap2 (2)
	MON	10	3	100	0.300	0.444	0.366	<b>0.000</b>	3	1	2	0.67	0.0016	0.67	Hap11 (2) & Hap16 (1)
	PAR	16	3	100	0.273	0.412	0.357	<b>0.000</b>	6	1	2	0.33	0.0008	0.33	Hap3 (1) & Hap11 (5)
	PES	6	3	86	0.250	0.369	0.390	<b>0.000</b>	2	0	1	0.00	0.0000	0.00	Hap 11 (2)
	PK2	8	3	100	0.400	0.537	0.305	<b>0.000</b>	4	1	2	0.50	0.0012	0.50	Hap8 (1) & Hap11 (3)
	SAE	8	2	100	0.338	0.363	0.152	0.050	8	2	2	0.25	0.0012	0.50	Hap4 (1) & Hap11 (7)
	SIN	37	3	100	0.219	0.294	0.257	<b>0.000</b>	37	5	7	0.50	0.0022	0.89	Hap2(3), Hap3(1), Hap4(2), Hap9(1), Hap11 (6), Hap12 (3), Hap16 (1)
SLM	58	4	100	0.338	0.466	0.259	<b>0.000</b>	26	5	6	0.70	0.0023	0.94	Hap10 (1), Hap11 (12), Hap12(3), Hap13 (1), Hap14 (8) , Hap15 (1)	
<b>Total</b>		<b>399</b>							<b>144</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>0.77</b>	<b>0.0052</b>	<b>2.26</b>	

**Table 2.** Results of analysis of molecular variance (AMOVA) of *H. metabus*.

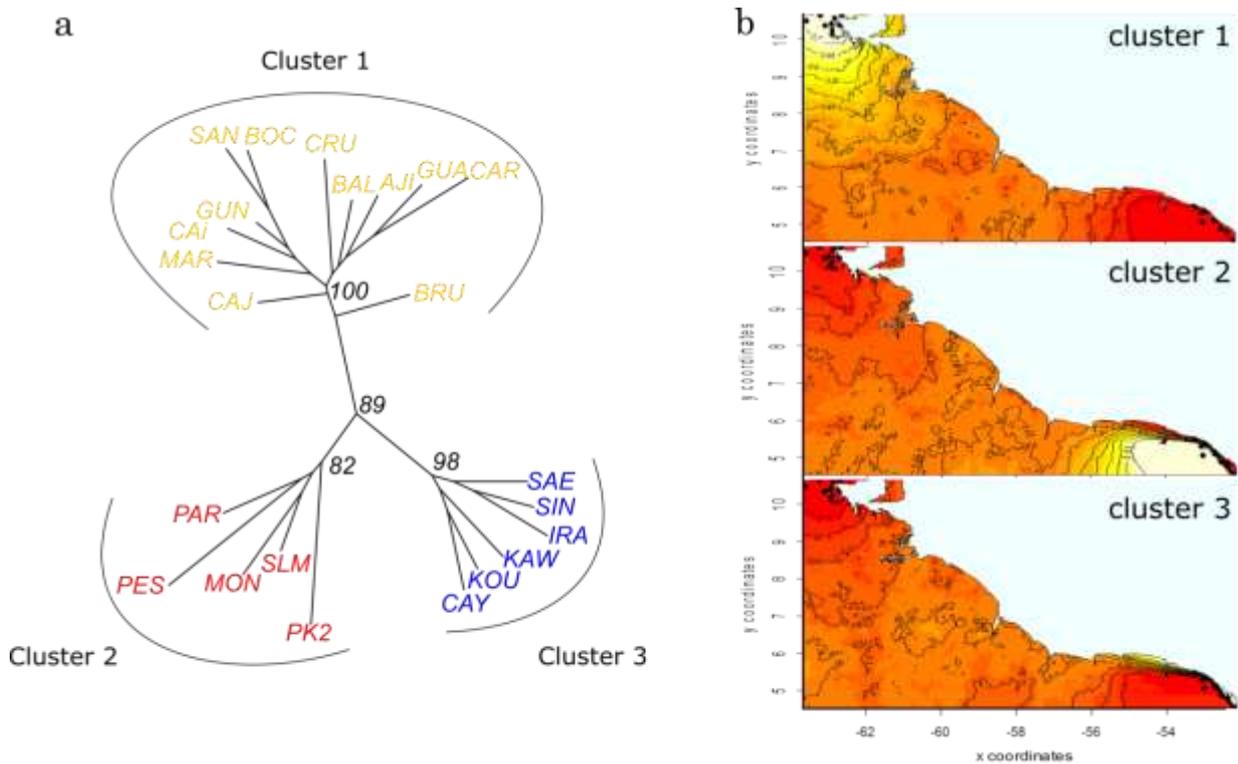
Source of variation	Microsatellite			mtDNA		
	Sum of squares	Fixation index	Percentage of variation	Sum of squares	Fixation index	Percentage of variation
Among group	73.641	<b>FCT=0.35</b>	35.41%	83.447	<b>FCT=0.52</b>	51.6%
Among populations within groups	23.738	<b>FSC=0.09</b>	6.20%	23.738	<b>FSC=0.41</b>	19.8%
Within populations	56.35	<b>FST=0.35</b>	58.34%	56.35	<b>FST=0.71</b>	28.4%



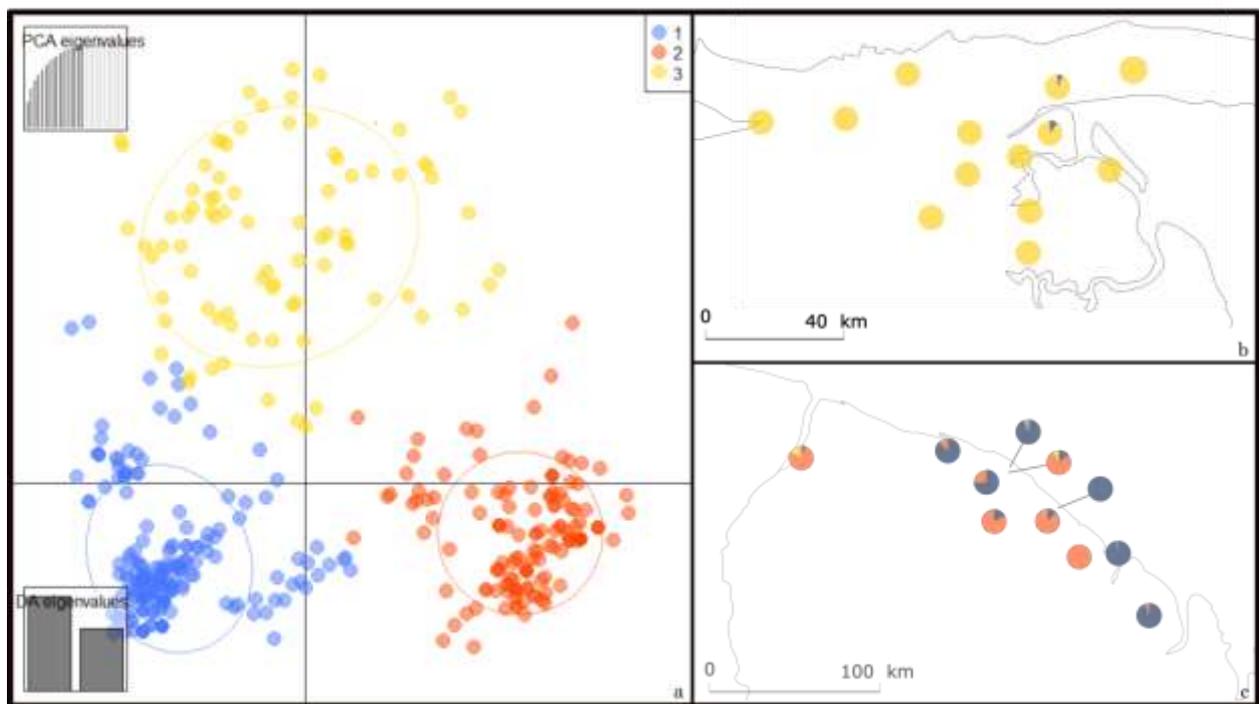
**Figure 1:** Map of study area, sampling site codes in Venezuela and French Guiana.



**Figure 2:** (A.) Haplotype network of *Hylesia metabus* based on Mitochondrial Cox1 marker. Colour represents the different haplotypes; Circle size dependends on the number of individual sequences; Distribution maps of mitochondrial haplotype frequencies in Venezuela (B.) and French Guiana (C.). Sampling site 3 letter codes correspond to those in Table 1.



**Figure 3:** (A.) Neighbour-joining tree based on Cavalli-Sforza & Edwards 1967 genetic distance of *H. metabus* sampling sites using seven microsatellites. Samples are coloured according to the clusters inferred by *Geneland*. Nodes with over 70% Bootstrap support are indicated with the support value. (B.) Geographical maps of northern South America showing the posterior probabilities of spatial population membership for each of the clusters inferred by *Geneland* based on seven microsatellite loci. Lighter shading indicates a higher probability of belonging to a genetic cluster, while red indicates a low probability of belonging to the genetic cluster. The sea is represented in light blue.



**Figure 4:** (A.) Scatterplot output from a discriminant analysis of principal components (DAPC) of the genetic structure of *H. metabus* individuals based on seven microsatellites. The first two principal components of the DAPC are displayed, the clusters delineated by the K-means method are represented by the three colours: yellow=Venezuela, blue=coastal French Guiana, red=inland French Guiana. Distribution map of the proportion of individual assignments to each of the 3 cluster in Venezuela (B.) and French Guiana (A.).

### Supplementary Files

Supplementary Files:

**Table S1 Characteristics of seven polymorphic microsatellite loci in *H. metabus***

Locus Code	Locus name	PRIMER SEQUENCES (5'-3')	PCR Product	Repeat motif	Colour
SSR1	HY23847	F : CATTGGAGGACCCACAC(VIC) R : ACAGGGAGCATGCAACAAG	(99-102)	(AC)8	VIC
SSR2	HY19456	F : TGATAAATGAGCGTAATTCGG(VIC) R : AGTCCTACGTCCAGCAGTGG	(143-152)	(ATC)8	VIC
SSR3	HY3208	F : CCTGATTGTGTTGTCATCCGNED) R : TTTGCGGGAATTATTTGGTG	(112-120)	(AC)8	NED
SSR4	HY14015	F : AAACATGGTAGGGTGAAGCG(NED) R : TGGAAGATTGATTGCAGGG	(237-253)	(AC)9	NED
SSR5	HY37389	F : CGATGAGAATTCGCGCTTAG(FAM) R : TTTCCACTAATCAAATGCTGC	(192-196)	(AC)8	6-FAM
SSR6	HY31505	F : GAAATAAAGACGCCGGTTT(VIC) R : TTACAATTGAACGTGCGCTG	(114-118)	(AC)9	VIC
SSR7	HY27067	F : CGTTTGCATAACACGGTGAC(Vic) R : TACGGGACGAGTAGAGGTGC	(208-222)	(AG)9	VIC

Table S2. Characteristics of microsatellite loci. *Locus*: name of microsatellite locus, *Pop*: sampling site abbreviations correspond to Fig. 1  $H_O$ : observed heterozygosity;  $H_E$ : expected heterozygosity;  $P_{HWE}$ : probability that population is in HWE in bold, *mono.* = monomorphic, \*= null allele.

Pop	Locus SSR 1			Locus SSR 2			Locus SSR 3			Locus SSR 4			Locus SSR 5			Locus SSR 6			Locus SSR 7		
	HO	HE	PHWE	HO	HE	PHWE	HO	HE	PHWE	HO	HE	PHWE	HO	HE	PHWE	HO	HE	PHWE	HO	HE	PHWE
Aji	0.393	0.409	0.184	0.074	0.077	0.885	0.278	0.303	0.014	0.351	0.368	0.014	0.000	0.000	mono	0.260	0.271	0.512	0.636	0.662	0.382
Bal	0.420	0.442	0.880	0.180	0.189	0.725	0.406	0.464	0.046	0.255	0.268	0.055	0.000	0.000	mono	0.000	0.000	mono	0.595	0.626	0.237
Boc	0.486	0.507	0.013	0.000	0.000	mono	0.480	0.533	0.025	0.288	0.301	0.923	0.000	0.000	mono	0.080	0.083	0.880	0.358	0.373	0.539
Bru	0.483	0.506	0.022	0.244	0.255	0.965	0.673	0.725	0.019*	0.290	0.307	0.948	0.000	0.000	mono	0.236	0.247	0.601	0.533	0.558	0.046
Cai	0.500	0.556	0.025	0.000	0.000	mono	0.625	0.833	0.572	0.420	0.467	0.241	0.000	0.000	mono	0.180	0.200	0.804	0.620	0.689	0.172
Caj	0.320	0.331	0.333	0.258	0.267	0.999	0.594	0.679	0.217	0.210	0.218	0.974	0.000	0.000	mono	0.331	0.343	0.816	0.516	0.533	0.731
Car	0.375	0.429	0.505	0.219	0.250	0.775	0.000	0.000	mono	0.444	0.533	0.386	0.000	0.000	mono	0.000	0.000	mono	0.656	0.750	0.238
Cas	0.000	0.000	mono	0.500	1.000	0.317	0.000	0.000	mono	0.500	1.000	0.317	0.000	0.000	mono	0.000	0.000	mono	0.500	1.000	0.317
Cru	0.133	0.143	0.839	0.000	0.000	mono	0.480	0.533	0.025	0.245	0.264	0.659	0.000	0.000	mono	0.245	0.264	0.659	0.337	0.363	0.471
Gua	0.393	0.409	0.935	0.074	0.077	0.885	0.000	0.000	mono	0.142	0.148	0.764	0.000	0.000	mono	0.000	0.000	mono	0.656	0.685	0.504
GuN	0.496	0.519	0.740	0.000	0.000	mono	0.625	0.667	0.572	0.397	0.416	0.214	0.000	0.000	mono	0.000	0.000	mono	0.624	0.654	0.266
Mar	0.105	0.111	0.860	0.117	0.125	0.850	0.656	0.750	0.217	0.401	0.425	0.030	0.000	0.000	mono	0.438	0.464	0.314	0.623	0.660	0.274
San	0.500	0.545	0.414	0.000	0.000	mono	0.375	0.500	0.637	0.320	0.356	0.025	0.000	0.000	mono	0.000	0.000	mono	0.653	0.712	0.540
Cay	0.048	0.049	0.799	0.022	0.022	1.000	0.576	0.579	<b>0.000*</b>	0.100	0.100	1.000	0.368	0.370	0.017	0.122	0.123	0.849	0.716	0.720	<b>0.000*</b>
Ira	0.117	0.125	0.850	0.000	0.000	mono	0.663	0.714	0.295	0.117	0.125	0.850	0.320	0.342	0.935	0.000	0.000	mono	0.486	0.530	0.107
Kaw	0.526	0.541	<b>0.000</b>	0.000	0.000	mono	0.548	0.563	0.990	0.000	0.000	mono	0.355	0.364	0.063	0.234	0.240	0.933	0.693	0.713	0.584
Kou	0.105	0.111	0.860	0.117	0.125	0.850	0.580	0.644	0.158	0.153	0.167	0.824	0.278	0.294	0.549	0.198	0.209	0.708	0.691	0.732	0.557
SaE	0.305	0.325	0.514	0.227	0.242	0.983	0.611	0.667	0.034	0.133	0.143	0.839	0.648	0.692	0.215	0.117	0.125	0.850	0.500	0.538	0.705
Sin	0.323	0.328	0.626	0.087	0.088	<b>0.000</b>	0.666	0.676	0.027	0.058	0.058	0.999	0.283	0.287	0.076	0.054	0.055	0.864	0.586	0.596	<b>0.001*</b>
Mon	0.180	0.189	0.725	0.642	0.680	0.150	0.597	0.652	0.081	0.370	0.392	0.027	0.335	0.353	0.891	0.335	0.353	0.288	0.645	0.679	<b>0.001*</b>
Par	0.375	0.387	0.182	0.622	0.646	0.025*	0.351	0.366	<b>0.000*</b>	0.061	0.063	0.897	0.430	0.444	<b>0.001*</b>	0.369	0.381	<b>0.001</b>	0.675	0.702	0.519
PeS	0.375	0.409	0.414	0.486	0.530	0.083	0.594	0.679	0.217	0.292	0.318	0.971	0.000	0.000	mono	0.153	0.167	0.824	0.681	0.742	0.243
PK2	0.492	0.525	0.028	0.594	0.633	<b>0.001*</b>	0.735	0.791	0.395	0.459	0.495	0.296	0.305	0.325	0.514	0.469	0.500	0.850	0.708	0.773	0.226
Slm	0.348	0.351	0.148	0.578	0.584	<b>0.000*</b>	0.749	0.759	<b>0.000*</b>	0.396	0.400	<b>0.001*</b>	0.446	0.450	0.095*	0.176	0.178	0.888	0.567	0.572	0.447

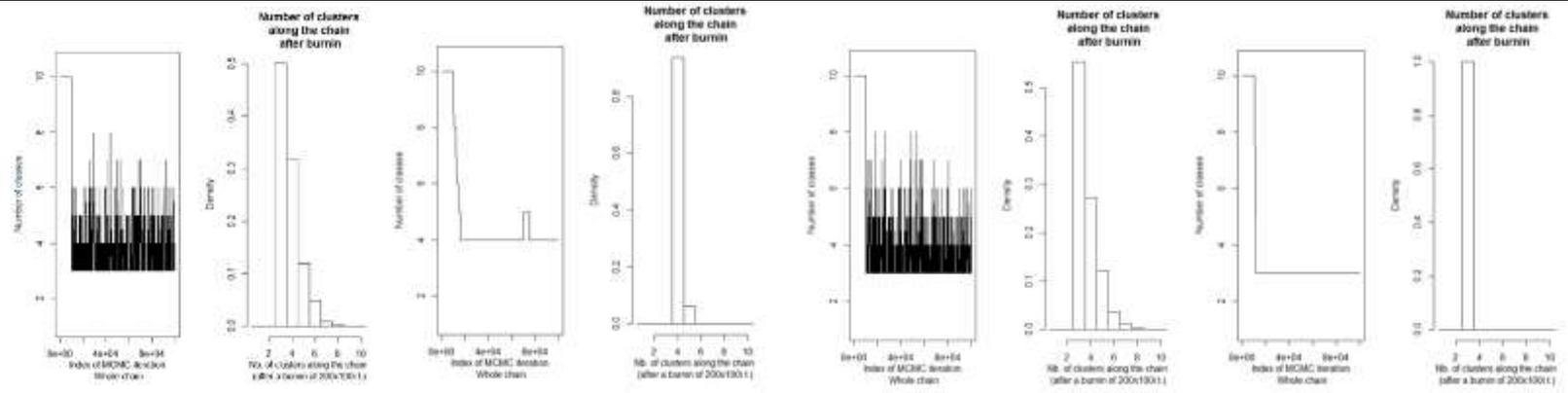
**Table S3.** Pairwise population differentiation ( $G''_{ST}$  below the diagonal and  $F_{ST}$  above the diagonal) based on microsatellite data.

$F_{ST}$ - $G''_{ST}$  values coloured according to distance from 0; in bold is significant  $F_{ST}$  values ( $p < 0.001$ ). Population abbreviations correspond to Fig. 1 and their colouration in the diagonal corresponds to the three predominant assignment to the  $K=3$  GENELAND clusters. Black box highlights sampling sites groups of these 3 main clusters.

AJI	-0.048	0.193	0.017	0.042	-0.007	-0.112	0.001	0.010	0.081	0.050	0.169	<b>0.454</b>	<b>0.442</b>	<b>0.359</b>	<b>0.389</b>	<b>0.371</b>	<b>0.422</b>	<b>0.348</b>	<b>0.343</b>	<b>0.434</b>	<b>0.306</b>	<b>0.246</b>
-0.037	BAL	0.149	-0.009	0.023	-0.023	-0.136	-0.012	-0.012	0.048	0.041	0.131	<b>0.412</b>	<b>0.412</b>	<b>0.324</b>	<b>0.347</b>	<b>0.341</b>	<b>0.384</b>	<b>0.313</b>	<b>0.299</b>	0.397	<b>0.294</b>	<b>0.204</b>
0.290	0.235	BOC	0.032	-0.044	0.048	0.195	0.125	0.350	-0.006	0.032	-0.063	<b>0.485</b>	<b>0.454</b>	<b>0.394</b>	<b>0.397</b>	<b>0.376</b>	<b>0.436</b>	<b>0.330</b>	<b>0.324</b>	<b>0.413</b>	<b>0.353</b>	<b>0.236</b>
0.046	0.015	0.068	BRU	-0.040	-0.039	-0.047	0.013	0.121	-0.001	0.015	-0.002	<b>0.392</b>	<b>0.325</b>	<b>0.279</b>	<b>0.276</b>	<b>0.261</b>	<b>0.328</b>	<b>0.281</b>	<b>0.280</b>	<b>0.346</b>	<b>0.250</b>	<b>0.193</b>
0.070	0.035	-0.040	-0.048	CAI	-0.017	0.092	0.051	0.229	-0.083	-0.048	-0.059	<b>0.408</b>	<b>0.383</b>	<b>0.327</b>	<b>0.294</b>	<b>0.300</b>	<b>0.377</b>	<b>0.266</b>	<b>0.271</b>	0.338	0.236	<b>0.198</b>
0.017	0.003	0.108	-0.033	-0.002	CAJ	-0.089	-0.055	0.112	0.029	-0.041	0.048	<b>0.447</b>	<b>0.401</b>	<b>0.326</b>	<b>0.345</b>	<b>0.334</b>	<b>0.392</b>	<b>0.275</b>	<b>0.286</b>	<b>0.365</b>	<b>0.269</b>	<b>0.193</b>
-0.047	-0.073	0.367	0.045	0.129	0.023	CAR	-0.067	-0.004	0.091	-0.014	0.209	<b>0.431</b>	<b>0.422</b>	<b>0.348</b>	<b>0.340</b>	0.346	0.401	0.271	0.298	0.355	0.207	0.184
0.041	0.032	0.202	0.045	0.091	-0.033	0.079	CRU	0.128	0.084	-0.015	0.137	<b>0.513</b>	<b>0.529</b>	<b>0.399</b>	<b>0.451</b>	<b>0.419</b>	<b>0.479</b>	<b>0.330</b>	<b>0.344</b>	0.442	<b>0.340</b>	<b>0.229</b>
0.025	-0.009	0.448	0.172	0.241	0.150	-0.017	0.175	GUA	0.200	0.209	0.346	<b>0.462</b>	<b>0.530</b>	<b>0.410</b>	<b>0.480</b>	<b>0.464</b>	<b>0.453</b>	<b>0.436</b>	<b>0.402</b>	<b>0.534</b>	<b>0.396</b>	<b>0.286</b>
0.130	0.082	0.000	0.000	-0.144	0.054	0.180	0.129	0.269	GUN	0.025	-0.058	<b>0.429</b>	<b>0.400</b>	<b>0.344</b>	<b>0.339</b>	<b>0.326</b>	<b>0.387</b>	<b>0.319</b>	<b>0.308</b>	<b>0.394</b>	<b>0.311</b>	<b>0.23</b>
0.111	0.110	0.092	0.060	-0.020	-0.010	0.172	0.043	0.284	0.056	MAR	0.015	<b>0.509</b>	<b>0.456</b>	<b>0.380</b>	<b>0.398</b>	<b>0.377</b>	<b>0.450</b>	<b>0.239</b>	<b>0.255</b>	0.331	<b>0.265</b>	<b>0.2</b>
0.275	0.220	-0.023	0.046	-0.114	0.126	0.357	0.247	0.416	-0.067	0.111	SAN	0.422	0.373	<b>0.341</b>	0.307	0.300	<b>0.361</b>	<b>0.303</b>	<b>0.313</b>	<b>0.369</b>	0.274	<b>0.232</b>
0.641	0.583	0.680	0.542	0.562	0.625	0.623	0.723	0.661	0.601	0.712	0.596	CAY	0.079	0.086	0.000	<b>0.114</b>	<b>0.073</b>	<b>0.469</b>	<b>0.421</b>	<b>0.458</b>	<b>0.383</b>	<b>0.352</b>
0.656	0.604	0.634	0.496	0.563	0.605	0.649	0.723	0.703	0.583	0.693	0.557	0.126	IRA	0.100	-0.015	-0.012	-0.023	<b>0.373</b>	<b>0.342</b>	<b>0.376</b>	<b>0.276</b>	<b>0.263</b>
0.552	0.495	0.581	0.429	0.494	0.492	0.544	0.598	0.597	0.524	0.585	0.520	0.121	0.158	KAW	0.048	0.076	0.070	0.324	<b>0.295</b>	<b>0.337</b>	<b>0.259</b>	<b>0.22</b>
0.594	0.532	0.580	0.443	0.473	0.543	0.585	0.656	0.640	0.516	0.643	0.498	0.011	0.013	0.074	KOU	0.004	0.026	<b>0.331</b>	<b>0.310</b>	<b>0.340</b>	<b>0.227</b>	<b>0.234</b>
0.593	0.539	0.558	0.428	0.496	0.527	0.587	0.639	0.644	0.517	0.627	0.488	0.157	0.010	0.117	0.027	SAE	0.045	<b>0.239</b>	<b>0.237</b>	0.222	0.141	<b>0.165</b>
0.620	0.564	0.627	0.477	0.543	0.572	0.604	0.690	0.653	0.563	0.657	0.531	0.104	-0.011	0.105	0.050	0.073	SIN	<b>0.402</b>	<b>0.360</b>	<b>0.398</b>	<b>0.321</b>	<b>0.285</b>
0.584	0.535	0.532	0.502	0.511	0.474	0.565	0.562	0.642	0.540	0.452	0.559	0.660	0.627	0.534	0.586	0.450	0.606	MON	-0.024	-0.045	0.020	-0.006
0.568	0.503	0.516	0.479	0.487	0.469	0.561	0.576	0.614	0.517	0.450	0.545	0.593	0.572	0.487	0.527	0.425	0.547	-0.010	PAR	0.005	0.067	0.033
0.673	0.623	0.616	0.580	0.589	0.595	0.667	0.669	0.720	0.614	0.583	0.627	0.637	0.591	0.532	0.568	0.405	0.583	-0.015	0.058	PES	0.054	0.002
0.551	0.540	0.596	0.479	0.512	0.490	0.522	0.609	0.617	0.558	0.537	0.565	0.531	0.508	0.446	0.448	0.306	0.489	0.092	0.159	0.176	PK2	<b>0.069</b>
0.464	0.400	0.444	0.369	0.405	0.370	0.429	0.449	0.523	0.434	0.392	0.467	0.538	0.495	0.401	0.450	0.325	0.483	0.011	0.076	0.043	0.148	SLM

Table S4: Details of Geneland runs output .

Number of iteration : 1e+05								
Thinning : 100								
Spatial information as prior	TRUE		FALSE		TRUE		FALSE	
Allele frequency model	Correlated				Uncorrelated			
Run number	K	Average posterior probability	K	Average posterior probability	K	Average posterior probability	K	Average posterior probability
1	3	-4432.528	3	-6387.82	3	-5185.175	3	-6845.101
2	3	-4624.993	4	-6176.248	3	-5358.515	3	-8149.133
3	3	-4908.845	3	-6936.877	3	-5357.36	<b>3</b>	<b>-6822.038</b>
4	3	-5076.983	3	-6330.144	3	-5473.179	3	-7360.205
5	3	-5728.272	3	-6835.703	3	-5707.007	3	-6907.575
6	3	-4907.322	3	-6181.609	3	-5201.154	3	-6894.687
7	3	-4311.075	<b>4</b>	<b>-6126.171</b>	3	-5385.565	3	-7565.744
8	3	-4890.784	3	-6215.936	3	-5284.528	3	-7358.087
9	3	-4734.856	4	-8269.445	3	-5329.533	3	-7129.702
<b>10</b>	<b>3</b>	<b>-4274.33</b>	3	-6338.096	<b>3</b>	<b>-4979.13</b>	3	-7557.956



**Table S3.** Pairwise population differentiation ( $F_{ST}$  below the diagonal and  $F_{ST}$  using ENA above the diagonal) based on microsatellite data calculated with FREENA.

$F_{ST}$  values redder coloured according to distance from 0, Sampling site abbreviations correspond to Fig. 1 and their colouration in the diagonal corresponds to the three predominant assignment to the  $K=3$  GENELAND clusters. Black box highlights sampling sites groups of these 3 main clusters

<b>AJI</b>	-0.03	0.09	0.02	0.01	0.01	-0.04	0.03	0.04	0.05	0.02	0.08	0.52	0.47	0.38	0.42	0.40	0.44	0.30	0.28	0.37	0.30	0.22
-0.03	<b>BAL</b>	0.07	0.01	0.01	0.01	-0.08	0.03	-0.01	0.03	0.06	0.06	0.49	0.45	0.35	0.39	0.37	0.40	0.30	0.26	0.37	0.32	0.20
0.12	0.09	<b>BOC</b>	0.00	0.02	0.03	0.11	0.08	0.22	0.00	0.09	0.04	0.52	0.49	0.40	0.44	0.41	0.44	0.36	0.31	0.42	0.39	0.25
0.01	0.00	0.02	<b>BRU</b>	0.01	0.00	0.01	0.04	0.12	0.00	0.05	0.02	0.43	0.36	0.29	0.32	0.30	0.33	0.30	0.26	0.34	0.29	0.21
0.01	0.00	0.00	-0.01	<b>CAI</b>	0.04	0.04	0.11	0.15	-0.05	0.04	-0.03	0.48	0.45	0.36	0.36	0.36	0.41	0.29	0.27	0.36	0.28	0.23
-0.01	0.00	0.04	-0.01	0.03	<b>CAJ</b>	-0.01	-0.01	0.08	0.05	0.01	0.08	0.52	0.46	0.35	0.41	0.39	0.42	0.30	0.25	0.36	0.33	0.22
-0.06	-0.08	0.11	-0.02	0.04	-0.04	<b>CAR</b>	0.05	-0.01	0.05	0.04	0.08	0.51	0.50	0.37	0.41	0.39	0.43	0.29	0.25	0.37	0.29	0.22
0.01	0.00	0.11	0.03	0.08	-0.03	0.00	<b>CRU</b>	0.14	0.09	0.02	0.17	0.56	0.57	0.42	0.50	0.46	0.49	0.32	0.30	0.42	0.37	0.22
0.01	-0.02	0.24	0.10	0.14	0.07	-0.01	0.11	<b>GUA</b>	0.16	0.18	0.20	0.52	0.56	0.41	0.49	0.48	0.45	0.41	0.36	0.49	0.42	0.28
0.05	0.03	0.00	0.00	-0.06	0.05	0.04	0.09	0.15	<b>GUN</b>	0.07	-0.03	0.47	0.43	0.35	0.37	0.36	0.39	0.32	0.28	0.37	0.33	0.23
0.02	0.03	0.06	0.03	0.00	-0.02	-0.01	-0.01	0.15	0.05	<b>MAR</b>	0.09	0.55	0.51	0.40	0.45	0.43	0.47	0.27	0.26	0.36	0.32	0.23
0.08	0.05	-0.01	0.00	-0.05	0.06	0.07	0.14	0.18	-0.05	0.05	<b>SAN</b>	0.48	0.45	0.37	0.37	0.36	0.39	0.34	0.30	0.40	0.33	0.27
0.52	0.47	0.52	0.42	0.47	0.51	0.50	0.55	0.50	0.46	0.54	0.46	<b>CAY</b>	0.05	0.10	0.01	0.11	0.06	0.49	0.42	0.45	0.41	0.37
0.48	0.45	0.49	0.36	0.44	0.46	0.49	0.56	0.55	0.43	0.50	0.43	0.07	<b>IRA</b>	0.09	-0.02	0.02	-0.02	0.41	0.35	0.40	0.33	0.28
0.37	0.34	0.40	0.29	0.36	0.35	0.37	0.41	0.41	0.35	0.39	0.36	0.09	0.10	<b>KAW</b>	0.07	0.08	0.07	0.33	0.28	0.32	0.29	0.23
0.41	0.38	0.43	0.31	0.35	0.40	0.40	0.49	0.48	0.37	0.44	0.35	0.01	-0.01	0.06	<b>KOU</b>	0.03	0.03	0.37	0.30	0.35	0.29	0.27
0.39	0.37	0.41	0.29	0.34	0.38	0.37	0.45	0.47	0.35	0.41	0.34	0.12	0.00	0.08	0.02	<b>SAE</b>	0.06	0.27	0.23	0.24	0.19	0.19
0.46	0.43	0.47	0.35	0.43	0.44	0.45	0.51	0.47	0.41	0.48	0.40	0.07	-0.02	0.07	0.03	0.05	<b>SIN</b>	0.41	0.34	0.38	0.34	0.29
0.31	0.30	0.35	0.30	0.28	0.29	0.27	0.31	0.40	0.31	0.26	0.33	0.49	0.39	0.32	0.35	0.25	0.42	<b>MON</b>	0.00	-0.02	0.04	0.01
0.30	0.27	0.32	0.28	0.26	0.27	0.25	0.32	0.37	0.29	0.26	0.30	0.43	0.35	0.29	0.30	0.23	0.37	-0.02	<b>PAR</b>	0.02	0.08	0.03
0.39	0.37	0.42	0.34	0.34	0.37	0.36	0.42	0.49	0.37	0.34	0.39	0.46	0.39	0.32	0.35	0.22	0.40	-0.04	0.00	<b>PES</b>	0.06	0.01
0.31	0.31	0.38	0.27	0.26	0.31	0.26	0.34	0.40	0.31	0.30	0.31	0.41	0.30	0.27	0.25	0.15	0.34	0.02	0.06	0.05	<b>PK2</b>	0.08
0.22	0.20	0.24	0.21	0.22	0.22	0.21	0.22	0.27	0.22	0.22	0.26	0.37	0.27	0.22	0.26	0.17	0.30	0.00	0.03	0.00	0.07	<b>SLM</b>

## 6. CONTRIBUTION A LA COMPREHENSION DU COMPORTEMENT SEXUEL CHEZ *HYLESIA* *METABUS*

---

### 6.1. Aperçu synthétique des phéromones de Lépidoptères Saturniidae et objectifs de l'étude

Chez les insectes, la communication par médiation chimique est très répandue et impliquée dans de nombreux comportements. Cette communication passe par l'intermédiaire de composés chimiques appelés *sémio-chimiques*. Produits par un organisme dit « émetteur », ces *sémio-chimiques* ont la capacité de modifier le comportement et/ou la physiologie de l'organisme dit « récepteur ». Les insectes possèdent des récepteurs, principalement antennaires, leur permettant de percevoir les informations correspondantes. C'est un moyen de communication à la fois entre membres d'espèces différentes, on parle alors de molécules *allélochimiques* (Whittaker and Feeny, 1971), et de *phéromones* lors de communication entre membres de la même espèce (Karlson and Lüscher, 1959). Les phéromones ont été décrites pour la première fois par Karlson et Lüscher en (1959), et peuvent être distinguées selon le comportement dans lequel elles sont impliquées. Chez les insectes, elles sont en particulier impliquées dans les phénomènes d'agrégation, la création de piste, le déclenchement d'un signal d'alarme, ainsi que la reconnaissance et la rencontre du partenaire sexuel. Les phéromones dites « sexuelles » sont impliquées dans ces mécanismes de rencontre et de reconnaissance du partenaire sexuel (Specific Mate Recognition System), deux processus intervenant dans la définition de l'espèce selon Paterson (1985). L'accouplement n'aura ainsi lieu que si les deux partenaires se sont trouvés, reconnus, et finalement acceptés, et s'il y a compatibilité des pièces génitales et gamétiques entre les deux partenaires. En effet, les constituants chimiques du mélange de la phéromone, leur ratio, leur dosage ainsi que le rythme d'émission temporel sont spécifiques à une espèce donnée, participant à l'isolement reproducteur entre espèces et au maintien de chaque espèce. Les études concernant les phéromones de lépidoptères ont montré l'existence de variations entre individus (Allison and Cardé, 2008), entre populations (Hansson *et al.*, 1990) et entre espèces (Byers, 2006). A l'heure actuelle, un grand nombre de phéromones sexuelles ont été identifiées, principalement chez les espèces ravageuses de culture,

car les phéromones pouvaient être utilisées comme méthodes de lutte alternative ou complémentaire aux insecticides. En comparaison des autres familles de lépidoptères, relativement peu de composés ont été identifiés chez les Saturniidae (The Pherobase ; [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com)). Ces identifications concernent essentiellement les genres *Actias*, *Antheraea*, *Coloradia*, *Hemileuca*, *Saturnia*, et plus récemment *Graellsia* (Millar *et al.*, 2010).

Chez la majorité des espèces de lépidoptères, c'est la femelle qui attire le mâle en utilisant une phéromone spécifique constituée de deux composés ou plus (Ando, Inomata and Yamamoto, 2004a). La période pendant laquelle les femelles émettent la phéromone sexuelle est nommée période d'appel. Elle correspond généralement à la période d'accouplement. Lors de l'appel, la femelle adopte un comportement particulier, déployant une glande à phéromone située à l'extrémité de son abdomen. Chez environ 75% des lépidoptères, la biosynthèse de la phéromone se fait *de novo* à partir d'acides gras précurseurs (Allison and Cardé, 2016). Les composés de la phéromone sont des chaînes linéaires de 10 à 18 carbones qui portent un groupe fonctionnel, le plus couramment ce sont des fonctions alcools, acétates ou aldéhydes (Type I). Chez certains autres lépidoptères, notamment appartenant aux familles Noctuidae et Geometridae, les composants phéromonaux sont synthétisés à partir d'acides linoléiques issus de l'alimentation (Type II). Les phéromones possèdent alors une chaîne à 17-23 carbones et sont constitués de polyènes hydrocarbonés, pouvant porter une fonction époxyde (Millar, 2000). Chez certaines espèces, la phéromone peut être constituée d'un mélange de composés des deux types issus des deux voies de biosynthèse (Wang *et al.*, 2010). Chez les Saturniidae les composés sont de Type I, et ils possèdent des chaînes carbonées majoritairement en C16 mais pouvant varier de C10 à C16 portant des acétates des aldéhydes ou des alcools (<http://www.pherobase.com>).

L'évolution des mélanges phéromonaux chez les Lépidoptères a des liens directs avec la phylogénie (Ando, Inomata and Yamamoto, 2004b), et il n'est pas rare que des espèces proches utilisent des mélanges de composés proches, voire similaires. Cependant, pour que les divergences spécifiques subsistent en sympatrie, il faut que l'isolement reproducteur soit maintenu. Dans un tel cas, l'isolement peut être assuré par l'utilisation de composés de structure différente ou de celle de composés proches mais présentant une configuration stéréo-isomérique E-Z différente (Kochansky *et al.*, 1975). L'utilisation de composés similaires est également possible grâce à des ratios différents, ou par l'utilisation de composés antagonistes. Par exemple, les phéromones de deux races d'hôtes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* (Pyralidae), sont toutes deux constituées d'un mélange d'acétate de (E)- et de (Z)-11-tétradecenyl, mais se distinguent par des ratios E:Z respectifs de 96:4 et 3:97 (Kochansky *et al.*, 1975). Une situation similaire est observée chez la tordeuse du mélèze, *Zeiraphera griseana* (Tortricidae) où les races-hôtes sur mélèze et pin se différencient par des mélanges phéromonaux différents (Dormont *et al.*, 2006). L'isolement reproducteur des populations, bien que sympatriques, est donc maintenu par l'attractivité préférentielle des mâles pour le mélange des femelles de leur race d'hôte, limitant ainsi les croisements interraciaux (Emelianov *et al.*, 2003).

La périodicité de libération de la phéromone constitue un mécanisme important d'isolement reproducteur chez les Lépidoptères (Zaspel, Cardé and Weller, 2008; Allison *et al.*, 2016). En effet, la période d'appel correspond généralement à la période d'accouplement. Par exemple, les espèces *Platyptilia carduidactyla* et *P. williamsii* (Pterophoridae), possèdent la même phéromone mais ne la libèrent pas au même moment, assurant ainsi l'isolement reproducteur (Haynes and Birch, 1986). La périodicité d'émission des phéromones est dépendante de plusieurs facteurs tels que la température, l'âge des femelles, la présence ou non de plantes hôtes, etc. (Allison *et al.*, 2016). En revanche, elle est globalement constante dans des conditions similaires, car régulée par des facteurs endogènes. Teal et Byers (1980) ont ainsi montré qu'en dépit de l'augmentation de la température le partitionnement temporel de trois espèces proches d'*Euoxa* (Noctuidae) est maintenu par décalage simultané de la période d'appel.

Les étapes nécessaires à la caractérisation d'une phéromone de Lépidoptère, passent à la fois par une phase d'identification chimique des composés mais également par des tests comportementaux permettant de les valider. Connaître la période durant laquelle les phéromones sont produites par la femelle est indispensable afin de pouvoir les étudier chimiquement, cette période correspondant en général à la période d'appel des femelles. L'identification des composés perceptibles par les capteurs sensoriels des mâles peut ensuite être réalisée par électro-antennographie, au-travers de l'étude des réponses électriques des antennes des mâles aux composés volatils envoyés vers ces antennes. Il est cependant indispensable d'y adosser des tests comportementaux permettant de révéler si ces réponses électriques procèdent d'une réelle attractivité ou d'une répulsion, ou encore si les composés effectivement perçus n'engendrent pas de réponse comportementale. La synthèse de ces composés permet la réalisation de tels tests d'attractivité des mâles en conditions contrôlées. Une fois les composés attractifs identifiés en laboratoire une phase de test par piégeage permet d'ajuster le ratio du mélange.

Les phéromones de Saturniidae Hemileucinae connues à ce jour concernent moins de 10 espèces, appartenant à 3 genres (<http://www.pherobase.com>), *Coloradia*, *Hemileuca*, et *Lonomia*. Elles incluent quatre espèces du genre *Hemileuca*, responsables d'érucisme chez l'homme aux États-Unis (McElfresh, Hammond and Millar, 2001), deux espèces du genre *Coloradia* (McElfresh and Millar, 1999) et une espèce de *Lonomia* (Zarbin *et al.*, 2007). Les mélanges de composés de ces deux genres se composent principalement d'un sous-ensemble spécifique des composés de E10,Z12-16:Ac, E10,Z12-16:OH, E10,Z12-16:Ald, et de E10,E12-16:Ac, mélangé dans certains cas avec d'autres composants mineurs. En outre, un antagonisme interspécifique de l'attraction est provoqué par des composants mineurs des mélanges. Le mélange de la phéromone de *Coloradia velda* se compose d'un rapport 100:10:0,33 de E10, Z12-16:Ac, E10,E12-16:Ac et E10,Z12-16:OH, mais l'attraction est inhibée avec des doses croissantes d'E10, Z12-16:Ald (McElfresh *et al.*, 1999). En revanche, le mélange de phéromones de *Coloradia pandora pandora* contient du

E10, Z12-16:Ald en tant que composant majeur, avec des quantités moindres en acétates E10,Z12-16:Ac et E10,E12-16:Ac (McElfresh *et al.*, 1999). Dans l'ensemble, les composants de ces phéromones sont basés sur des motifs structuraux assez courants, ayant été trouvés dans les mélanges de phéromones des familles Saturniidae, Bombycidae, Sphingidae et Pyralidae (Am *et al.*, 1999). Par ailleurs, une étude conduite sur la phéromone de *Lonomia oblica*, un autre Saturniidae sud-américain extrêmement venimeux à l'état de chenille mais de la sous-famille Saturniinae, a montré que deux autres composés, E11-16Ac et E11-16OH, sont perceptibles par les antennes des mâles (Zarbin *et al.*, 2007),, mais l'absence de tests d'attractivité correspondant ne permet pas d'affirmer que ces composés ont effectivement un rôle dans le comportement sexuel.

Concernant *Hylesia metabus*, à l'exception de la phase d'accouplement détaillée par Vassal (1989), aucune étude n'a été entreprise sur les mécanismes de reconnaissance du partenaire sexuel au niveau des populations présentes en Guyane. Des travaux entrepris au Venezuela ont suggéré deux constituants potentiels de la phéromone femelle, le 5-eicosanol et le 1-octadécanol, ces deux composés ayant provoqué une activité électrique des antennes mâles par électro-antennographie mais l'attraction des mâles par ces produits n'a pas fait l'objet d'une validation sur le terrain (Liendo-Barandiaran *et al.*, 2007). De plus, la caractérisation partielle des phéromones sexuelles ainsi que les possibles variabilités géographiques (race d'hôte, population ou espèce cryptique), sont des sources potentielles de la non-attractivité des insectes lors de l'utilisation de phéromones de synthèse. Dans ce contexte, mes objectifs ont été les suivants :

- Améliorer la compréhension et les connaissances sur la communication chimique chez *Hylesia metabus*, en précisant la temporalité d'émission de la phéromone sexuelle chez des individus provenant d'une pullulation de Guyane et placés dans des conditions de température et d'humidité correspondant aux conditions côtières guyanaises.
- Evaluer l'âge des femelles lors de leur premier appel, ainsi que l'effet de l'âge sur le comportement d'appel (durée et période).
- Mettre en place des tests préliminaires de capture et d'identification des composés constituant la phéromone femelle

## 6.2. Résultats de l'étude

### 6.2.1. Identification de la période d'appel des femelles d'*Hylesia metabus*

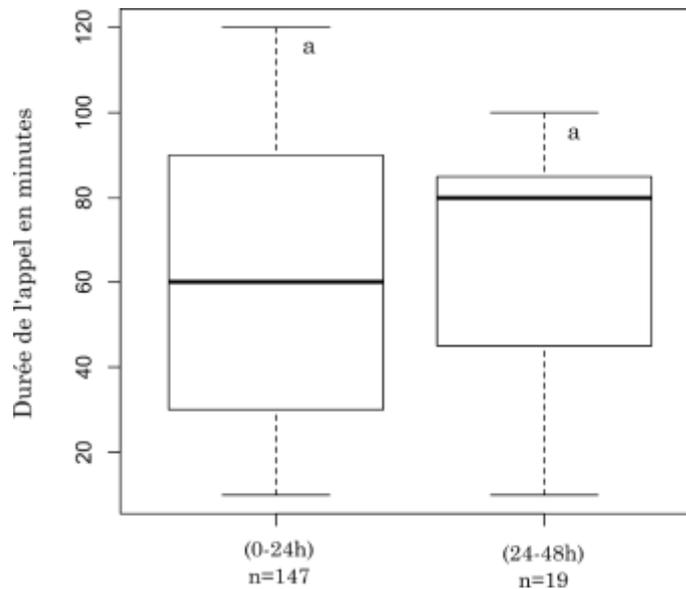
Sur les 164 chrysalides femelles obtenues à partir des élevages, 154 adultes ont émergé sur 3 jours consécutifs, et 10 n'ont pas survécu à la nymphose. Parmi celles qui ont émergé, 7 n'ont jamais présenté de comportement d'appel. Sur les 147 autres femelles, la grande majorité (128- soit 87%) ont présenté un comportement d'appel lors de leur première nuit, soit à un âge compris entre 0 et 24h. Une minorité a appelé au cours de leur deuxième nuit, et uniquement des femelles n'ayant pas appelé lors de la première nuit (Tableau 5). Aucune femelle n'a réalisé de comportement d'appel au cours de la troisième nuit, la quasi-totalité des femelles sont mortes à l'âge de 48-72h (93%). Lors du comportement d'appel, les femelles ont adopté une posture caractéristique. Les ailes sont semi déployées et la dernière partie abdominale laissant paraître la glande à phéromone extrudée de couleur nacré. Certaines femelle ont fait vibrer leurs ailles.

Tableau 5 Nombre de femelles en appel durant les différents jours d'observations

	Âge des femelles en appel		
	0-24h	24h-48h	48h-72h
Jour d'observation n°1	49	-	-
Jour d'observation n°2	40	9	-
Jour d'observation n°3	39	7	-
Jour d'observation n°4	0	3	-
Total	128 (87%)	19 (12%)	0

Toutes les femelles ont débuté leur appel entre 21h et 22h40 (soit entre 132 et 312 minutes après le début de la scotophase). La durée moyenne du comportement

d'appel des femelles a été estimée à  $59.2 \pm 30$  min et  $65.7 \pm 27$  min, respectivement pour les femelles de 0-24h et de 24h-48h (Figure 24). Aucun effet significatif de l'âge des femelles sur la durée du comportement d'appel n'a été mis en évidence (test de Mann-Whitney-Wilcoxon  $W=1084.5$ ,  $p$ -value = 0.4465) (Figure 24).



**Figure 24:** Durées de comportement d'appel des femelles d'*H. metabus* en fonction des classes d'âge. Des lettres identiques indiquent aucune différence significative entre classes d'âge ( $p$ -val>0.01).

L'expérience a aussi permis de préciser la distribution temporelle du comportement d'appel. Le nombre de femelles en appel (cumul des appels des 3 jours consécutifs) s'étale de 21h à 24h, soit de 132 à 312 minutes après le début de la scotophase, avec un pic de 21h30 et 22h30 (Figure 25).

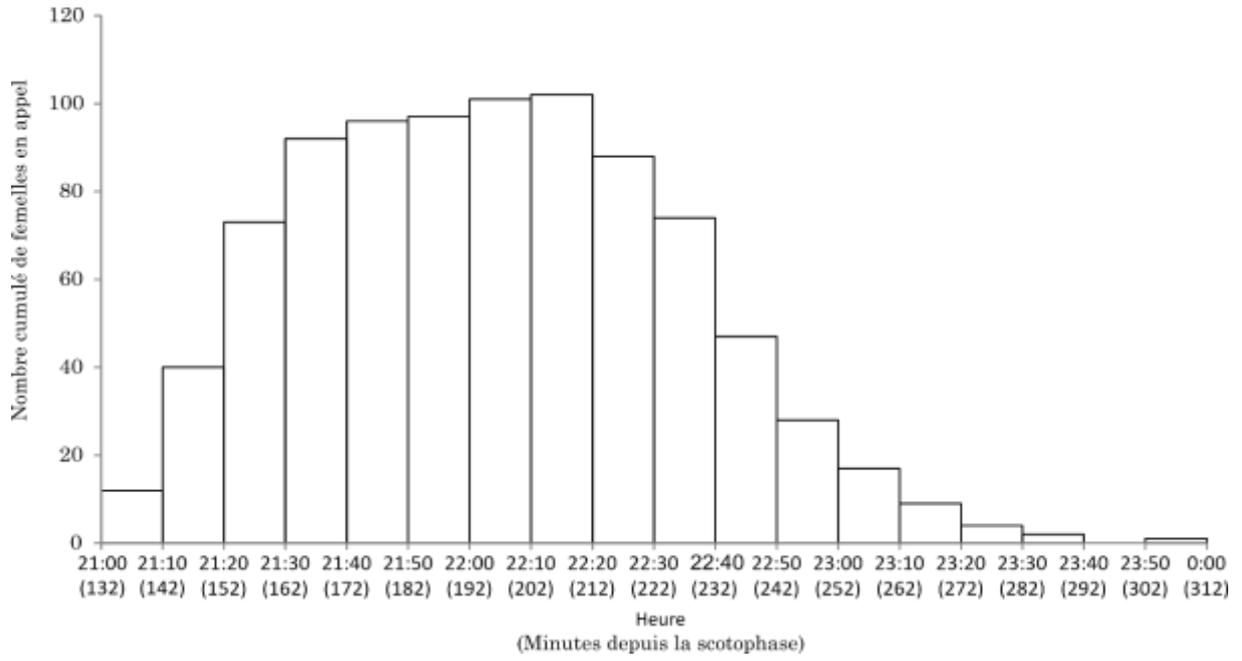


Figure 25: Cumul du nombre de femelles d'*H. metabus* en appel par tranche de 10 minutes en heure locale, et en minutes depuis le début de la scotophase.

## 6.2.2. Une identification encore très imparfaite des composés impliqués dans la phéromone sexuelle

Les molécules identifiées dans l'extrait total à l'Hexane des abdomens femelles sont des acides gras et des hydrocarbures (Tableau 6), mais aucune de ces molécules ne s'apparente à des composés phéromonaux.

**Tableau 6: Composés identifiés par spectrométrie de masse dans l'extrait Hexane des abdomens de femelles en appel. PM : poids moléculaires**

Temps de rétention (min)	Composés identifiés avec NIST (bibliothèque des spectres de masses)	PM
19,054	Hexadecanoic acid	256
21,095	Linolenic acid	278
22,93	Tricosane	324
24,949	Pentacosane	352
25,9	Hexacosane	366
26,466	Hydrocarbure	
26,825	Heptacosane	380
27,0892	Non identifié	
27,442	Oleamide	281
27,71	Octacosane	
27,7846	Non identifié	
28,234	Hydrocarbure	
28,3184	Non identifié	
28,558	Hydrocarbure	
28,8043	Non identifié	
30,204	Cholestérol	386

L'analyse des fibres SPME révèle une majorité de composés présents à la fois chez les mâles et les femelles, donc vraisemblablement ne faisant pas partie des constituants de la phéromone sexuelle d'*H. metabus*. Parmi les composés présents uniquement chez les femelles, la majeure partie n'a pas pu être identifiée avec certitude par la bibliothèque GC-MS. Si beaucoup de ces produits ne semblent pas correspondre à des phéromones, certains s'apparentent chimiquement aux phéromones de lépidoptères. Cependant, ils ne sont présents que sous forme de trace et l'absence de leur spectre de masse dans l'analyse en mode IC ne nous a pas permis de les identifier.

Tableau 7: Identification par analyse GC-MS des composés capturés par SPME chez les femelles d'*Hylesia metabus*. Les composés suivis du signe « ? » n'ont pas eu leur identification confirmée.

Temps de rétention (min)	Composés identifié avec Amdis (bibliothèque des spectres de masses)
3,05	Non identifié
3,28	Chaîne linéaire
4,77	Longue chaîne trace
5,33	Chaîne saturé
5,37	Non identifié
5,51	Terpène
5,69	Octanol/C11OH ?
5,88	Acétate
6,02	Non identifié
6,5	Acide
6,99	Acétate/OH
8,69	Non identifié
8,82	Anis aldéhyde
9,15	Trace longue chaîne hydrocarbure
9,64	Tridécano
9,24	Diène en C12 aldéhyde trace
11,15	Z9 DDOH ?
11,406	DDOL ?
11,43	Sesquiterpène
11,999	Non identifié
12,207	Non identifié trace
13,61	Aldéhyde saturé C14?
14,98	Non identifié diène C12?
20,72	Hydrocarbures (C21)
21,0882	OH/Ald double liaison $C_nH_{2n+2}$
22,91	Acide ou acide méthylé ester ou 355
28,3127	Non identifié
28,548	Hydrocarbures
28,935	Non identifié

## 6.3. Avancées et faiblesses dans la compréhension du comportement sexuel de *Hylesia metabus*

### 6.3.1. Le rythme d'émission de la phéromone sexuelle chez *H. metabus*

Chez les insectes à courte durée de vie, l'accouplement survient généralement peu de temps après l'émergence (Matthews & Matthews, 1988). La rapidité de maturation des ovocytes post-émergence influe sur la période durant laquelle a lieu le début de l'appel. L'âge post-émergence auquel les femelles d'*Hylesia metabus* ont appelé pour la première fois a été estimé à moins de 24 h pour la majorité des femelles (87%). Ces valeurs sont comparables à celles observées chez *Lonomia obliqua*, un Saturniidae appartenant à la même sous famille, dont 70% des appels ont lieu dans les 24 h post-émergence (Zarbin et al. 2007). Une fois le comportement d'appel initié, *H. metabus* montre un temps d'appel moyen de  $59.2 \pm 30$  min, temps globalement plus court que celui observé chez *L. obliqua*, qui est de 192 minutes en moyenne pour les femelles âgées de 0-24h (Fritzen et al., 2004). Bien qu'un effet de l'âge sur la durée des appels ait été rapporté pour plusieurs Lépidoptères (McNeil, 1991), y compris chez *L. obliqua*, la durée d'appel ne semble pas être affectée par l'âge des femelles dans notre étude. En revanche, un fait notable est que le nombre de femelles en appel âgées de 24-48h soit très faiblement représenté (12%), et qu'il devient inexistant chez les femelles âgées de 48-72h. De plus, les femelles ayant appelé à l'âge de 24-48h sont uniquement des femelles n'ayant pas appelé au cours de leur première nuit. Ces observations suggèrent qu'*H. metabus* pourrait n'appeler qu'une seule fois au cours de sa vie.

La durée de vie des *H. metabus* provenant de Guyane est de trois jours en laboratoire, n'excédant pas quatre jours (Vassal, 1989). Ces chiffres sont comparables dans la nature n'excédant pas trois jours chez des individus capturés et mis en cage sur site (Vassal, 1989). Dans notre étude les femelles sont mortes en grande majorité le troisième jour de leur vie (93%), en accord avec les valeurs reportées par Vassal. Une durée de vie de 4 à 10 jours estimée en laboratoire sur des *H. metabus* provenant du Venezuela (Fornés et al., 2000), contraste avec les valeurs obtenues chez les individus provenant de Guyane. Ces variations observées de mortalité peuvent provenir des conditions de captivités différentes selon les études, principalement par la qualité du feuillage constituant l'alimentation des stades larvaires, qui est susceptible d'influencer la capacité reproductive des lépidoptères (Heisswolf et al., 2009), mais également par les conditions de températures (Osanai, 1978). De par la durée de vie réduite des adultes *H. metabus* de Guyane ne se nourrissant pas, l'accouplement rapide post-émergence apparaît nécessaire afin d'assurer la reproduction.

### 6.3.2. La composition de la phéromone sexuelle d'*Hylesia metabus* reste toujours une boîte noire

Les tests préliminaires se sont avérés insuffisants pour caractériser les mélanges phéromonaux émis par la femelle. Les analyses des extractions, en phase liquide comme solide, n'ont pas permis une caractérisation précise des composés de la phéromone chez *H. metabus*, vraisemblablement à cause d'une trop faible quantité de produits présente dans les extraits, alliée à la présence d'impuretés. Il n'a malheureusement pas été possible de récolter un matériel biologique additionnel suffisant pour des tests complémentaires en raison de la dynamique des populations d'*Hylesia*, qui étaient en phase de latence durant l'étude.

Chez les Lépidoptères, les glandes à phéromones ne contiennent pas de phéromones stockées. Celles-ci sont produites *de novo* à partir d'acides gras au cours de l'appel. Comme elles sont émises en faible quantité, il faut donc un certain temps d'appel après le début de la biosynthèse pour que soient produites des quantités de phéromones suffisantes pour être détectables par GC-MS. J'ai précédemment identifié que la durée moyenne d'appel chez *H. metabus* est d'une heure environ. Afin d'augmenter la quantité de phéromone dans les extraits, il serait ainsi nécessaire de réaliser des extractions sur des femelles en appel depuis plus de 15 minutes.

Pour les extraits en phase liquide, les modifications susceptibles d'augmenter la quantité de composés phéromonaux dans les extraits sont l'augmentation du nombre de glandes à phéromones utilisées, ainsi qu'un plus long temps de contact des glandes avec le solvant. Cependant, l'augmentation du temps de maintien des glandes dans l'hexane augmente en même temps la présence d'impuretés. Les analyses que j'ai effectuées sur les extraits totaux de glandes dans l'hexane ont mis en évidence la présence d'acides gras précurseurs de phéromone et d'hydrocarbures qui sont vraisemblablement des pollutions provenant de l'hémolymphe et de la cuticule de la glande.

La caractérisation préliminaire par SPME s'est également avérée infructueuse vraisemblablement pour la même raison de trop faible quantité de phéromone produite par *H. metabus* lors des premières 15 minutes de l'appel. De plus, les seringues frottées directement sur la surface de la glande à phéromones capturent également les composés non phéromonaux tel que les hydrocarbures cuticulaires, *H. metabus* possédant de très nombreuses soies facilement détachables à l'extrémité de son abdomen et représentant une source potentielle d'impuretés.

### 6.3.3. Conclusion

Toutes ces informations amènent à une meilleure connaissance du mode de reproduction des *H. metabus*, et sont utiles pour la compréhension globale de sa biologie. Elles permettent également d'initier le processus de recherche conduisant au déve-

loppement d'un mélange attractif, utilisable pour la capture des *H. metabus* en Guyane.

## 7. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Pendant longtemps, les forêts tropicales ont été considérées comme exemptes de pullulations d'insectes (Elton, 1958) bien que des études pluri-annuelles (sur 6 ans) menées il y a plus de 30 ans par Wolda (1983) aient montré que les populations d'insectes tropicaux fluctuaient autant que ceux des forêts tempérées. Néanmoins, le paradigme selon lequel les forêts tropicales sont exemptes de pullulations d'insectes persiste, en dépit de preuves solides qui s'accumulent (Nair, 2007). Ces pullulations peuvent causer de fortes défoliations et engendrer une mortalité importante des arbres, jouant ainsi un rôle significatif dans la structuration des forêts tropicales (Eveleigh *et al.*, 2007). Les foyers de pullulation en forêts tropicales passent cependant souvent inaperçus parce qu'ils sont fortement localisés sur un sous-ensemble d'espèces pouvant alors être difficiles à observer, surtout si les dégâts affectent la canopée (Dyer *et al.*, 2012).

Ainsi, les exemples de pullulations d'insectes dans les forêts tropicales ne sont souvent connus que par des anecdotes ou des observations personnelles (Dyer *et al.*, 2012). Au-delà de ce type de description, le nombre d'études scientifiques publiées reste limité, et généralement aucun paramètre n'est utilisé pour tester des hypothèses sous-jacentes. Un examen de la littérature montre cependant un nombre croissant d'exemples documentés de pullulations d'insectes herbivores tropicaux, mais ceux-ci se cantonnent le plus souvent aux écosystèmes gérés et non naturels (Nair, 2007). Peu d'études se sont aussi intéressées aux flux géniques et à la dispersion dans les écosystèmes tropicaux, particulièrement pour les espèces d'insectes qui présentent des pullulations en milieux naturels.

C'est en 1918 que les médecins Léger et Mouzels ont établi une relation de cause à effet entre une dermatose prurigineuse fréquente en Guyane et le contact d'un papillon du genre *Hylesia*. Ils baptisent cette pathologie la papillonite (Léger and Mouzels, 1918). Dans leurs rapports, ils mentionnent que cette pathologie est connue des habitants de Cayenne depuis déjà 6 ou 7 ans. Cela fait maintenant environ un siècle que ce papillon pullule fréquemment sur le littoral guyanais, infligeant de fortes démangeaisons à la population (Jourdain *et al.*, 2012). Les épisodes de papillonite touchent fréquemment les communes de Sinnamary et d'Iracoubo, et le retour de la papillonite en 2012 dans la commune de Cayenne a relancé l'intérêt pour cette problématique. La volonté de mettre en place des mesures de gestions spécifiques de cet insecte urticant s'est heurtée à l'absence de données biologiques et écologiques sur l'espèce présumée (Jourdain *et al.*, 2012). La quasi-totalité des données sur le genre *Hylesia* provient non pas de sources écologiques mais plutôt épidémiologiques (Dyer *et al.*, 2012), et beaucoup de renseignements biologiques sont issus du Vénézuéla (Polar *et al.*, 2010). Dans ce contexte où connaître les mécanismes qui régulent les pullulations d'insectes et la structure de leur population est un enjeu

primordial dans leur gestion (Isaev *et al.*, 2017), l'étude menée sur *H. metabus* a un intérêt plus général pour appréhender la dynamique des populations des lépidoptères forestiers néotropicaux présentant des pullulations.

### **Probablement une seule espèce du genre *Hylesia* impliquée dans les épisodes de papillonite**

Malgré son impact sur la santé humaine, de nombreux aspects de la biologie d'*H. metabus* demeurent obscurs et son statut systématique est encore confus, avec plusieurs espèces, morphologiquement et étroitement apparentées dans le genre, présentant des différences mineures des pièces génitales (Lemaire, 2002). La détermination des espèces basée sur la morphologie des génitales nécessite la dissection des organes génitaux, technique difficile et méticuleuse qui peut conduire à des erreurs d'identifications. Cette ambiguïté ne se restreint pas aux stades adultes mais également aux chenilles. En effet, moins de la moitié des chenilles d'*Hylesia* sont connues, et il n'existe aucune clef permettant de les identifier morphologiquement. Les espèces d'*Hylesia* présentent aux stades adultes des caractéristiques de discrimination morphologique parfois ambiguës qui, associé à une quasi totale méconnaissance des stades larvaires, laissent présager des possibles erreurs d'identifications. Une identification erronée des papillons responsables de la papillonite en Guyane, a ainsi pu conduire à lui associer à tort des données écologiques et biologiques et entraver l'effectivité des méthodes de gestions. En effet, l'identification incorrecte d'espèces ou d'unités intra-spécifiques (population) peut conduire à des défaillances des méthodes de lutte, comme par exemple l'utilisation inappropriée de pesticides ou l'introduction d'insectes auxiliaire (Gurr *et al.*, 2012).

Les méthodes de lutte se doivent d'être adaptées à la fois à la biologie des papillons mais également aux caractéristiques du milieu où elles sont appliquées. Dans le cas de la papillonite, l'application des méthodes à proximité des habitations nécessite que celles-ci soient non toxiques pour la faune et non rémanentes pour l'environnement. La majorité du territoire n'est accessible que par les voies fluviales et les méthodes doivent prendre en compte la spécificité du territoire guyanais.

La méthode moléculaire basée sur le gène barcode de l'ADN mitochondrial avait déjà permis à d'autres auteurs la découverte d'espèces cryptiques potentielles au sein des *Hylesia* (Janzen *et al.*, 2012). Mais aucune donnée génétique n'ayant fait l'objet de publication pour *H. metabus*, j'ai donc utilisé les données fournies par les campagnes barcodes (Lepidoptera Barcode of Life à [www.lepbarcoding.org](http://www.lepbarcoding.org)) pour apporter des éléments de réponse sur les possibles erreurs taxonomiques. Ce fragment barcode a permis la délimitation des espèces d'*Hylesia* et s'est avéré pertinent, à la fois comme outil d'appui à la taxonomie aidant à l'identification et également à la délimitation des espèces du genre. Dans mon étude, cette méthode a été utilisée comme outil de première approche pour évaluer l'existence de plusieurs espèces impliquées dans les épisodes de papillonite. Les méthodes de délimitation automatique des espèces ont l'avantage de pouvoir être appliquées pour des groupes souffrants d'un déficit taxonomique, et cette méthode nous a permis de lever, au moins en partie, le doute d'erreur taxonomique des *H. metabus*. Au regard de leur divergences

mitochondriales, tous les individus d'*Hylesia* responsables de pullulation, que j'ai pu analyser, appartiennent bien à une seule espèce, *H. metabus*, dans les épisodes d'urtication en Guyane comme au Venezuela. Cependant, d'une part je n'ai pu avoir accès aux individus correspondant à tous les épisodes de papillonite observés durant le siècle dernier, et surtout identifier les espèces sans enquête taxonomique complémentaire reste critiquable. Ainsi, la seule base de séquences du gène Cox I ne permet d'affirmer avec certitude que mes échantillons appartiennent à une seule espèce. En effet, le fragment Cox I peut parfois être identique au sein de la même espèce ou, à l'inverse, être extrêmement variable au sein d'espèces différentes (Braby, Eastwood and Murray, 2012). En principe, l'utilisation des codes-barres ADN n'est interprétable que lorsque les résultats sont abordés de manière intégrative en utilisant d'autres données, en particulier les caractères morphologiques, les caractéristiques écologiques ou les marqueurs moléculaires indépendants (génome nucléaire). Mais, dans mon étude la concordance entre les séquences barcodes de l'ADN mitochondrial, la morphologie et les marqueurs microsatellites sont trois sources d'informations qui amènent à conclure qu'il s'agit d'une seule et même espèce impliquée. Dans le même temps, cette étude a également souligné l'importance des données barcode ADN qui, si elles sont utilisées avec prudence, sont un outil extrêmement intéressant pour des recherches appliquées, spécialement sur les taxons difficiles.

Au regard des lacunes concernant les données du genre *Hylesia*, notamment sur la biologie mais également sur leur phylogénie, il me semble difficile de tirer une conclusion définitive sur la nature de ces divergences. Cela renforce la nécessité de réaliser rapidement une phylogénie exhaustive du genre afin d'éclaircir la taxonomie de ce groupe d'importance sanitaire.

### **Des groupes génétiques liés aux plantes-hôtes, et notamment au palétuvier ?**

Il était communément admis que les papillons d'*H. metabus* retrouvés en ville sont inféodés aux palétuviers blancs et proviennent des mangroves avoisinantes (Polar *et al.*, 2010; Jourdain *et al.*, 2012). Le niveau de structure génétique observé chez *H. metabus* en Guyane semble correspondre à une ségrégation des sites « côtiers » par rapport aux sites « intérieurs ». Il est possible que la structure génétique observée provienne de divergences liées à une adaptation en lien avec la communauté végétale. Les observations écologiques indiquent cependant que l'espèce *H. metabus* est vraisemblablement polyphage, c'est-à-dire que ses chenilles consomment un grand nombre de plantes hôtes appartenant à des familles botaniques très éloignées phylogénétiquement (Lemaire, 2002), contrairement aux conclusions initialement avancées par certains écologistes qui l'associaient à un très faible éventail de plantes hôtes associées à la mangrove.

Les facteurs qui peuvent être à l'origine d'une différenciation génétique chez les insectes phytophages sont principalement les barrières géographiques, la faible capacité de dispersion, la fragmentation de l'habitat et la disponibilité des plantes hôtes (Mopper, 1996). Les insectes phytophages sont un groupe d'organismes très riche en espèces, et la source principale de cette diversité est souvent attribuée à la spécialisation par l'hôte (Price, 1997). L'étude de la coévolution entre les lépidoptères et leurs plantes hôtes a, dans une certaine mesure, été dominée par les recherches sur les papillons diurnes spécialistes, depuis l'article fondateur sur la coévolution par Ehrlich et Raven (1964). Certaines études ont montré que la diversification des papillons peut être favorisée par des changements d'hôtes engendrés par la radiation sur de nouvelles espèces (Wheat *et al.*, 2007).

Les relations herbivores-plantes montrent un spectre de spécialisation plus ou moins étroit, et opposent fréquemment les espèces spécialistes aux espèces généralistes (polyphages). Chez une partie des lépidoptères nocturnes, l'omniprésence de la polyphagie règne et peut être associée à certain trait d'histoire de vie limitant la spécialisation sur un groupe de plante (Wang *et al.*, 2017). La stratégie concerne les lépidoptères qui ne se nourrissent pas au stade adulte et qui possèdent des traits communs : une durée de vie courte, des femelles peu mobiles, parfois même incapables de voler et pondent des masses d'œufs uniques. Cette observation initialement mentionnée par Janzen (1984), Holloway (1987) et Holloway *et al.*, (2013) pour le groupe de papillons nocturnes de la superfamille des Bombycoidea, auquel appartient *Hylesia*, suggère que les traits de vie fondamentaux peuvent être liés à l'incapacité des adultes à se nourrir.

Le changement de plante hôte est un phénomène courant chez les insectes phytophages, mais les processus d'adaptation aux nouvelles ressources alimentaires restent très mal connus chez les polyphages, car plus compliqués à démontrer. L'adaptation locale chez les insectes herbivores polyphages à large distribution apparaît reliée avec la disponibilité des hôtes. Chez un lépidoptère Geometridae, *Lambdina fiscellaria*, la réduction progressive de la disponibilité de plusieurs essences forestières crée notamment une pression de sélection suffisante pour produire des populations localement adaptées et caractérisées par un plus faible niveau de polyphagie (Redfearn and Pimm, 1988).

Dans ce contexte, la polyphagie des *H. metabus* doit être considérée dans les plans de gestion, et l'attrait des *H. metabus* pour certaines essences doit être étudié de manière approfondie. Bien que mes données suggèrent une ségrégation, il est néanmoins impossible de tirer de conclusion sur les plantes hôtes. En effet, la quasi-totalité de mes échantillons provient de papillons adultes et de chenilles dans les derniers stades développementaux, empêchant ainsi de relier les divergences génétiques aux plantes hôtes. La capture de chenilles aux premiers stades est un exercice particulièrement délicat, car elles sont très difficiles à repérer dans la végétation, et parfois situées à plusieurs mètres de hauteur. Mon travail de thèse a permis la mise en évidence d'une divergence génétique au sein des *H. metabus* et d'envisager des scénarios plus complexes, le degré de polyphagie de chaque population doit être maintenant étudié pour démontrer qu'il existe une fitness différen-

tielle relié aux différentes essences d'arbres, et valider l'hypothèse de l'adaptation locale.

### **La connectivité génétique et la définition des unités de gestion adaptées**

L'homogénéité génétique semble être typique des lépidoptères tropicaux mais la plupart des études reposent sur des espèces temporellement synchrones, associées à une capacité de dispersion élevée (Franklin *et al.*, 2014). Au contraire, les données sur les pullulations d' *H. metabus*, montrent que les poches de pullulation sont limitées à quelques km<sup>2</sup>, et ne sont pas nécessairement synchronisées. Les données moléculaires, mitochondriales comme microsatellites, suggèrent que toutes les *Hylesia metabus* capturées lors des épisodes de papillonite appartiennent pourtant à un même cluster, qui contient également des individus capturés durant les périodes où la densité de population est basse. Plusieurs études sur des insectes indigènes, et non exotiques envahissants, montrent que les événements de pullulation semblent être en général régulés par les conditions environnementales locales plutôt que par les caractéristiques génétiques neutres de la population (Mun *et al.*, 2003; Chapuis *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2011). Une variable environnementale importante pour les insectes phytophages est la disponibilité des plantes hôtes. Les pullulations d'insectes sont plus fréquentes lorsque les plantes hôtes sont agrégées ou denses, tandis que l'herbivorie des plantes est considérablement réduite dans les forêts plus diversifiées, car les hôtes sont géographiquement dispersés (Carson *et al.*, 2004; Jactel *et al.*, 2007). En agroforesterie ce concept est bien connu, les forêts mélangées sont utilisées pour limiter les dégâts des phytophages sur les essences. Dans les forêts tropicales, Janzen (1970) explique la faible densité d'individus d'arbres des mêmes espèces par une pression forte de prédation à proximité de l'arbre mère, ce qui favorise la régénération à plus longue distance des plantules co-spécifiques. Un mécanisme explicatif de la résistance des forêts plus diversifiées au phytophages sont les effets des ennemis naturels limitant la survie des herbivores (Andow, 1991). Ainsi, l'hétérogénéité de la forêt néotropicale et la stabilité des facteurs environnementaux peuvent être impliquées dans le maintien des populations de *H. metabus* à des niveau de faible densité (Eveleigh *et al.*, 2007). Inversement, les écosystèmes côtiers qui abritent une végétation plus homogène liée à la présence humaine et aux variations climatiques plus importantes, pourraient permettre aux individus côtiers de *H. metabus* de voir leur population augmenter.

Le modèle de métapopulation a été suggéré être le plus approprié pour évaluer la dynamique des populations de phytophages en forêt tropicale (Dyer *et al.*, 2012). La densité peut être localement élevée sur un arbre ou un patch et se transmettre au patch adjacent, alors que la dynamique de l'écosystème globale peut rester stable (Kondoh, 2003). Mes résultats soutiennent également cette hypothèse notamment car la population côtière possède une connectivité suffisante pour être considérée comme une seule population, mais en même temps assez limitée pour connaître des dynamiques propres à chaque sous-population. Cette configuration

favorise l'adaptation locale et peut être directement à l'origine de l'étonnante diversité du genre *Hylesia* en Amérique du sud. Les résultats de ma thèse s'inscrivent dans la lignée de ceux déjà observés dans les systèmes forestiers, montrant une diminution des dégâts d'insectes herbivores en lien avec l'hétérogénéité du paysage, associé à une faible capacité de dispersion des insectes tropicaux favorisant la diversification par spéciation écologique.

Le flux de gènes dans les populations d'insectes est un facteur important à prendre en compte dans les programmes de lutte, car le flux génétique peut faciliter la propagation non seulement de pullulations, mais aussi des gènes résistants aux insecticides (Herzig, 1995). L'étude de la connectivité génétique indique indirectement la capacité de dispersion des individus (Lowe and Allendorf, 2010). Les estimations de différenciation génétique que j'ai obtenues pour *H. metabus* sont comparables à celles des populations de Lépidoptères connues pour présenter un faible degré de dispersion (Franklin *et al.*, 2014). La forte différenciation génétique entre les sites d'échantillonnage du Venezuela et de la Guyane indique une connectivité très limitée, certainement due à un isolement par la distance le long de la côte d'Amérique du Sud, ou à cause de barrière physique telle que la rivière de l'Orénoque. Mon échantillonnage ne permet pas de conclure sur cette ségrégation mais les marqueurs développés devraient permettre de vérifier aisément cette hypothèse par l'analyse d'échantillons récoltés dans des sites intermédiaires le long de la côte. En revanche, quelle que soit la cause biologique de cette ségrégation, cette indication est capitale, car elle indique que ces deux régions doivent être considérées comme des unités de gestion distinctes au regard de leur divergences. Compte tenu des distances géographiques entre les sites d'échantillonnage vénézuéliens, l'homogénéité génétique de la population observée se conforme à celle attendue chez un Saturniidae (Polar *et al.*, 2010). En revanche, le niveau de structure génétique entre les deux groupes d'*H. metabus* observés en Guyane indique l'existence de fortes restrictions au flux de gènes entre les sites côtiers et les sites intérieurs, empêchant leur homogénéisation génétique. L'interprétation de la ségrégation des *H. metabus* en Guyane semble donc plus complexe et ne peut être expliquée uniquement par une faible dispersion des adultes. La mise en évidence de l'homogénéité génétique du groupe côtier traduit vraisemblablement des échanges d'individus par migration, pouvant favoriser le transport des gènes de résistance à un produit biocide au sein de la côte.

### **Des perspectives de gestion des populations reliées à l'étude du comportement sexuel d'*H. metabus***

Les groupes génétiques identifiés peuvent différer dans leur réponse aux stratégies de lutte (par exemple dans les taux de résistance aux biocides), mais aussi dans leur comportement de reproduction. C'est pourquoi mes travaux de thèse ont évalué l'âge des femelles lors de leur premier appel et de mettre en place des tests préliminaires de capture et d'identification des composés constituant la phéromone femelle. Bien que les tests préliminaires se soient avérés insuffisants pour caractériser les mélanges phéromonaux émis par la femelle, ils ont permis de dégager des

points fondamentaux pour mener à bien cet objectif, notamment la nécessité de disposer de matériel biologique suffisant pour des tests complémentaires, et donc de mettre en place un élevage permanent en Guyane. Ce point est indispensable, et doit être établi à partir de papillons issus des populations côtières. L'élevage permanent permettra également de mettre en place d'autres projets de recherche tels que les tests de préférence alimentaire ou des tests biocide. Pour cela, je recommande que cet élevage soit réalisé dans un espace non confiné, type volière, car les soies volatiles sont peu rémanentes en conditions extérieures, et le danger provient essentiellement du confinement des papillons en salle close ou en laboratoire, entraînant l'accumulation des soies urticantes dans les systèmes de filtrations

Bien qu'elle se soit avérée infructueuse, la caractérisation chimique préliminaire des émissions femelles a montré que de très faibles quantités de phéromones sont produites par *H. metabus* lors des premières 15 minutes de l'appel. Mes travaux ont permis de proposer des stratégies plus adaptées en vue de l'extraction de ces composés phéromonaux. Il est ainsi essentiel de ne pas frotter les seringues SPME directement sur la surface de la glande à phéromones car elles capturent des composés non phéromonaux, probablement liés aux soies détachables à l'extrémité de l'abdomen, et représentant une source importante d'impuretés. Pour extraire au mieux cette phéromone, il est impératif de confiner plusieurs femelles en appel dans un espace clos et de réaliser un temps d'équilibration plus long. Toutes ces informations amènent à une meilleure connaissance du mode de reproduction des *H. metabus*, et sont utiles pour la compréhension globale de sa biologie. Elles permettent également d'initier le processus de recherche conduisant au développement d'un mélange attractif, utilisable pour la surveillance des populations des *H. metabus* en Guyane.

En conclusion, mon travail de thèse a permis d'apporter des éléments de réponse sur le fonctionnement des populations du papillon-cendre en Guyane et au Venezuela, et plus largement aider à la compréhension des phénomènes des pullulations d'insectes dans les milieux tropicaux. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives pour la gestion de ce fléau sanitaire qu'est la papillonite.

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

- Allison, Jeremy D., and Ring T. Cardé. 2008. “Male Pheromone Blend Preference Function Measured in Choice and No-Choice Wind Tunnel Trials with Almond Moths, *Cadra cautella*.” *Animal Behaviour* 75 (1): 259–66. doi:10.1016/j.anbehav.2007.04.033.
- Allison, Jeremy D., and Ring T. 2016. *Pheromone Communication in Moths : Evolution, Behavior, and Application*.
- Ando, Tetsu, Shin-ichi Inomata, and Masanobu Yamamoto. 2004a. “Lepidopteran Sex Pheromones.” *Topics in Current Chemistry* 239: 51–96. doi:10.1007/b95449.
- Andow, D. 1991. “Vegetational Diversity And Arthropod Population Response.” *Annual Review of Entomology* 36 (1): 561–86. doi:10.1146/annurev.ento.36.1.561.
- Andrews, Simon. 2010. “FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.” *Babraham Bioinformatics*. doi:citeulike-article-id:11583827.
- Arthur, Catherine L, and Janusz Pawliszyn. 1990. “Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers.” *Anal. Chem.* 62 (19): 2145–48. doi:10.1021/ac00218a019.
- Ashfaq, Muhammad, P.D.N. Hebert, and Amanda Naaum. 2016. “DNA Barcodes for Bio-Surveillance: Regulated and Economically Important Arthropod Plant pests1.” *Genome* 59 (11). NRC Research Press: 933–45. doi:10.1139/gen-2016-0024.
- Bates, H. W. 1862. “Contributions to an Insect Fauna of the Amazon Valley.-Lepidoptera:-Heliconinae.” *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London. Zoology* 6 (22): 73–77. doi:10.1111/j.1096-3642.1862.tb00932.x.
- Battisti, Andrea, Göran Holm, Bengt Fagrell, and Stig Larsson. 2011. “Urticating Hairs in Arthropods: Their Nature and Medical Significance.” *Annual Review of Entomology* 56 (1). *Annual Reviews*: 203–20. doi:10.1146/annurev-ento-120709-144844.
- Battisti, Andrea, Stig Larsson, and Alain Roques. 2017. “Processionary Moths and Associated Urtication Risk: Global Change?Driven Effects.” *Annual Review of Entomology* 62 (1). *Annual Reviews* : 323–42. doi:10.1146/annurev-ento-031616-034918.
- Berryman, A A. 1987. “The Theory and Classification of Outbreaks.” In *Insect Outbreaks*, pp.3-30 ref.69. doi:DOI: 10.1016/B978-0-12-078148-5.50005-1.
- Birer, Caroline, Niklas Tysklind, Lucie Zinger, and Christophe Duplais. 2017. “Comparative Analysis of DNA Extraction Methods to Study the Body Surface Microbiota of Insects: A Case Study with Ant Cuticular Bacteria.” *Molecular Ecology Resources*. doi:10.1111/1755-0998.12688.

- Black, W. C. 1993. "PCR with Arbitrary Primers: Approach with Care: INVITED REVIEW." *Insect Molecular Biology* 2 (1): 1–6. doi:10.1111/j.1365-2583.1993.tb00118.x.
- Blaxter, M., J. Mann, T. Chapman, F. Thomas, C. Whitton, R. Floyd, and E. Abebe. 2005. "Defining Operational Taxonomic Units Using DNA Barcode Data." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360 (1462): 1935–43. doi:10.1098/rstb.2005.1725.
- Boecklen, William J., and Susan Mopper. 1998. "Local Adaptation in Specialist Herbivores: Theory and Evidence." In *Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations*, 64–88. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4757-0902-5\_4.
- Bonal, D, A Bosc, S Ponton, and JY GORET. 2008. "Impact of Severe Dry Season on Net Ecosystem Exchange in the Neotropical Rainforest of French Guiana." *Global Change*.
- Botstein, D, RL White, and M Skolnick. 1980. "Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms." *American Journal of*.
- Bouvier, E. 1928. "No Title." In *Faune Des Colonies Françaises*, Volume 2, 449–715. Paris: Société d'éditions géographiques, maritimes et coloniales.
- Braby, Michael F., Rodney Eastwood, and Neil Murray. 2012. "The Subspecies Concept in Butterflies: Has Its Application in Taxonomy and Conservation Biology Outlived Its Usefulness?" *Biological Journal of the Linnean Society*. doi:10.1111/j.1095-8312.2012.01909.x.
- Brown, K. S., P. M. Sheppard, and J. R. G. Turner. 1974. "Quaternary Refugia in Tropical America: Evidence from Race Formation in Heliconius Butterflies." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 187 (1088): 369–78. doi:10.1098/rspb.1974.0082.
- Burns, JM, DH Janzen, and M Hajibabaei. 2008. "DNA Barcodes and Cryptic Species of Skipper Butterflies in the Genus Perichares in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica." *Proceedings of the*.
- Byers, John A. 2006. "Pheromone Component Patterns of Moth Evolution Revealed by Computer Analysis of the Pherolist." *Journal of Animal Ecology* 75 (2): 399–407. doi:10.1111/j.1365-2656.2006.01060.x.
- Cabrera, Gleysin, Ulf Lundberg, Arielis Rodríguez-Ulloa, Melfran Herrera, Wendy Machado, Madelón Portela, Sucel Palomares, et al. 2016. "Protein Content of the Hylesia Metabus Egg Nest Setae (Cramer [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) and Its Association with the Parental Investment for the Reproductive Success and Lepidopterism." *Journal of Proteomics*, August. doi:10.1016/j.jprot.2016.08.010.

- Carrera, M. 1991. *Insetos de Interesse Médico E Veterinário*. Universidade Federal do Paraná.
- Carson, WP, JP Cronin, and ZT Long. 2004. "10 A General Rule for Predicting When Insects Will Have Strong Top-Down Effects on Plant Communities: On the Relationship Between Insect Outbreaks and Host." *Ecological Studies*, Vol. 173.
- Casalá, A., C. Bianchi, Sánchez Navarro J. V., Bianchi, and Balsa. 1967. "Granuloma de Las Manos Por Nidos de Lepidópteros (*Hylesia Nigricans*)." *Arch Argent Dermatol* 17: 307–14.
- Cavalli-Sforza, L L, and a W F Edwards. 1967. "Phylogenetic Analysis. Models and Estimation Procedures." *The American Journal of Human Genetics* 19 (3 Pt 1): 233–57. doi:10.1073/pnas.85.16.6002.
- Chapuis, M. P., M. Lecoq, Y. Michalakis, A. Loiseau, G. A. Sword, S. Piry, and A. Estoup. 2008. "Do Outbreaks Affect Genetic Population Structure? A Worldwide Survey in *Locusta Migratoria*, a Pest Plagued by Microsatellite Null Alleles." *Molecular Ecology* 17 (16): 3640–53. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03869.x.
- Chapuis, Marie-Pierre, and Arnaud Estoup. 2007. "Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation." *Molecular Biology and Evolution* 24 (3): 621–31. doi:10.1093/molbev/msl191.
- Chapuis, Marie-Pierre, Anne Loiseau, Yannis Michalakis, Michel Lecoq, Alex Franc, and Arnaud Estoup. 2009. "Outbreaks, Gene Flow and Effective Population Size in the Migratory Locust, *Locusta Migratoria*: A Regional-Scale Comparative Survey." *Molecular Ecology* 18 (5): 792–800. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.04072.x.
- CNEV, Centre National D'Expertise sur les Vecteurs. 2011. "Stratégies et Méthodes de Lutte Optimales Contre *Hylesia Metabus*", Agent de La Papillonite En Guyane Française. Avis À L'attention de La Direction Générale de La Santé," 1–22.
- Cooke, John A. L., Vincent D. Roth, and Frederick H. Miller. 1972. "The Urticating Hairs of Theraphosid Spiders." *American Museum Novitates* 2498: 1–43. doi:10.1016/0041-0101(73)90089-5.
- Cooper, Robert J. 2005. "Insect and Bird Interactions." *The AUK* 122 (3): 1016–21. doi:10.1642/0004-8038(2005)122.
- Coyne, J A, and H A Orr. 2004. *Speciation*.
- Cruz, Fernando, Montse Perez, and Pablo Presa. 2005. "Distribution and Abundance of Microsatellites in the Genome of Bivalves." *Gene* 346: 241–47. doi:10.1016/j.gene.2004.11.013.
- Dakin, Ee, and Jc Avise. 2004. "Microsatellite Null Alleles in Parentage Analysis." *Heredity* 93: 504–9. doi:10.1038/sj.hdy.6800545.

- Darwin, Charles. 1859. *On the Origin of the Species*. Darwin. Vol. 5. doi:10.1016/S0262-4079(09)60380-8.
- Davies, TONY. 1998. "The New Automated Mass Spectrometry Deconvolution and Identification System (AMDIS)." *Spectroscopy Europe* 103.
- de Queiroz, K. 2005. "A Unified Species Concept and Its Consequences for the Future of Taxonomy." *Proceedings of the California Academy of Sciences* 56 (June): 196–215. doi:10.1073/pnas.0502030102.
- De Queiroz, Kevin. 2007. "Species Concepts and Species Delimitation." *Systematic Biology* 56 (6): 879–86. doi:10.1080/10635150701701083.
- Debinski, Diane M. 1994. "Genetic Diversity Assessment in a Metapopulation of the Butterfly *Euphydryas Gillettii*." *Biological Conservation* 70 (1): 25–31. doi:10.1016/0006-3207(94)90295-X.
- Dewoody, Jennifer, John D. Nason, and Valerie D. Hipkins. 2006. "Mitigating Scoring Errors in Microsatellite Data from Wild Populations." *Molecular Ecology Notes*. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01449.x.
- Dincă, Vlad, Sergio Montagud, Gerard Talavera, Juan Hernández-Roldán, Miguel L. Munguira, Enrique García-Barros, Paul D. N. Hebert, and Roger Vila. 2015. "DNA Barcode Reference Library for Iberian Butterflies Enables a Continental-Scale Preview of Potential Cryptic Diversity." *Scientific Reports* 5 (1): 12395. doi:10.1038/srep12395.
- Dinehart, S M, J L Jorizzo, N A Soter, N Noppakun, W R Voss, J A Hokanson, and E B Smith. 1987. "Evidence for Histamine in the Urticating Hairs of *Hylesia* Moths." *The Journal of Investigative Dermatology* 88 (6): 691–93. doi:10.1111/1523-1747.ep12470352.
- Dinehart, Scott M., M. Elizabeth Archer, John E. Wolf, Malcolm H. McGavran, Cynthia Reitz, and Edgar B. Smith. 1985. "Caripito Itch: Dermatitis from Contact with *Hylesia* Moths." *Journal of the American Academy of Dermatology* 13 (5): 743–47. doi:10.1016/S0190-9622(85)70216-2.
- Dyer, LA, WP Carson, and EG Leigh. 2012. "Insect Outbreaks in Tropical Forests: Patterns, Mechanisms, and Consequences." *Insect Outbreaks Revisited*.
- Eckert, C. G., K. E. Samis, and S. C. Loughheed. 2008. "Genetic Variation across Species' Geographical Ranges: The Central-Marginal Hypothesis and beyond." *Molecular Ecology*. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x.
- Eguchi, Eisuke, Kiyoko Watanabe, Takahiko Hariyama, and Kayoko Yamamoto. 1982. "A Comparison of Electrophysiologically Determined Spectral Responses in 35 Species of Lepidoptera." *Journal of Insect Physiology* 28 (8): 675–82. doi:10.1016/0022-1910(82)90145-7.

- Ehrlich, Paul R., and Peter H. Raven. 1964. "Butterflies and Plants: A Study in Co-evolution." *Evolution* 18 (4): 586. doi:10.2307/2406212.
- Elias, M, M Joron, and K Willmott. 2009. "Out of the Andes: Patterns of Diversification in Clearwing Butterflies." *Molecular*.
- Elton, Charles S. 1958. *The Ecology of Invasions By Animals and Plants*. Journal of Chemical Information and Modeling. Vol. 53. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Eva, H.D., E.E. de Miranda, C.M. Di Bella, V. Gond, O. Huber, M. Sgrenzaroli, S. Jones, et al. 2002. *A Vegetation Map of South America*. The Geographical Journal. doi:10.2307/633834.
- Eveleigh, Eldon S, Kevin S McCann, Peter C McCarthy, Steven J Pollock, Christopher J Lucarotti, Benoit Morin, George a McDougall, et al. 2007. "Fluctuations in Density of an Outbreak Species Drive Diversity Cascades in Food Webs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 16976–81. doi:10.1073/pnas.0704301104.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E. L. 2010. "An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis." *Molecular Ecology Resources* 10: 564–67. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.
- Excoffier, Laurent, and Heidi E L Lischer. 2010. "Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows." *Molecular Ecology Resources* 10 (3): 564–67. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Fagerberg, A. J., R. E. Fulton, and W. C. Black. 2001. "Microsatellite Loci Are Not Abundant in All Arthropod Genomes: Analyses in the Hard Tick, *Ixodes Scapularis* and the Yellow Fever Mosquito, *Aedes Aegypti*." *Insect Molecular Biology* 10 (3): 225–36. doi:10.1046/j.1365-2583.2001.00260.x.
- Fitzpatrick, B. M., J. A. Fordyce, and S. Gavrilets. 2009. "Pattern, Process and Geographic Modes of Speciation." *Journal of Evolutionary Biology* 22 (11): 2342–47. doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01833.x.
- Fornés, L, and JV Hernández. 2000. "Some Aspects of the Biology of *Hylesia metabus* (Cramer 1775)(Lepidoptera: Saturniidae)." *Boletín de Entomología Venezolana*.
- Franck, Pierre, Fabien Guérin, Anne Loiseau, and Benoît Sauphanor. 2005. "Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in the Codling Moth *Cydia Pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae)." *Molecular Ecology Notes* 5 (1). Blackwell Science Ltd: 99–102. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00850.x.
- Franklin, Michelle T., Judith H. Myers, and Jenny S. Cory. 2014. "Genetic Similarity of Island Populations of Tent Caterpillars during Successive Outbreaks." *PLoS ONE* 9 (5). doi:10.1371/journal.pone.0096679.

- Frérot, B, C Malosse, and AH Cain. 1997. "Solid-Phase Microextraction (SPME): A New Tool in Pheromone Identification in Lepidoptera." *Journal of High Resolution*.
- Fritzen, Márcio, Mirta Schattner, Ana Laura Quintana Ribeiro, I. D F Correia Batista, Janaina Ventura, Benedito Carlos Prezoto, and Ana Marisa Chudzinski-Tavassi. 2004. "Lonomia Obliqua Venom Action on Fibrinolytic System." *Thrombosis Research* 112 (1–2): 105–10. doi:10.1016/j.thromres.2003.11.005.
- Gentry, Grant L., and Lee A. Dyer. 2002. "On the Conditional Nature of Neotropical Caterpillar Defenses against Their Natural Enemies." *Ecology* 83 (11). Ecological Society of America: 3108–19. doi:10.1890/0012-9658(2002)083[3108:OTCNON]2.0.CO;2.
- Glasser, Carmen Moreno, João Luiz Cardoso, Glória Cristina Carréri-Bruno, Maria de Fátima Domingos, Roberto Henrique Pinto Moraes, and Ricardo Mário de Carvalho Ciaravolo. 1993. "Surtos Epidêmicos de Dermatite Causada Por Mariposas Do Gênero Hylesia (Lepidóptera: Hemileucidae) No Estado de São Paulo, Brasil." *Revista de Saúde Pública* 27 (3): 217–20. doi:10.1590/S0034-89101993000300011.
- Goldsmith, Marian R., and Frantisek. Marec. 2010. *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Gomes, I, A Collins, C Lonjou, N S Thomas, J Wilkinson, M Watson, and N Morton. 1999. "Hardy-Weinberg Quality Control." *Annals of Human Genetics* 63 (Pt 6): 535–38. doi:doi:10.1017/S0003480099007824.
- Gond, V, JZ Bernard, C Brognoli, and O Brunaux. 2009. "Analyse Multiscale de La Caractérisation Des Écosystèmes Forestiers Guyanais et Des Impacts Anthropiques À Partir de La Télédétection Spatiale." *Forestiers Des Caraïbes*.
- Gond, Valéry, Vincent Freycon, Jean-Franç Ois Molino, Olivier Brunaux, Florent Ingrassia, Pierre Joubert, Jean-Franç Ois Pekel, et al. 2011. "Broad-Scale Spatial Pattern of Forest Landscape Types in the Guiana Shield." *International Journal of Applied Earth Observations and Geoinformation* 13: 357–67. doi:10.1016/j.jag.2011.01.004.
- Greeney, Hf, La Dyer, and Am Smilanich. 2012. "Feeding by Lepidopteran Larvae Is Dangerous: A Review of Caterpillars' Chemical, Physiological, Morphological, and Behavioral Defenses against Natural Enemies." *ISJ* 9: 7–34.
- Guillot, GillesMortier, Frédéric, and Arnaud Estoup. 2005. "Geneland: A Computer Package for Landscape Genetics." *Molecular Ecology Notes* 5 (3): 712–15. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x.
- Guillot, Gilles, Frédéric Mortier, and Arnaud Estoup. 2005. "GENELAND: A Computer Package for Landscape Genetics." *Molecular Ecology Notes* 5 (3): 712–15. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x.

- Guillot, Gilles, Filipe Santos, and Arnaud Estoup. 2008. "Analysing Georeferenced Population Genetics Data with Geneland: A New Algorithm to Deal with Null Alleles and a Friendly Graphical User Interface." *Bioinformatics* (Oxford, England) 24 (11): 1406–7. doi:10.1093/bioinformatics/btn136.
- Guitet, Stéphane. 2015. "Diversité Des Écosystèmes Forestiers de Guyane Française: Distribution, Déterminants et Conséquences En Termes de Services Écosystémiques."
- Guitet, Stéphane, Cécile Richard-hansen, and Nicolas Surugue. 2015. "Catalogue Des Habitats Forestiers de Guyane.," no. November: 65.
- Gurr, Geoff M., Steve D. Wratten, and William E. Snyder. 2012. "Biodiversity and Insect Pests." In *Biodiversity and Insect Pests: Key Issues for Sustainable Management*, 1–20. doi:10.1002/9781118231838.ch1.
- Haffer, Jürgen. 1969. "Speciation in Amazonian Forest Birds." *Science* 165 (3889): 131–37. doi:10.1126/science.165.3889.131.
- Hajibabaei, Mehrdad, Daniel H Janzen, John M Burns, Winnie Hallwachs, and Paul D N Hebert. 2006. "DNA Barcodes Distinguish Species of Tropical Lepidoptera." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (4): 968–71. doi:10.1073/pnas.0510466103.
- Hanski, Ilkka. 1997. "4 - Metapopulation Dynamics from Concepts and Observations to Predictive Models." *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution*, 69–91. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-012323445-2/50007-9.
- Hansson, Bill S., Miklós Tóth, Christer Löfstedt, Gábor Szöcs, Mitko Subchev, and Jan Löfqvist. 1990. "Pheromone Variation among Eastern European and a Western Asian Population of the Turnip Moth *Agrotis Segetum*." *Journal of Chemical Ecology* 16 (5): 1611–22. doi:10.1007/BF01014094.
- Hartl, Daniel L., and AG Grant. 2007. "Principles of Population Genetics. 4th Edition." *Sinauer Associates* 14 (4): 544–45. doi:10.2980/1195-6860(2007)14[544b:POPG]2.0.CO;2.
- Haynes, K. F., and M. C. Birch. 1986. "Temporal Reproductive Isolation between Two Species of Plume Moths (Lepidoptera: Pterophoridae)." *Annals of the Entomological Society of America* 79 (1). Oxford University Press: 210–15. doi:10.1093/aesa/79.1.210.
- Hebert, Paul D N, Jeremy R Dewaard, and Jean-François Landry. 2010. "DNA Barcodes for 1/1000 of the Animal Kingdom." *Biology Letters* 6 (3): 359–62. doi:10.1098/rsbl.2009.0848.
- Heisswolf, A., T. Klemola, T. Andersson, and K. Ruohomäki. 2009. "Shifting Body Weight-Fecundity Relationship in a Capital Breeder: Maternal Effects on Egg Numbers of the Autumnal Moth under Field Conditions." *Bulletin of Entomological Research* 99 (1). Cambridge University Press: 73. doi:10.1017/S0007485308006135.

- Héritier, Philippe. 2011. *Le Climat Guyanais: Petit Atlas Climatique de La Guyane Française*. 2011.
- Hernández, José V, Frances Osborn, Beatriz Herrera, Carmen V Liendo-Barandiaran, José Perozo, and Diony Velásquez. 2009a. "Parasitoides Larva-Pupa de *Hylesia Metabus Cramer* (Lepidoptera: Saturniidae) En La Región Nororiental de Venezuela: Un Caso de Control Biológico Natural Larvae-Pupae Parasitoids of *Hylesia Metabus Cramer* (Lepidoptera: Saturniidae) in Northeastern Venezuel." *Neotropical Entomology* 38 (2): 243–50.
- Herzig, A. L. 1995. "Effects of Population Density on Long-Distance Dispersal in the Goldenrod Beetle *Trirhabda Virgata*." *Ecology* 76 (7): 2044–54. doi:10.2307/1941679.
- Holloway, Jeremy D. 1987. "Superfamily Bombycoidea: Families Lasiocampidae, Eupterotidae, Bombycidae, Brahmaeidae, Saturniidae, Sphingidae. ." In *Moths of Borneo Collection* , 242.
- Holloway, Jeremy D., Henry S. Barlow, Hok Kim Loong, and Chey Vun Khen. 2013. "Sweet or Savoury? Adult Feeding Preferences of Lepidoptera Attracted to Banana and Prawn Baits in the Oriental Tropics." *Raffles Bulletin of Zoology*, no. SUPPL. 29: 71–90.
- Hossler, Eric W. 2010. "Caterpillars and Moths. Part I. Dermatologic Manifestations of Encounters with Lepidoptera." *Journal of the American Academy of Dermatology*. doi:10.1016/j.jaad.2009.08.060.
- Huang, Xiaoqiu, and Anup Madan. 1999. "CAP3: A DNA Sequence Assembly Program." *Genome Research* 9 (9): 868–77. doi:10.1101/gr.9.9.868.
- Huber, O, and C Alarcón. 1988. "Mapa de Vegetación de Venezuela. Ministerio Del Ambiente Y de Los Recursos Naturales Renovables." The Nature Conservancy, Fundación Bioma, Caracas.
- Hübner, Jacob. 1820. *Verzeichniss Bekannter Schmettlinge [Sic]. Signatures*. Augsburg.
- Huemer, P, O Karsholt, and M Mutanen. 2014. "DNA Barcoding as a Screening Tool for Cryptic Diversity: An Example from *Caryocolum*, with Description of a New Species (Lepidoptera, Gelechiidae)." *ZooKeys*.
- Irwin, Michael E. 1999. "Implications of Movement in Developing and Deploying Integrated Pest Management Strategies." *Agricultural and Forest Meteorology* 97 (4): 235–48. doi:10.1016/S0168-1923(99)00069-6.
- Isaev, A. S., V. G. Soukhovolsky, O. V. Tarasova, E. N. Palnikova, and A. V. Kovalev. 2017. "The Effects of Weather Factors on Population Dynamics of Forest Defoliating Insects." In *Forest Insect Population Dynamics, Outbreaks, and Global Warming Effects*, 53–77. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781119407508.ch3.

- Jactel, H, and EG Brockerhoff. 2007. "Tree Diversity Reduces Herbivory by Forest Insects." *Ecology Letters*.
- Janzen, Daniel H. 1984. "Two Ways to Be a Tropical Big Moth: Santa Rosa Saturniids and Sphingids." *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 1 (November): 85–144.
- Janzen, Daniel H. DH, Winnie Hallwachs, DJ Donald J. Harvey, Karolyn Darrow, Rodolphe Rougerie, Mehrdad Hajibabaei, M. Alex Smith, et al. 2012. "What Happens to the Traditional Taxonomy When a Well-Known Tropical Saturniid Moth Fauna Is DNA Barcoded?" *Invertebrate Systematics* 26 (5–6): 478–505. doi:10.1071/IS12038.
- Janzen, Daniel H., Winnie Hallwachs, Patrick Blandin, John M. Burns, Jean Marie Cadiou, Isidro Chacon, Tanya Dapkey, et al. 2009. "Integration of DNA Barcoding into an Ongoing Inventory of Complex Tropical Biodiversity." *Molecular Ecology Resources* 9 (SUPPL. 1): 1–26. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02628.x.
- Jombart, Thibaut. 2008. "Adegenet: A R Package for the Multivariate Analysis of Genetic Markers." *Bioinformatics* 24 (11): 1403–5. doi:10.1093/bioinformatics/btn129.
- Jombart, Thibaut, Sébastien Devillard, and François Balloux. 2010. "Discriminant Analysis of Principal Components: A New Method for the Analysis of Genetically Structured Populations." *BMC Genetics* 11 (1). BioMed Central: 94. doi:10.1186/1471-2156-11-94.
- Joshi, N A, and J N Fass. 2011. "Sickle: A Sliding-Window, Adaptive, Quality-Based Trimming Tool for FastQ Files."
- Jourdain, F, R Girod, J M Vassal, F Chandre, C Lagneau, F Fouque, D Guiral, J Raude, and V Robert. 2012. "The Moth *Hylesia Metabus* and French Guiana Lepidopterism: Centenary of a Public Health Concern." *Parasite (Paris, France)* 19 (2): 117–28.
- Kamvar, Z N, J F Tabima, and Niklaus J. Grünwald. 2013. "The Poppr R Package for Genetic Analysis of Populations with Mixed (Clonal/sexual) Reproduction." *Phytopathology* 103 (6): 70.
- Karlson, P., and M. Lüscher. 1959. "Pheromones': A New Term for a Class of Biologically Active Substances." *Nature* 183 (4653): 55–56. doi:10.1038/183055a0.
- Keenan, Kevin, Philip McGinnity, Tom F. Cross, Walter W. Crozier, and Paulo A. Prodöhl. 2013. "diveRsity : An R Package for the Estimation and Exploration of Population Genetics Parameters and Their Associated Errors." Edited by Robert B. O'Hara. *Methods in Ecology and Evolution* 4 (8): 782–88. doi:10.1111/2041-210X.12067.
- Kekkonen, Mari, Marko Mutanen, Lauri Kaila, Marko Nieminen, and Paul D N Hebert. 2015. "Delineating Species with DNA Barcodes: A Case of Taxon Dependent Method Performance in Moths." *PloS One* 10 (4). Public Library of Science: e0122481. doi:10.1371/journal.pone.0122481.

- Kimura, Motoo. 1980. "A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences." *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111–20. doi:10.1007/BF01731581.
- Kobayashi, T, T Sakurai, M Sakakibara, and T Watanabe. 2011. "Multiple Origins of Outbreak Populations of a Native Insect Pest in an Agro-Ecosystem." *Bulletin of Entomological Research* 101 (3). Cambridge University Press: 313–24. doi:10.1017/S0007485310000490.
- Kochansky, J., R. T. Cardé, J. Liebherr, and W. L. Roelofs. 1975. "Sex Pheromone of the European Corn borer, *Ostrinia Nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), in New York." *Journal of Chemical Ecology* 1 (2). Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers: 225–31. doi:10.1007/BF00987871.
- Kondoh, Michio. 2003. "High Reproductive Rates Result in High Predation Risks: A Mechanism Promoting the Coexistence of Competing Prey in Spatially Structured Populations." *The American Naturalist* 161 (2): 299–309. doi:10.1086/345939.
- Lamy, Michel, Monique Michel, Roger Pradinaud, Georges Ducombs, and Jean Malleville. 1982. "L'appareil Urticant Des Papillons *Hylesia Urticans* Floch et Abonnenc et *H. Umbrata* Schaus (Lepidopteres : Saturniidae) Responsables de La Papillonite En Guyane Francaise." *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. doi:10.1016/0020-7322(82)90031-9.
- Léger, M, and P Mouzels. 1918. "Dermatose Prurigineuse Déterminée Par Des Papillons Saturnides Du Genre *Hylesia*." *Bull Soc Pathol Exot*, 11(2), 104-107.
- Leigh, Jessica W., and David Bryant. 2015. "Popart: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction." *Methods in Ecology and Evolution* 6 (9): 1110–16. doi:10.1111/2041-210X.12410.
- Lemaire, C. 2002. *Saturniidae of America: Hemileucinae*. Goecke & Evers.
- Lemaire, C, and J Minet. 1998. "The Bombycoidea and Their Relatives." Part.
- Lenormand, Thomas. 2002. "Gene Flow and the Limits to Natural Selection." *Trends in Ecology and Evolution* 17 (4): 183–89. doi:10.1016/S0169-5347(02)02497-7.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. "DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data." *Bioinformatics* 25 (11): 1451–52. doi:10.1093/bioinformatics/btp187.
- Liendo-Barandiaran, C.V., Beatriz Herrera, and José V Hernández. 2007. "Resúmenes XX Congreso Venezolano de Entomología Sistemática : Presentaciones Orales." In *Estudio de La Feromona Sexual de Hylesia Metabus* (Lepidoptera: Saturniidae), *Resúmenes XX Congreso Venezolano de Entomología Sistemática : Presentaciones Orales*, 22:57–143.

- Lowe, Winsor H., and Fred W. Allendorf. 2010. "What Can Genetics Tell Us about Population Connectivity?" *Molecular Ecology* 19 (15): 3038–51. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04688.x.
- Loxdale, HD, and G Lushai. 1998. "Molecular Markers in Entomology." *Bulletin of Entomological Research*.
- Maier, H., W. Spiegel, T. Kinaciyan, H. Krehan, A. Cabaj, A. Schopf, and H. Hönigsmann. 2003. "The Oak Processionary Caterpillar as the Cause of an Epidemic Airborne Disease: Survey and Analysis." *British Journal of Dermatology*. doi:10.1111/j.1365-2133.2003.05673.x.
- Mann, H. B., and D. R. Whitney. 1947. "On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically Larger than the Other." *The Annals of Mathematical Statistics* 18 (1): 50–60. doi:10.1214/aoms/1177730491.
- Mappes, Johanna, Nicola Marples, and John A. Endler. 2005. "The Complex Business of Survival by Aposematism." *Trends in Ecology and Evolution*. doi:10.1016/j.tree.2005.07.011.
- Martin, Marcel. 2011. "Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads." *EMBnet.journal* 17 (1): 10. doi:10.14806/ej.17.1.200.
- Matos-Maraví, Pável F., Carlos Peña, Keith R. Willmott, André V.L. Freitas, and Niklas Wahlberg. 2013. "Systematics and Evolutionary History of Butterflies in the 'Taygetis Clade' (Nymphalidae: Satyrinae: Euptychiina): Towards a Better Understanding of Neotropical Biogeography." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66 (1): 54–68. doi:10.1016/j.ympev.2012.09.005.
- Mayr, Ernest. 1942. *Systematics and the Origin of Species: From the Viewpoint of a Zoologist*. *Nature*. Vol. 151. doi:10.1038/151347a0.
- Mcelfresh, J. Steven, Abner M. Hammond, and Jocelyn G. Millar. 2001. "Sex Pheromone Components of the Buck Moth *Hemileuca Maia*." *Journal of Chemical Ecology* 27 (7). Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers: 1409–22. doi:10.1023/A:1010369326866.
- McElfresh, J. Steven, and Jocelyn G. Millar. 1999. "Sex Attractant Pheromone of Saturniid Moth *i* *Coloradia Velda*." *Journal of Chemical Ecology* 25 (5). Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers: 1067–78. doi:10.1023/a:1020829808831.
- McKendrick, Lorraine, Jim Provan, Úna Fitzpatrick, Mark J. F. Brown, Tomás E. Murray, Eckart Stolle, and Robert J. Paxton. 2017. "Microsatellite Analysis Supports the Existence of Three Cryptic Species within the Bumble Bee *Bombus lucorum* Sensu Lato." *Conservation Genetics* 18 (3). Springer Netherlands: 573–84. doi:10.1007/s10592-017-0965-3.
- Megléczy, Emese, Caroline Costedoat, Vincent Dubut, André Gilles, Thibaut Ma-lausa, Nicolas Pech, and Jean-François Martin. 2010. "QDD: A User-Friendly Program to Select Microsatellite Markers and Design Primers from Large Se-

- quencing Projects.” *Bioinformatics* (Oxford, England) 26 (3): 403–4. doi:10.1093/bioinformatics/btp670.
- Megléc, Emese, Nicolas Pech, André Gilles, Vincent Dubut, Pascal Hingamp, Aurélie Trilles, Rémi Grenier, and Jean-François Martin. 2014. “QDD Version 3.1: A User-Friendly Computer Program for Microsatellite Selection and Primer Design Revisited: Experimental Validation of Variables Determining Genotyping Success Rate.” *Molecular Ecology Resources* 14 (6): 1302–13. doi:10.1111/1755-0998.12271.
- Megléc, Emese, Frederic Petenian, Etienne Danchin, Armelle Coeur D’Acier, Jean Yves Rasplus, and Eric Faure. 2004. “High Similarity between Flanking Regions of Different Microsatellites Detected within Each of Two Species of Lepidoptera: *Parnassius Apollo* and *Euphydryas Aurinia*.” *Molecular Ecology* 13 (6): 1693–1700. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02163.x.
- Meirmans, Patrick G., and Philip W. Hedrick. 2011. “Assessing Population Structure: FST and Related Measures.” *Molecular Ecology Resources*. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x.
- Merrill, R. M., K. K. Dasmahapatra, J. W. Davey, D. D. Dell’Aglio, J. J. Hanly, B. Huber, C. D. Jiggins, et al. 2015. “The Diversification of *Heliconius* Butterflies: What Have We Learned in 150 Years?” *Journal of Evolutionary Biology* 28 (8): 1417–38. doi:10.1111/jeb.12672.
- Millar, Jocelyn G. 2000. “Polyene Hydrocarbons and Epoxides: A Second Major Class of Lepidopteran Sex Attractant Pheromones.” *Annual Review of Entomology* 45 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA : 575–604. doi:10.1146/annurev.ento.45.1.575.
- Millar, Jocelyn G., J. Steven McElfresh, Carmen Romero, Marta Vila, Neus Marí-Mena, and Carlos Lopez-Vaamonde. 2010. “Identification of the Sex Pheromone of a Protected Species, the Spanish Moon Moth *Graellsia Isabellae*.” *Journal of Chemical Ecology* 36 (9). Springer-Verlag: 923–32. doi:10.1007/s10886-010-9831-1.
- Moneo, Ignacio, Andrea Battisti, Barbara Dufour, José Carlos García-Ortiz, Miguel González-Muñoz, François Moutou, Paolo Paolucci, et al. 2015. “Medical and Veterinary Impact of the Urticating Processionary Larvae.” In *Processionary Moths and Climate Change: An Update*, 359–410. Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-017-9340-7\_8.
- Mopper, S. 1996. “Adaptive Genetic Structure in Phytophagous Insect Populations.” *Trends in Ecology & Evolution* 11: 235–238.
- Mullens, Bradley A. 2009. “Veterinary Entomology.” In *Encyclopedia of Insects*, 1031–34. doi:10.1016/B978-0-12-374144-8.00270-8.

- Mun, Jeomhee, Andrew J. Bohonak, and George K. Roderick. 2003. "Population Structure of the Pumpkin Fruit Fly *Bactrocera Depressa* (Tephritidae) in Korea and Japan: Pliocene Allopatry or Recent Invasion?" *Molecular Ecology* 12 (11): 2941–51. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01978.x.
- Nair, K. S. S. 2007. *Tropical Forest Insect Pests: Ecology, Impact, and Management*. Forest Research. doi:10.1017/CBO9780511542695.
- Nielsen, Rasmus, Joshua S Paul, Anders Albrechtsen, and Yun S Song. 2011. "Genotype and SNP Calling from next-Generation Sequencing Data." *Nature Reviews. Genetics* 12 (6). Nature Publishing Group: 443–51. doi:10.1038/nrg2986.
- Nowak, Carsten, Christian M Brown, and Jessica J Hellmann. 2009. "Microsatellite Markers for the Hybridizing Tiger Swallowtails, *Papilio Glaucus* and *P. Canadensis*, and Their Applicability to Historic Specimens and Congeneric Species." *Molecular Ecology Resources* 9 (3): 800–803. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02203.x.
- Olson, David M., and Eric Dinerstein. 1998. "The Global 200: A Representation Approach to Conserving the Earth's Most Biologically Valuable Ecoregions." *Conservation Biology* 12 (3): 502–15. doi:10.1046/j.1523-1739.1998.012003502.x.
- Osanai, Minoru. 1978. "Longevity and Body Weight Loss of Silkworm Moth, *Bombyx Mori*, Varied by Different Temperature Treatments." *Experimental Gerontology* 13 (6). Pergamon: 375–88. doi:10.1016/0531-5565(78)90048-7.
- Osborn, Frances. 2005. "La Palometa Peluda ( *Hylesia Metabus*) Como Problema. Creación Del Grupo Multidisciplinario Interinstitucional Para Su Estudio Y Control." In *Sociedad Venezolana de Microbiología. Capítulo Sucre XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología*.
- Osborn, Frances, Liliana Berlioz, Juana Vitelli-Flores, Wilmer Monsalve, Blas Dorta, and Vidal Rodríguez Lemoine. 2002. "Pathogenic Effects of Bacteria Isolated from Larvae of *Hylesia Metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae)." *Journal of Invertebrate Pathology* 80 (1): 7–12. doi:10.1016/S0022-2011(02)00037-X.
- Paniz-Mondolfi, Alberto E., Alexandra M. Pérez-Alvarez, Ulf Lundberg, Lizette Fornés, Oscar Reyes-Jaimes, Marier Hernández-Pérez, and Eric Hossler. 2011. "Cutaneous Lepidopterism: Dermatitis from Contact with Moths of *Hylesia Metabus* (Cramer 1775) (Lepidoptera: Saturniidae), the Causative Agent of Caripito Itch." *International Journal of Dermatology* 50 (5): 535–41. doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04683.x.
- Paterson, H E H. 1985. "The Recognition Concept of Species." *Species and Speciation* 4: 21–29.
- Peakall, R. O. D., and P. E. Smouse. 2006. "Genalex 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research." *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 288–95. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.

- Pereira, A I A, C R D Curvelo, Amnm Guerra, G S Andrade, and J C Zanuncio. 2009. "Eucalyptus Cloeziana AS A NEW HOST TO Hylesia Paulex (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE) IN SOUTHEAST BRAZIL." *Revista Caatinga* 22 (1): 5.
- Pérez-Miles, Fernando. 2002. "The Occurrence of Abdominal Urticating Hairs During Development in Theraphosinae (Araneae, Theraphosidae): Phylogenetic Implications." *Journal of Arachnology* 30 (2): 316–20. doi:10.1636/0161-8202(2002)030[0316:TOOAUH]2.0.CO;2.
- Perkins, L. E., M. P. Zalucki, N. R. Perkins, A. J. Cawdell-Smith, K. H. Todhunter, W. L. Bryden, and Bronwen W. Cribb. 2016. "The Urticating Setae of *Ochrogaster Lunifer*, an Australian Processionary Caterpillar of Veterinary Importance." *Medical and Veterinary Entomology* 30 (2): 241–45. doi:10.1111/mve.12156.
- Pescador, A R. 1995. "Distribution and Abundance of *Hylesia Lineata* Egg Masses in a Tropical Dry Forest in Western Mexico." *Southwestern Entomologist* 20 (3): 367–75.
- Petrucchio Toffolo, Edoardo, Daniel Zovi, Chiara Perin, Paolo Paolucci, Alain Roques, Andrea Battisti, and Helmuth Horvath. 2014. "Size and Dispersion of Urticating Setae in Three Species of Processionary Moths." *Integrative Zoology* 9 (3): 320–27. doi:10.1111/1749-4877.12031.
- Pfenninger, Markus, and Klaus Schwenk. 2007. "Cryptic Animal Species Are Homogeneously Distributed among Taxa and Biogeographical Regions." *BMC Evolutionary Biology* 7: 121. doi:10.1186/1471-2148-7-121.
- Polar, P, M. J Cock, C Frederickson, Hosein M, and U. Krauss. 2010. "Invasions of *Hylesia Metabus* (Lepidoptera: Saturniidae, Hemileucinae) into Trinidad, West Indies." *Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club*.
- Powell, Jeff R., Michael T. Monaghan, Maarja ??pik, and Matthias C. Rillig. 2011. "Evolutionary Criteria Outperform Operational Approaches in Producing Ecologically Relevant Fungal Species Inventories." *Molecular Ecology* 20 (3). Blackwell Publishing Ltd: 655–66. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04964.x.
- Price, Peter W. 1997. *Insect Ecology*. Wiley.
- Primmer, Craig R., Terje Raudsepp, Bhanu P. Chowdhary, Anders Pape Møller, and Hans Ellegren. 1997. "Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome." *Genome Research* 7 (5): 471–82. doi:10.1101/gr.7.5.471.
- R Core Team. 2017. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ratnasingham, S, and Paul D N Hebert. 2007. "The Barcode of Life Data System BOLD." *Molecular Ecology Notes* 7 (3): 355–364. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.

- Ratnasingham, Sujeevan, and Paul D N Hebert. 2013. "A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System." *PLoS ONE* 8 (7). doi:10.1371/journal.pone.0066213.
- Raymond, M, and F Rousset. 1995a. "GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism." *Journal of Heredity* 86: 248–49. doi:10.1111/j.0021-8790.2004.00839.x.
- Redfearn, Andrew, and Stuart L. Pimm. 1988. "Population Variability and Polyphagy in Herbivorous Insect Communities." *Ecological Monographs*. doi:10.2307/1942633.
- Roques, Alain. 2015. *Processionary Moths and Climate Change: An Update*. *Processionary Moths and Climate Change: An Update*. doi:10.1007/978-94-017-9340-7.
- Rosen, David. 1986. "The Role of Taxonomy in Effective Biological Control Programs." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 15 (2–3): 121–29. doi:10.1016/0167-8809(86)90085-X.
- Rozen, S, and H Skaletsky. 2000. "Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers." *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 132 (FEBRUARY 2000): 365–86. doi:10.1385/1-59259-192-2:365.
- Rundle, Howard D., and Patrik Nosil. 2005. "Ecological Speciation." *Ecology Letters*. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x.
- Ruxton, Graeme D., Thomas N. Sherratt, and Michael P. Speed. 2004. "Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry." *Oxford Biology* 17: 249. doi:10.1093/acprof.
- Saitou, N, and M Nei. 1987. "The Neighbour-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." *Mol Biol Evo* 4 (4): 406–25. doi:citeulike-article-id:93683.
- Salomon, Oscar D, Daniel Simon, Juan Carlos Rimoldi, Miguel Villaruel, Omar Perez, Raul Perez, and Hector Marchan. 2005. "Lepidopterism due to the Butterfly *Hylesia Nigricans*. Preventive Research-Intervention in Buenos Aires." *Medicina* 65 (3): 241–46.
- Santos, G. P., T. V. Zanuncio, O. S. Dias, and J. C. Zanuncio. 1996. "Biology of *Hylesia Nanus* (Walker)(Lepidoptera: Attacidae)." *ANAIS-SOCIEDADE ENTOMOLOGICA DO BRASIL* 25: 479–82.
- Schmitt, Thomas, and Alfred Seitz. 2004. "Low Diversity but High Differentiation: The Population Genetics of *Aglaope Infausta* (Zygaenidae: Lepidoptera)." *Journal of Biogeography* 31 (1). Blackwell Science Ltd: 137–44. doi:10.1046/j.0305-0270.2003.01003.x.
- Shaw, Anthony B. 1987. "An Analysis of the Rainfall Regimes on the Coastal Region of Guyana." *Journal of Climatology* 7 (3): 291–302. doi:10.1002/joc.3370070307.
- Sinama, Melthide, Vincent Dubut, Caroline Costedoat, André Andre Gilles, Marius Junker, Thibaut Malausa, Jean-Francois François Martin, et al. 2011. "Chal-

- lenges of Microsatellite Development in Lepidoptera: *Euphydryas Aurinia* (Nymphalidae) as a Case Study.” *European Journal of Entomology* 108 (2). EJE: 261–66. doi:10.14411/eje.2011.035.
- Specht, A., AC. Formentini, and E. Corseuil. 2007. “Biological Aspects of *Hylesia Metapyrrha* (Lepidoptera; Saturniidae; Hemileucinae), in Laboratory.” *Brazilian Journal of Biology* 67 (1). Instituto Internacional de Ecologia: 173–77. doi:10.1590/S1519-69842007000100024.
- Specht, Alexandre, Aline C. Formentini, and Elio Corseuil. 2006. “Biologia de *Hylesia Nigricans* (Berg) (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae).” *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (1). Sociedade Brasileira de Zoologia: 248–55. doi:10.1590/S0101-81752006000100018.
- Tamura, Koichiro, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipiński, and Sudhir Kumar. 2013. “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.” *Molecular Biology and Evolution* 30 (12). Oxford University Press: 2725–29. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Teal, P. E. A., and J. R. Byers. 1980. “Biosystematics of the Genus *Euxoa* (Lepidoptera: Noctuidae). XIV. Effects of Temperature on Female Calling Behaviour and Temporal Partitioning in Three Sibling Species of the *Declarata* Group.” *Can. Ent.* 112 (2). Cambridge University Press: 113–17. doi:10.4039/Ent112113-2.
- Techen, Natascha, Renée S Arias, Neil C Glynn, Zhiqiang Pan, Ikhlas A Khan, and Brian E Scheffler. 2010a. “Optimized Construction of Microsatellite-Enriched Libraries.” *Molecular Ecology Resources* 10 (3): 508–15. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02802.x.
- Templeton, A. R. 1980. “The Theory of Speciation via the Founder Principle.” *Genetics*. doi:10.2307/2408012.
- Thompson, Julie D., Toby. J. Gibson, and Des G. Higgins. 2002. “Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX.” In *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 2:1–22. doi:10.1002/0471250953.bi0203s00.
- Torres-Leguizamon, M., M. Solignac, D. Vautrin, C. Capdevielle-Dulac, S. Dupas, and J. F. Silvain. 2009. “Isolation and Characterization of Polymorphic Microsatellites in the Potato Tuber Moth *Tecia Solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae).” *Molecular Ecology Resources* 9 (4). Blackwell Publishing Ltd: 1167–69. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02656.x.
- Van Nieuwerkerken, E J, L Kaila, I J Kitching, Niels P Kristensen, David C Lees, Joel Minet, Charles Mitter, Marko Mutanen, and Jerome C Regier. 2011. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.), *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-Level Classification and Survey of Taxonomic Richness*. Zootaxa. Vol. 1758. doi:http://www.mapress.com/zootaxa/2011/f/zt03148p221.pdf.

- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley. 2004. "Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data." *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535–38. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
- Van Toor, Ron F., Stephen P. Foster, James A. Anstead, Samantha Mitchinson, Brian Fenton, and Louise Kasprovicz. 2008. "Insecticide Resistance and Genetic Composition of *Myzus Persicae* (Hemiptera: Aphididae) on Field Potatoes in New Zealand." *Crop Protection* 27 (2): 236–47. doi:10.1016/j.cropro.2007.05.015.
- Vásquez, L. 1994. "Estudio Bioecológico Y Estrategias de Control de La Palometa *Hylesia Metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) En La Región Oriental. Períodos, 1987, 1991-1993." Informe Del Consejo de Investigación, Universidad de Oriente.
- Vassal, J.-M., H De Barjac, R Frutos, and B A Federici. 1993. "Isolation of *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Israelensis* from Diseased Field-Collected Larvae of the Saturniid Moth, *Hylesia Metabus*, in French Guiana." *FEMS Microbiology Letters* 107 (2–3): 199–203.
- Vassal, Jean-Michel. 1989. "Biologie, Écologie et Pathologie d'*Hylesia Metabus* (Cramer 1775) (Lépidoptères : Saturniidae), Agent de La 'papillonite' en Guyane Française: Mise En Place D'une Structure de Lutte Intégrée." Doctorat En Biologie Des Organismes et Des Populations Biologie d: 249 + planches.
- Vogler, Alfried P., and Michael T. Monaghan. 2007. "Recent Advances in DNA Taxonomy." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45 (1): 1–10. doi:10.1111/j.1439-0469.2006.00384.x.
- Vos, Pieter, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo Van De Lee, Miranda Hornes, Adrie Friters, et al. 1995. "AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting." *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407–14. doi:10.1093/nar/23.21.4407.
- Wagner, a P, S Creel, and S T Kalinowski. 2006. "Estimating Relatedness and Relationships Using Microsatellite Loci with Null Alleles." *Heredity* 97 (5): 336–45. doi:10.1038/sj.hdy.6800865.
- Wang, Hong-Lei, Cheng-Hua Zhao, Jocelyn G Millar, Ring T Cardé, and Christer Löfstedt. 2010. "Biosynthesis of Unusual Moth Pheromone Components Involves Two Different Pathways in the Navel Orangeworm, *Amyelois Transitella*." *Journal of Chemical Ecology* 36 (5). Springer: 535–47. doi:10.1007/s10886-010-9777-3.
- Wang, Houshuai, Jeremy D. Holloway, Niklas Janz, Mariana P. Braga, Niklas Wahlberg, Min Wang, and Sören Nylin. 2017. "Polyphagy and Diversification in Tussock Moths: Support for the Oscillation Hypothesis from Extreme Generalists." *Ecology and Evolution* 7 (19): 7975–86. doi:10.1002/ece3.3350.
- Weir, B S. 1996. "Intraspecific Differentiation." *Molecular Systematics* 2nd editio (10): 385–405.

- Weir, B.S., and C.C. Cockerham. 1984. "Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure." *Evolution* 38 (6): 1358–70. doi:10.2307/2410030.
- Wheat, Christopher W, Heiko Vogel, Ute Wittstock, Michael F Braby, Dessie Underwood, and Thomas Mitchell-Olds. 2007. "The Genetic Basis of a Plant-Insect Coevolutionary Key Innovation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51). National Academy of Sciences: 20427–31. doi:10.1073/pnas.0706229104.
- Whittaker, R. H., and P P Feeny. 1971. "Allelochemicals: Chemical Interactions between Species." *Science* 171 (3973): 757–70. doi:10.1126/science.171.3973.757.
- Williams, J G, A R Kubelik, K J Livak, J A Rafalski, and S V Tingey. 1990. "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers." *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531–35.
- Wilson, John James, Kong Wah Sing, and Mohd Sofian-Azirun. 2013. "Building a DNA Barcode Reference Library for the True Butterflies (Lepidoptera) of Peninsula Malaysia: What about the Subspecies?" *PLoS ONE* 8 (11). doi:10.1371/journal.pone.0079969.
- Wolda, Henk. 1983. "'Long-Term' stability of Tropical Insect Populations." *Researches on Population Ecology* 25 (3 Supplement): 112–26. doi:10.1007/BF02539633.
- Zanuncio, Josécola, Eduardo Cândido do Nascimento, Juliana Ferreira Garcia, and Teresinha Vinha Zanuncio. 1994. "Major Lepidopterous Defoliators of Eucalypt in Southeast Brazil." *Forest Ecology and Management* 65 (1): 53–63. doi:10.1016/0378-1127(94)90257-7.
- Zarbin, Paulo H G, Lisete M Lorini, Bianca G Ambrogi, Diogo M Vidal, Eraldo R Lima, P H G Zarbin, L M Lorini, et al. 2007. "Sex Pheromone of *Lonomia obliqua*: Daily Rhythm of Production, Identification, and Synthesis." *J Chem Ecol* 33: 555–65. doi:10.1007/s10886-006-9246-1.
- Zaspel, Jennifer M, R T Cardé, and Susan J Weller. 2008. "A Review of *Virbia* (Formerly *Holomelina*) of America North of Mexico (Arctiidae: Arctiinae: Arctiini)." *Bulletin of the Florida Museum of Natural History* 48 (3): 59–118.