

## **Exploration de la diversité et de la phylogénie des populations de vers à soie du genre *Borocera* ainsi que de l'entomofaune des forêts de Tapia, à Madagascar**

**Auteur** : Trolin, Naya

**Promoteur(s)** : Francis, Frédéric

**Faculté** : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme** : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

**Année académique** : 2023-2024

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/20928>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**Exploration de la diversité et de la phylogénie des populations de vers à soie du genre *Borocera* ainsi que de l'entomofaune des forêts de Tapia, à Madagascar**

**NAYA TROLIN**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU  
DIPLOME DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2023 - 2024**

**PROMOTEUR : Professeur Frédéric FRANCIS**  
**ENCADRANT : Docteur Andrianjaka RAVELOMANANA**  
**CO-ENCADRANT : Docteur Grégoire NOËL**

*©Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.  
Le présent document n'engage que son auteur.*

# **Exploration de la diversité et de la phylogénie des populations de vers à soie du genre *Borocera* ainsi que de l'entomofaune des forêts de Tapia, à Madagascar**



**NAYA TROLIN**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU  
DIPLÔME DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2023 - 2024**

**PROMOTEUR : Professeur Frédéric FRANCIS**

**ENCADRANT : Docteur Andrianjaka RAVELOMANANA**

**CO-ENCADRANT : Docteur Grégoire NOËL**

# Remerciements

---

Ce travail de fin d'études couronne plusieurs années de persévérance, de découvertes et d'apprentissages. Chaque cours, projets et défis ont façonné mes compétences et mon savoir-faire. Ce mémoire, fruit de ces efforts, incarne les connaissances acquises au cours de ce cursus ainsi que mon évolution personnelle et professionnelle. C'est avec une immense satisfaction et une profonde reconnaissance envers tous ceux qui m'ont accompagnée que je présente ce travail, symbole de ma progression et de mes réussites.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers mon promoteur, Frédéric Francis, dont le soutien, l'encadrement et la protection constante ont été des piliers essentiels tout au long de ma démarche. Grâce à sa confiance et à ses encouragements, j'ai eu l'opportunité extraordinaire de réaliser mon travail de fin d'études à Madagascar. Cette expérience unique a, non seulement, enrichi mes connaissances académiques et professionnelles, mais m'a également permis de vivre des moments inoubliables et de découvrir une culture fascinante. Merci pour sa disponibilité, ses avis mûrement réfléchis et sa volonté de m'ouvrir des horizons nouveaux et passionnants.

Je voudrais aussi remercier vivement Andrianjaka Ravelomanana, mon professeur encadrant à Madagascar, dont le soutien a été très important dans mon entreprise. Sa présence à mes côtés, y compris lors de nos missions sur le terrain, a grandement facilité mon travail. Sa compétence, son expérience et son assistance précieuse ont permis de surmonter de nombreux défis et d'atteindre nos objectifs avec succès. J'ai conscience de son engagement et je le remercie pour ses conseils avisés et son dévouement.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à l'équipe pédagogique sur place. Merci à Jean-Claude Rakotonirina pour ses recommandations et sa rapidité dans la gestion des documents administratifs, à Aina Andrianantoandro pour les solutions apportées à mes questions, à Heritiana Rabetsimba pour sa disponibilité et son efficacité dans le déblocage des budgets et à Vincent Razafindratsimba pour avoir rendu les choses possibles et avoir offert aux étudiants belges l'opportunité de découvrir Madagascar et sa biodiversité. Un grand merci également aux élèves malgaches, Sariaka Famonjena, Mamy Nante, Tojsoa Razakanirina, et Tia Finaritr Ravalison, pour leur accompagnement et leur encadrement, sans qui je n'aurais pu mener à bien mes missions et l'aspect logistique de ce projet.

Un merci tout particulier à mon encadrant, Grégoire Noël, pour ses conseils éclairés, sa rapidité à agir et sa patience. Ses encouragements et son soutien sans faille ont été essentiels à chaque étape de mes recherches. Je suis sensible à toute l'attention qu'il m'a portée. Disponibilité, temps et passion étaient de la partie. Je remercie de tout cœur Lallie Glacet, Emilie Bera et Kenza Dessauvages pour leur aide précieuse en laboratoire, leur temps, leur joie de vivre, et surtout, leur expertise technique. Un grand merci également à Sandra Torsin pour son efficacité et sa gentillesse dans la gestion des formalités administratives nécessaires à la réalisation de mon programme.

Je remercie également mes professeurs pour leur pédagogie et leur bienveillance tout au long de mon parcours. Leurs enseignements ont inspiré et largement contribué à l'aboutissement de ce travail de fin d'études et à mon avenir.

Enfin, un grand merci à mes parents, ma soeur, ma famille et mes amis pour leur présence et leur patience. Leur soutien moral, leurs sacrifices, leur aide et leur compréhension ont été des piliers indispensables durant ces cinq années. À toutes les personnes citées et non citées qui ont contribué à la réalisation de ce travail, je suis profondément reconnaissante. Leur soutien indéfectible a été une source constante de motivation.

# Résumé

---

Ce mémoire intitulé "*Exploration de la diversité et de la phylogénie des populations de vers à soie du genre *Borocera* ainsi que de l'entomofaune des forêts de Tapia, à Madagascar*" aborde plusieurs aspects écologiques et génétiques relatifs aux forêts de Tapia, un écosystème unique et endémique de Madagascar. Ce travail est centré sur l'étude des populations de *Borocera*, un genre de papillons endémiques important sur le plan économique et culturel à Madagascar ainsi que sur la biodiversité entomologique associée à ces forêts. Trois objectifs distincts ont été menés dans le but d'initier des relations phylogénétiques entre les populations, d'évaluer la diversité des arthropodes au sein de différents sites et de mettre en place un élevage de *Borocera cajani*. Les forêts de Tapia jouent un rôle essentiel en raison de leur biodiversité riche comprenant de nombreuses espèces endémiques. Elles sont également vitales pour les communautés locales, notamment pour l'exploitation des vers à soie dans la production artisanale. Cependant, elles sont menacées par la déforestation et les changements climatiques.

La méthodologie employée dans ce travail inclut l'utilisation de transects pour évaluer la diversité des arthropodes et des vers à soie dans différentes parties des forêts de Tapia. Le document décrit les techniques d'échantillonnage pour la collecte des spécimens ainsi que les méthodes de laboratoire pour l'analyse génétique comprenant le séquençage d'ADN utilisé pour établir la phylogénie des populations de *Borocera*. Cette analyse génétique permet de mettre en lumière une diversité inter spécifique, suggérant l'existence de plusieurs lignées au sein du genre *Borocera*, ce qui a des implications importantes pour la conservation de ces espèces. En parallèle, ce mémoire explore la biodiversité entomologique des forêts de Tapia, identifiant une multitude d'ordres d'arthropodes associées à cet habitat. Un élevage expérimental de *Borocera* a révélé des conditions essentielles à leur développement en soulignant l'importance de la qualité de l'alimentation et des conditions environnementales.

Les résultats ont dévoilé une biodiversité entomologique riche et diversifiée. Les premières missions ont montré des lacunes méthodologiques affectant la qualité des données initiales. Les ajustements méthodologiques ultérieurs ont amélioré la précision des résultats. L'analyse phylogénétique a fourni des perspectives sur les relations entre les espèces de *Borocera*. Selon l'analyse de Mantel, pour les *Borocera cajani*, le travail montre une corrélation significative entre les distances géographiques et génétiques. Les variations saisonnières et les conditions météorologiques ont également montré une influence sur la collecte des échantillons, rendant certaines périodes plus favorables à la capture d'insectes.

Le travail conclut par des réflexions sur les implications pour la conservation des forêts de Tapia. Il est conseillé d'adopter une gestion durable de ces forêts en intégrant les connaissances écologiques et génétiques acquises pour préserver leur biodiversité unique. Il est également suggéré de mettre en place des programmes de conservation spécifiques pour les populations de *Borocera*, en tenant compte de leur diversité génétique et d'intensifier les efforts pour sensibiliser les communautés locales à l'importance de préserver leur environnement naturel. L'élevage, malgré les défis rencontrés, a clarifié quelques besoins de l'espèce et suggère qu'un élevage mieux contrôlé pourrait revitaliser la sériciculture à Madagascar, ouvrant ainsi de nouvelles opportunités économiques pour les communautés locales.

En somme, ce mémoire apporte une contribution à la compréhension de la diversité et de la phylogénie des populations de vers à soie du genre *Borocera* à Madagascar, tout en soulignant l'importance de la préservation des forêts de Tapia et de leur biodiversité entomologique.

**Mots clés :** Madagascar, *Borocera*, Lasiocampidae, Tapia, *Uapaca bojeri*, phylogénie, ADN, élevage, biodiversité, entomofaune.

# Abstract

---

This thesis, titled "*Exploration of the Diversity and Phylogeny of Silk Moth Populations of the Genus Borocera and the Entomofauna of Tapia Forests in Madagascar*" addresses various ecological and genetic aspects related to Tapia forests, a unique and endemic ecosystem in Madagascar. The study focuses on the populations of *Borocera*, a genus of economically and culturally significant moths endemic to Madagascar, as well as on the associated entomological biodiversity of these forests. Three distinct objectives were pursued: initiating phylogenetic relationships between populations, assessing the diversity of arthropods across different sites, and establishing a breeding program for *Borocera cajani*. Tapia forests play a crucial role due to their rich biodiversity, including many endemic species, and are vital for local communities, particularly in the artisanal production of silk. However, these forests are threatened by deforestation and climate change.

The methodology employed in this work includes the use of transects to assess the diversity of arthropods and silk moths in different parts of Tapia forests. The thesis describes the sampling techniques for specimen collection and the laboratory methods for genetic analysis, including DNA sequencing used to establish the phylogeny of *Borocera* populations. This genetic analysis reveals species-level diversity, suggesting the existence of multiple lineages within the *Borocera* genus, which has important implications for the conservation of these species. Additionally, the thesis explores the entomological biodiversity of Tapia forests, identifying a multitude of arthropod orders associated with this habitat. An experimental breeding of *Borocera* highlighted the essential conditions for their development, emphasizing the importance of food quality and environmental conditions.

The results revealed a rich and diverse entomological biodiversity. The initial field missions revealed certain methodological gaps that affected the quality of the initial data. Subsequent methodological adjustments improved the accuracy of the results. The phylogenetic analysis provided insights into the relationships between *Borocera* species. According to the Mantel analysis, for *Borocera cajani*, the study shows a significant correlation between geographical and genetic distances. Seasonal variations and weather conditions also influenced sample collection, making certain periods more favorable for insect capture.

The thesis concludes with reflections on the implications for the conservation of Tapia forests. It is recommended to adopt sustainable management of these forests by integrating the ecological and genetic knowledge gained to preserve their unique biodiversity. It is also suggested to implement specific conservation programs for *Borocera* populations, taking into account their genetic diversity, and to intensify efforts to raise awareness among local communities about the importance of preserving their natural environment. The breeding program, despite the challenges encountered, clarified some of the species' needs and suggests that a more carefully controlled breeding process could revitalize sericulture in Madagascar, thereby opening up new economic opportunities for local communities.

In summary, this thesis contributes to the understanding of the diversity and phylogeny of *Borocera* silk moth populations in Madagascar, while highlighting the importance of preserving Tapia forests and their entomological biodiversity.

**Keywords:** Madagascar, *Borocera*, Lasiocampidae, Tapia, *Uapaca bojeri*, phylogeny, DNA, breeding, biodiversity, entomofauna.



3.1.	Technique d'échantillonnage.....	22
3.2.	Analyses génétiques .....	23
3.2.1.	Extraction de l'ADN des spécimens récoltés.....	23
3.2.2.	PCR et migration sur gel d'agarose.....	23
3.2.3.	Purification de l'ADN des échantillons en vue d'un séquençage.....	25
3.3.	Analyses statistiques .....	25
3.3.1.	Traitement des échantillons séquencés .....	25
3.3.2.	Mise en place d'arbres phylogénétiques .....	26
3.3.3.	Lien entre la distance géographique et l'espèce de <i>Borocera</i> .....	27
4.	MISE EN PLACE D'UN ÉLEVAGE DE <i>BOROCERA</i> .....	27
4.1.	Contexte de la mise en place de l'élevage .....	27
4.2.	Conditions d'élevage et matériel.....	27
4.3.	Alimentation des larves.....	29
4.4.	Surveillance et gestion des pertes.....	29
<b><u>RÉSULTATS</u></b> .....		30
1.	BIODIVERSITÉ ENTOMOLOGIQUE DES FORÊTS DE TAPIA.....	30
2.	CRÉATION D'UNE PHYLOGÉNIE DES POPULATIONS DE <i>BOROCERA</i> .....	32
2.1.	Analyses génétiques.....	32
2.2.	Analyses statistiques .....	32
2.2.1.	Phylogénie des <i>Borocera</i> .....	32
2.2.2.	Test de Mantel : lien entre la distance géographique et la distance génétique des <i>Borocera</i> .....	35
3.	FINALITÉS DE L'ÉLEVAGE DE <i>BOROCERA</i> .....	35
<b><u>DISCUSSION</u></b> .....		40
1.	ANALYSE DE LA BIODIVERSITÉ ABONDANCE ENTOMOLOGIQUE DES FORÊTS DE TAPIA .....	40
2.	PHYLOGÉNIE DES POPULATIONS DE <i>BOROCERA</i> .....	41
2.1.	Analyses génétiques .....	41
2.2.	Analyses phylogénétiques .....	42
3.	ESSAI D'UN ÉLEVAGE DE <i>BOROCERA</i> .....	43
<b><u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u></b> .....		45
<b><u>CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE</u></b> .....		46
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....		47
<b><u>WEBOGRAPHIE</u></b> .....		50
<b><u>ANNEXES</u></b> .....		52

# Table des figures

---

**Figure 1.** A. Carte des différents reliefs de Madagascar, B. Carte des différents bioclimats régionaux : 1° Perhumide chaud. 2° Perhumide tempéré. 3° Perhumide froid. 4° Humide chaud. 5° Humide tempéré. 6° Humide frais. 7° Humide froid. 8° Subhumide tempéré ou frais. 9° Subhumide chaud. 10° Semi-aride. 11° Subaride (Source : Koechlin et al., 1997).

**Figure 2.** Distribution des forêts de Tapia : Au Nord, la zone d'Imamo. Au centre, le col de Tapia et la zone d'Itremo. Au Sud-Ouest, la zone d'Isalo (Source : Rakotondrasoa et al., 2012).

**Figure 3.** A. Frondaison globulaire du Tapia, B. Écorce crevassée et robuste du Tapia, C. Troncs longs et sinueux des forêts de Tapia, D. Fruits du Tapia (Source : Trolin, 2024).

**Figure 4.** A. Chenille de *Borocera cajani* Vinson (1863), B. Cocons de soie de Landibe, C. Formation du cocon de soie, D. Lamba (écharpe en soie de Landibe), E. Rites funéraires malgaches utilisant la soie de Landibe (Source : A-D. Trolin, 2024 ; E. Voyage, 2023).

**Figure 5.** A. Chenille de *Borocera cajani* Vinson (1863), B. Chenille de *Borocera madagascariensis* Boisduval (1833), C. Chenille de *Borocera marginepunctata* Guérin-Méneville (1844) (Source : Trolin, 2024).

**Figure 6.** A. Corps d'un adulte femelle de *Borocera cajani*, B. Ailes d'un adulte femelle de *B. cajani*, C. Tête d'un adulte femelle de *B. cajani*, D. Corps (endommagé) et antennes d'un adulte mâle de *B. cajani*, E. Corps et ailes en toit d'un adulte mâle de *B. cajani* (Source : A-D. Trolin, 2024 ; E. Razafimanantsoa et al., 2012).

**Figure 7.** Carte de distribution des 6 espèces de *Borocera* créée à partir de la répartition faite par De Lajonquière, 1972 (Source : Google Earth).

**Figure 8.** Cycle de développement de *Borocera cajani* observé par Razafimanantsoa et al. (2013) à l'insectarium de Sahatsiho Ambohimanjaka, région Amoron'i Mania : \*Prolongation significative de l'incubation en raison de la diapause nymphale durant la saison sèche (Source : Razafimanantsoa, 2023).

**Figure 9.** A. Oeufs du landibe, B. Visualisation des projecteurs du landibe sur une de stade 4, C. Camouflage du landibe sur un Tapia, D. Cocons avec poils urticants, E. Nymphes de landibe présente à l'intérieur du cocon (Source : Trolin, 2024).

**Figure 10.** A. Cocons de landibe vides et sans poils urticants, B. Cocons immergés dans de l'eau bouillante pendant 2 jours, C. Filature de soie à l'aide d'eau, D. Création de pelotes de soie à partir des fils, E. Métier à tisser les fils de soie, F. Gros plan sur une écharpe (lamba) en soie de landibe (Source : Trolin, 2024).

**Figure 11.** A. Nymphes de landibe, B. Plat nommé "Soherina" comprenant du landibe (Source : Andriamahatody et al., 2024 ; Abraham Ralainony, 2021).

**Figure 12.** A. *Furcifer lateralis* Gray (1831), B. *Martin triste* (*Acridotheres tristis* Linnaeus, 1766), C. *Ophion* sp. Fabricius (1798) retrouvés dans les cocons de landibe, D. Chenille parasitée, E. Trous laissés par le *Synthesiomyia nudiseta* Van Der Wulp (1883) (Source : A. Gebüsch am Straßenrand der RN7 zwischen Ranomafana und Antsirabe, Madagascar, März 2018, Août-7-2024 ; B. *Martin triste* - *Acridotheres tristis*, Août-7-2024 ; C - E. Trolin, 2024).

**Figure 13.** A. Aperçu des zones et dates de mission : 1. Ambatofinandrahana du 6 au 12 mars 2024, 2. Arivonimamo du avril au avril 2024, 3. Parc national d'Isalo du 2 mai au 2 mai 2024 (Source : Rakotondrasoa et al., 2012), B. Aperçu global de la localisation des sites d'échantillonnage et de la distance entre eux (Source : Google Earth).

**Figure 14.** A. Site 1, Ambatomenaloha (20°30'59" S, 46°45'24" E) et site 2, Ambatomenaloha (20°31'09" S, 46°45'28" E), B. Site 3, Andrahahana (20°36'01" S, 46°45'11" E), C. Site 4, Anjoman'Ankona (20°39'57" S 47°07'24"E) et site 5, Ambohimanjaka (20°40'15"S 47°08'04"E) (Source : Google Earth).

**Figure 15.** A. Site 6, Amby (19°01'37"S 47°07'36"E), B. Site 7, Amoron'ihiritra (18°59'46"S 47°06'04"E), C. Site 8, Antanety (19°00'13"S 47°06'55"E) (Source : Google Earth).

**Figure 16.** A. Visualisation des 5 sites composant la zone d'Itremo, B. Visualisation des 3 sites composant la zone d'Imamo (Source : Google Earth).

**Figure 17.** A. Site 9, Piscine naturelle (22°33'43"S 45°22'44"E), B. Site 10, Site géologique (22°33'47"S 45°20'17"E), C. Aperçu général des 2 sites de la zone d'Isalo (Source : Google Earth).

**Figure 18.** A. Quadrats de 50m x 50m composé de 25 plots de 10m x 10m, B. Transect de 100 m de long mis en place sur les sites 1 et 6, C. Transect de 100 m de long mis en place sur les sites 2, 3 et 7 (Source : Trolin, 2024).

**Figure 19.** A. Fanions numérotés afin de délimiter les différents plots du transect, B. Repère en scotch permettant de savoir où se situe la fin d'un plot (10 m), C. Corde de 100m constituant la longueur du transect (Source : Trolin, 2024).

**Figure 20.** A. Cadre du parapluie japonais créé avec des tubes PVC et un coude métallique, B. Parapluie japonais opérationnel, C. Utilisation du parapluie japonais sur le terrain au pied d'un Tapia, D. Mise en alcool des spécimens récoltés avec le PJ (mélange d'alcool à 90% et d'eau) (Source : Trolin, 2024).

**Figure 21.** A. Pots de collecte codifiés, B. Binoculaire permettant l'identification, C. Échantillons triés par ordre, D. Spécimens venant des échantillons, E. Vision du binoculaire avant le tri des spécimens par ordre (Source : Trolin, 2024).

**Figure 22.** A. Thermocycleur quantitatif en temps réel/qPCR Bio-Rad CFX96, B. Cycle PCR appliqué aux échantillons, C. Cellule d'électrophorèse remplie de TAE (1X) et bloc d'alimentation (Source : Trolin, 2024).

**Figure 23.** Image du gel contenant les échantillons 26 et 35 à couper après la migration et coupage du morceau de gel contenant l'ADN amplifié (Source : Trolin, 2024).

**Figure 24.** A. Interface du logiciel MEGA 11 avec visualisation du fichier contenant les 31 séquences du jeu de données, B. Options de l'alignement multiple de séquences MUSCLE, C. Séquences du jeu de données alignées (Source : MEGA 11).

**Figure 25.** A. Installation de l'élevage dans le laboratoire d'entomologie, B. Visualisation de la boîte d'élevage et de sa grille en fil de fer, C. Système de pot, rempli d'eau, scotché dans les boîtes, D. Ouate rebouchant les pots pour éviter la noyade des larves (Source : Trolin, 2024).

**Figure 26.** A. Déchets enlevés des boîtes d'élevage, B. Cocons s'étant formés dans la boîte d'élevage, C. Morceaux de frigolite contenant les cocons épinglés et étiquetés, D. Incubateur de l'insectarium "Za Bibikely", E. Valeurs du thermomètre et de l'hygromètre de l'incubateur (Source : Trolin, 2024).

**Figure 27.** A. Feuilles de Tapia (Uapaca Bojeri Baill.), B. Feuilles de goyavier (Psidium guayava L.), C. Vers à soie mangeant une feuille de Tapia en avant-plan et une feuille de goyavier en arrière-plan (Source : Trolin, 2024).

**Figure 28.** Profil de la diversité globale des arthropodes dans les différents sites de la forêt de Tapia.

**Figure 29.** Comparaison de l'abondance des espèces d'arthropodes par site échantillonné, en forêt de Tapia.

**Figure 30.** Migration sur gel d'agarose réussie des échantillons 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 et d'un blanco. Les croix rouges signifient que rien n'était présent dans le puits.

**Figure 31.** Migration sur gel d'agarose montrant les échantillons 2, 7, 19, 21, 40 et 41 qui ont échoué malgré plusieurs tentatives. Les croix rouges indiquent l'absence d'échantillons dans les puits.

**Figure 32.** Arbre phylogénétique des 31 échantillons basé sur la méthode Neighbor-Joining, avec un test Bootstrap (100 réplifications, 7 threads) et un alignement MUSCLE.

**Figure 33.** Comparaison des mesures bibliographiques de poids aux cocons récoltés sur les sites 1 à 8.

**Figure 34.** Comparaison des mesures bibliographiques de longueur aux cocons récoltés sur les sites 1 à 8.

**Figure 35.** Comparaison des mesures bibliographiques de largeur aux cocons récoltés sur les sites 1 à 8.

**Figure 36.** A. Vers à soie parasité, B. Larve dure et pliée au niveau de l'abdomen, C. Larve du site 1, du 9 avril 2024, D. Larve du 21 avril du site 6, E. Larve molle et pliée à l'abdomen, F. Larves dures (Source : Trolin, 2024).

**Figure 37.** Chronogramme des activités déroulées sur 7 mois.

# Table des tableaux

---

- Tableau 1.** Répartition du nombre d'arthropodes sur les cinq sites étudiés ainsi que sur les 2 lieux de mission.
- Tableau 2.** Résultats du BLAST des 28 échantillons destinés à la création de l'arbre phylogénétique des Borocera : dix gènes COI ont été identifiés comme étant liés aux gènes COI des trois espèces de Borocera.
- Tableau 3.** Répartition et évolution des spécimens de Borocera en élevage.
- Tableau 4.** Récapitulatif des spécimens ramenés en Belgique afin d'être analysés.
- Tableau 5.** Répartition des pertes d'échantillons et leurs causes selon les sites et les dates.

# Introduction

---

## 1. MADAGASCAR

### 1.1. Situation géographique de l'île

Située dans l'Océan Indien, entre 11°57' et 25°30' de latitude Sud et entre 43°14' et 50°27' de longitude Est, l'île de Madagascar se trouve au large des côtes sud-africaines (Rakotovao et al., 2014). Il y a 165 millions d'années, celle-ci se détachait du continent africain et se voyait séparée par le Canal du Mozambique. Aujourd'hui, Madagascar est la quatrième plus grande île du monde avec une superficie d'environ 590 000 km<sup>2</sup> (Myers, 1988 ; WWF France, April-1-2024). L'île couvre une distance de 1500 km du Nord au Sud et 500 km d'Ouest en Est (Rakotofiringa, n.d.) et en raison de ses dimensions, elle présente une grande diversité de climats, d'écosystèmes naturels et de profils géologiques (Rakotovao et al., 2014).

### 1.2. Les différents reliefs et climats de Madagascar

L'île de Madagascar présente un relief très hétérogène avec peu d'endroits plats et un point culminant à 2876 mètres, situé à Tsaratanana (Koechlin et al., 1997). L'altitude du centre de l'île est souvent supérieure à 1000 mètres et constitue le plateau des Hautes Terres Centrales. Il s'étend du Nord au Sud de l'île, avec une légère déviance sur le côté Est qui s'avère plus escarpé que le côté Ouest. Quant aux régions côtières de l'Ouest, celles-ci sont beaucoup plus basses et présentent un relief moins étroit et plus étendu (**Figure 1A**). Enfin, l'extrême Sud de l'île est essentiellement constitué de dunes ( Koechlin et al., 1997 ; Rakotovao et al., 2014).

Sur l'île, 11 bioclimats régionaux ont été répertoriés par Koechlin et al. (1997) variant selon l'altitude, la latitude, la température et les précipitations de l'endroit (**Figure 1B**). La partie Nord-Ouest présente un climat tropical humide dû à la mousson estivale et à l'alizé passant par les couloirs montagneux du Nord de l'île. La côte occidentale est caractérisée par une pluviométrie annuelle située entre 200 et 1000 mm et présente entre novembre et mai. Quant à la côte orientale, elle compte une pluviométrie supérieure à 2000 mm durant toute l'année. La partie Sud est caractérisée par des températures très élevées toute l'année et une pluviométrie presque inexistante. Enfin, les Hautes Terres Centrales présentent un climat changeant en fonction des saisons et de l'altitude (Koechlin et al., 1997 ; Rakotovao et al., 2014).

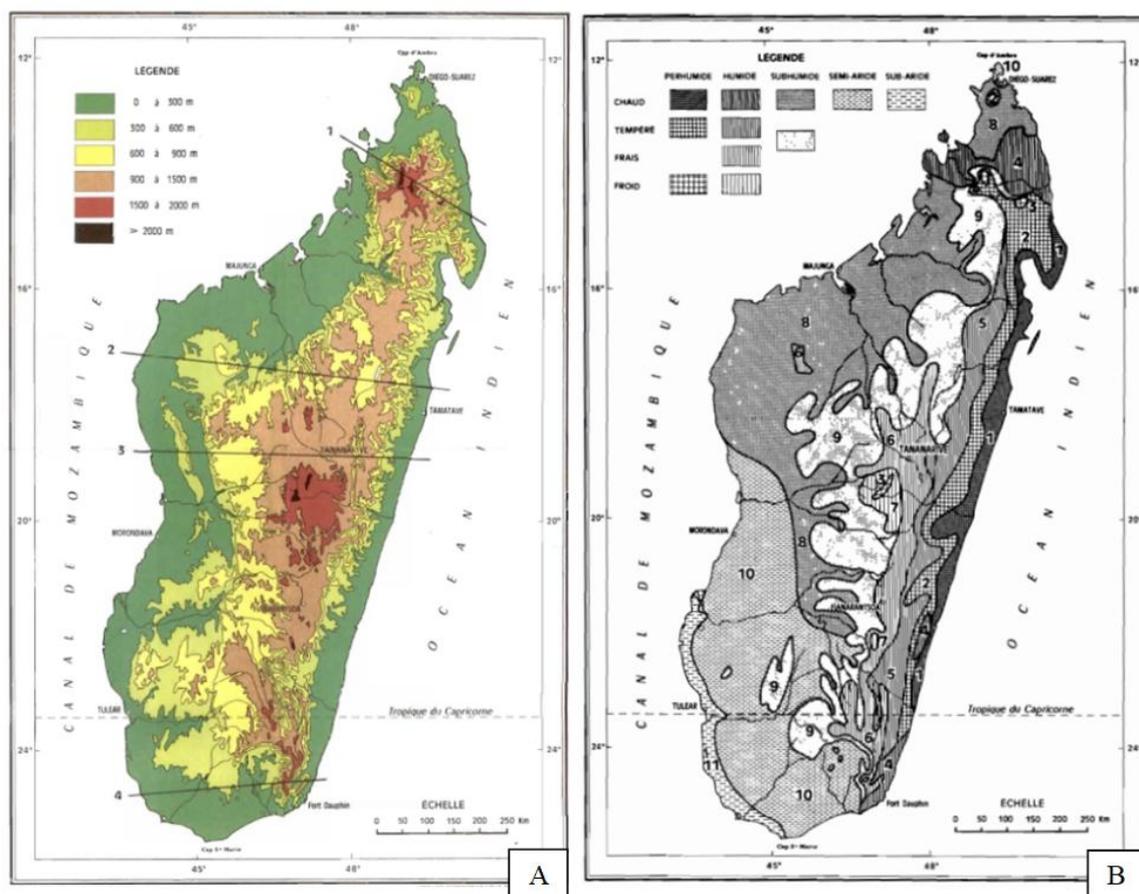


Figure 1. A. Carte des différents reliefs de Madagascar, B. Carte des différents bioclimats régionaux : 1° Perhumide chaud. 2° Perhumide tempéré. 3° Perhumide froid. 4° Humide chaud. 5° Humide tempéré. 6° Humide frais. 7° Humide froid. 8° Subhumide tempéré ou frais. 9° Subhumide chaud. 10° Semi-aride. 11° Subaride (Source : Koechlin et al., 1997).

### 1.3. Madagascar, source de biodiversité

Cet éventail d'écosystèmes et l'isolement avec le continent ont entraîné un développement fulgurant de la faune et la flore indigène de l'île. En effet, Madagascar approche les 90% d'espèces endémiques (Mittermeier et al., 2004) et représente l'un des plus importants centres de biodiversité reconnu au monde (Razafimanantsoa et al., 2012). Le niveau d'endémisme est élevé tant pour la flore que pour la faune. Tous les embranchements présentent des espèces indigènes : les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les arthropodes, etc. Par exemple, sur les 247 espèces d'amphibiens présentes sur l'île, 245 sont indigènes, soit un taux de spécificité de 99% (Vences et al., 2003 ; "Madagascar, une île fragilisée | WWF France, April-1-2024). La majorité de la faune malgache est sylvicole et vit dans les forêts naturelles de l'île. L'équilibre entre la faune et la flore est neutre car l'impact des êtres vivants sur la végétation est très limité, notamment en raison de l'absence d'animaux de grande taille (Koechlin et al., 1997).

Cependant, la superficie de ces habitats naturels ne cesse de diminuer à cause de l'action de l'homme : déforestation, feux de brousse, production de bois de chauffage, augmentation de la population, agriculture sur brûlis ou encore exploitation minière ont, quant à eux, un réel impact néfaste sur cette faune et flore malgache (Rakotondrasoa et al., 2012). Chaque année, un tiers du territoire est ravagé par les incendies, souvent volontaires, et seulement 10% des étendues boisées malgaches demeurent intactes (Koechlin et al., 1997; Rakotovo et al., 2014 ; WWF France, 1er avril 2024). Sur le plateau Mahafaly et dans les forêts du Nord, les feux de brousse sont allumés dans le but de défricher certaines zones afin de les transformer en pâturages.

Quant aux forêts de l'Est (péninsule de Masoala), elles subissent l'exploitation illégale des bois de rose et d'ébène, vendus très cher sur les marchés internationaux (Rakotovao et al., 2014 ; WWF France, 1er avril 2024).

Ce déclin entraîne la disparition d'habitats ou d'espèces endémiques comme les forêts primaires abritant des essences de bois précieuses et rares, les zones côtières du Sud (entre Tuléar et Taolagnaro) menacées par la déflation éolienne (Rakotovao et al., 2014) ou encore les forêts naturelles des hautes terres centrales. Ces formations naturelles comptent encore une exception avec les forêts de Tapia qui persèverent grâce à leur résistance au feu. Mais de nos jours, celles-ci sont aussi menacées et leur disparition aurait un impact négatif aussi bien environnemental que socio-économique (Razafimanantsoa et al., 2012).

## 2. FORMATION ENDÉMIQUE DES FORÊTS DE TAPIA

### 2.1. Conditions climatiques et géographiques

Les Forêts de Tapia sont des formations sclérophylles « socio-naturelles » monospécifiques, endémiques et de taille réduite. C'est la forêt la plus xérophyte des forêts sempervirentes de Madagascar, avec une saison sèche de cinq à sept mois (Kull et al., 2005 ; Rakotondrasoa et al., 2012). Le sol des forêts de Tapia est souvent constitué de calcaire, d'éboulis granitique, gneissique ou quartzitique. Ce type de sol est donc très rocailleux et pauvre (Koechlin et al., 1974). Cette strate arborée d'apparence clairsemée est héliophile, le soleil joue donc un rôle important dans la croissance de l'arbre (Koechlin et al., 1974).

Ces formations de Tapia se situent sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar, c'est-à-dire à une altitude allant de 800 à 1600 mètres. La température moyenne idéale se situe entre 17°C et 22°C et les précipitations annuelles peuvent être comprises entre 900 et 1500 mm par an (Gade, 1985 ; Kull et al., 2005).

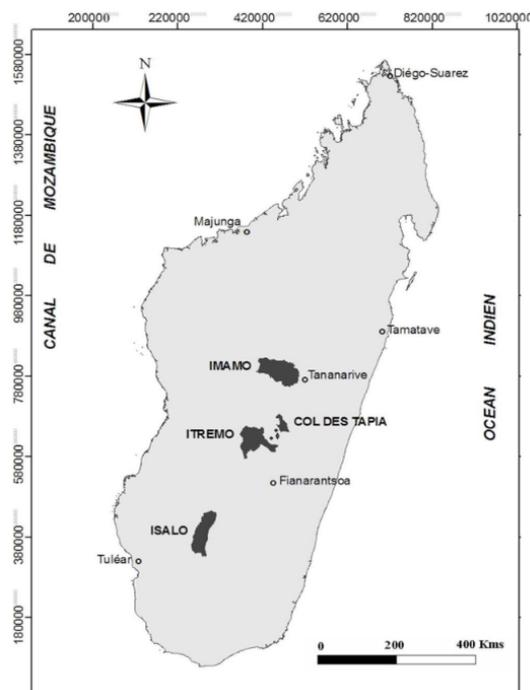


Figure 2. Distribution des forêts de Tapia : Au Nord, la zone d'Imamo. Au centre, le col de Tapia et la zone d'Itremo. Au Sud-Ouest, la zone d'Isalo (Source : Rakotondrasoa et al., 2012).

Leur distribution se divise en quatre zones (**Figure 2**). Au Nord, près de Tananarive, la **Région d’Imamo** qui englobe les districts d’Arivonimamo et de Miarinarivo. Cette zone, à la bordure Ouest des Hauts Plateaux de Madagascar, connaît une saison pluvieuse chaude et couverte, et une saison sèche confortable et dégagée. Au centre, entre Antsirabe et Ambositra, le **Col des Tapia** présentant des conditions similaires à celles d’Imamo. Ensuite, la **Zone d’Itremo**, située plus à l’Ouest et incluant le district d’Ambatofinandrahana et la chaîne d’Itremo. La saison sèche y est confortable et dégagée, mais une saison pluvieuse chaude et nuageuse. Et enfin, la **Zone d’Isalo**, au Sud-Ouest, qui regroupe le massif du même nom et située près de Ranohira. La saison pluvieuse y est humide et nuageuse et la saison sèche, chaude, venteuse et dégagée (Kull et al., 2005 ; WeatherSpark, Mars-1-2024).

## 2.2. Taxonomie et morphologie du Tapia

Le Tapia (*Uapaca bojeri* Baill.) a longtemps été classé dans la famille des Euphorbiaceae à cause de son port pachycaule, sa texture foliaire ainsi que son capitule mâle globuleux (Rakotondrasoa et al., 2012). Mais aujourd’hui, celui-ci fait partie de la famille Phyllanthaceae, l’une des cinq familles séparées des Euphorbiaceae sensu lato. Cette famille possède une grande diversité sous les tropiques (Andriamanohera et al., 2020) et le genre *Uapaca* compte, actuellement, 60 espèces entre l’Afrique et Madagascar mais 12 espèces sont endémiques de l’île (Kull et al., 2005; Andriamanohera et al., 2020).

La hauteur de l’arbre ne dépasse généralement pas 10 à 12 mètres, avec une taille courante de 3 à 5 mètres. Le Tapia présente une frondaison globulaire (**Figure 3A**). Ses feuilles, luisantes et alternes, sont en spirale serrée le long de la tige. Elles sont simples, vertes foncées sur le dessus et vertes claires en dessous, avec une nervure blanche qui s’arrête avant le sommet (Rakotondrasoa et al., 2012). L’inflorescence est dioïque, présentant à la fois des fleurs mâles et femelles.

Le tronc du Tapia peut atteindre 60 cm de diamètre et présente une écorce ligneuse et crevassée d’environ 2 cm d’épaisseur (**Figure 3B**). Il se divise rapidement en rameaux courts, et le fût est rarement longiligne (**Figure 3C**). Le Tapia produit de petits fruits juteux, sucrés, gluants, ovales et comestibles, appelés “Voapaka” en malagasy, de fin septembre à décembre. Ces drupes à mésocarpe charnu sont souvent vertes ou jaunes (**Figure 3D**). Les Malgaches ne récoltent les fruits que lorsqu’ils sont tombés de l’arbre, en raison du “Fady” qui interdit de les décrocher (Kull et al., 2005).

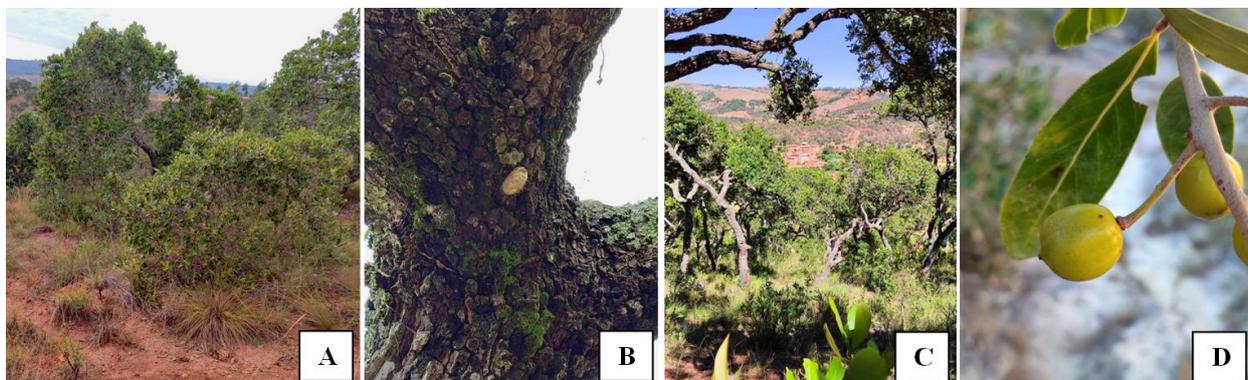


Figure 3. A. Frondaison globulaire du Tapia, B. Écorce crevassée et robuste du Tapia, C. Troncs longs et sinueux des forêts de Tapia, D. Fruits du Tapia (Source : Trolin, 2024).

### 2.3. Multifonctionnalité de la forêt de Tapia

La forêt de Tapia est essentielle pour l'écosystème malgache et l'économie locale. Chaque partie de l'arbre est utile : le tronc sert au bois de construction, l'écorce traite les pathologies intestinales et les branches fournissent du bois de chauffage (Birkinshaw et al., 2003 ; Kull et al., 2005). Près de 92 % des familles du Col de Tapia (**Figure 2**) s'approvisionnent en bois de chauffage dans cette forêt. Quant aux racines, elles stabilisent le sol et préviennent l'érosion (Birkinshaw et al., 2003). Les fruits, consommés, vendus ou transformés en boissons alcoolisées, apportent jusqu'à 7 % des revenus locaux (300 000 Ariary/an, soit environ 60 Euros). La vente des fruits permet également de financer la main-d'œuvre pour le repiquage du riz et l'achat de matériel agricole (Kull et al., 2005). Enfin, les feuilles nourrissent le ver à soie malgache, appelé **Landibe** (*Borocera cajani*, Vinson 1863), qui utilise le tronc du Tapia pour la nidification des chrysalides.

D'une manière plus étendue, la forêt de Tapia est un habitat crucial pour de nombreuses espèces. Elle permet la croissance de champignons comestibles en symbiose avec les racines de l'arbre, comme les *Cantharellus sp.* Adans. ex Fr., 1821 (holamavo) et les *Russula sp.* Pers., 1796 (holatapia, holamavokely, holabato) qui sont collectés par les familles locales pour leur consommation. La croissance très lente du Tapia est compensée par la mycorhization spécifique, qui accélère le développement de l'arbre en améliorant la microflore du sol. De plus, les formations de Tapia contribuent à la lutte contre le réchauffement climatique en séquestrant le carbone et réduisant ainsi la concentration de CO<sub>2</sub> dans l'air (Rakotondrasoa et al., 2012).

### 2.4. Difficultés rencontrées dans ces forêts

Toutefois, cette formation végétale est très menacée par la destruction humaine... Les feux de brousse, la production de bois de chauffage, la recherche de charbon de bois, l'agriculture sur brûlis ou encore l'envahissement par des espèces exotiques de reboisement mettent en danger les formations de Tapia (Rakotondrasoa et al., 2012). Chaque année, 150 000 à 200 000 hectares de forêt sont détruits. Par exemple, la forêt d'Imamo, autrefois dense, est désormais très clairsemée (Razafimanantsoa et al., 2012). La récolte des cocons de vers à soie peut également causer des dommages aux arbres. Bien que le Tapia ne soit pas classé par l'UICN, il est considéré comme "espèce en lente voie de disparition". L'expansion d'espèces comme le Pin (*Pinus sp.* L., 1753) ou encore l'Eucalyptus (*Eucalyptus sp.* L'Hér., 1789) altèrent la qualité du sol et menacent la forêt en raison de leur croissance rapide et de leur impact environnemental (Razafimanantsoa et al., 2012).

En ce qui concerne les feux de brousse, l'avis est plus mitigé : Le Tapia étant un arbre pyrophyte (Gade, 1985), il est capable de résister au feu grâce à son écorce épaisse et à ses feuilles incombustibles. Mais cette capacité ne concerne pas les jeunes pousses et les semis. Les fréquents incendies affectent donc la régénération de la forêt, laissant principalement des vieux arbres dans les formations actuelles (Birkinshaw et al., 2003). Toutefois, selon Kull et al. (2005), les caractéristiques pyrophytes du Tapia favorisent sa dominance et permettent une régénération par rejet de souche. Une forêt souvent brûlée et plus dégagée peut ainsi voir une repousse plus abondante qu'une forêt moins brûlée et plus dense. De plus, les incendies contribuent à la production de bois de chauffage et à l'apparition d'herbe fraîche pour le pâturage, fertilisant le sol pour les nouvelles pousses lors des pluies. Cependant, le défrichement incontrôlé et le manque de pare-feux sont à l'origine de ces feux. Il est donc crucial de trouver des solutions pour préserver l'écosystème tout en tenant compte des pratiques locales. L'avenir des forêts de Tapia dépendra d'une gestion équilibrée intégrant gouvernance, économie et écologie (Kull et al., 2005).

Des programmes de conservation tels que le Plan d'Action Environnemental (PAE) et la loi GELOSE (GEstion LOcale SÉcurisée) ont été mis en place afin de protéger les ressources naturelles, tout en favorisant une gestion locale et responsable. Ces initiatives décentralisent la gestion en impliquant les populations locales, ce qui renforce leur responsabilité envers la conservation. Les traditions de protection forestière, telles que l'interdiction de couper des arbres vivants et des grandes branches, soutiennent également l'écosystème (Verheggen et al., 2013). Par ailleurs, le Service des Eaux et Forêts a instauré des restrictions sur la coupe et l'usage du feu dans ces zones protégées.

### 3. LES VERS À SOIE

#### 3.1. Taxonomie et morphologie du landibe

Le **Landibe** (traduction française : la grande soie) ou *Borocera cajani* Vinson, 1863 (Lepidoptera, Lasiocampidae) représente le ver à soie le plus répandu et le plus emblématique de Madagascar (Diez et al., 2013). Cette chenille est connue pour la soie épaisse qu'elle crée durant la formation de son cocon de nymphose (Razafimanantsoa et al., 2012). Cette soie endémique représente un grand patrimoine culturel et social de l'île car cette matière est traditionnellement employée dans les rites funéraires (où un linceul de soie enveloppe les défunts) et dans la création d'articles textiles artisanaux comme des lambas (traduction française : écharpes en soie), des capes, des habits, des accessoires, etc. (**Figure 4**).



Figure 4. A. Chenille de *Borocera cajani* Vinson (1863), B. Cocons de soie de Landibe, C. Formation du cocon de soie, D. Lamba (écharpe en soie de Landibe), E. Rites funéraires malgaches utilisant la soie de Landibe (Source : A-D. Trolin, 2024 ; E. Voyage, 2023).

Le landibe est originaire de la famille des **Lasiocampidae** qui regroupe environ 2000 espèces réparties mondialement. Ces papillons, de taille moyenne à grande, ont un corps trapu et velu avec des ailes larges, généralement brun jaunâtre et parfois ornées de lignes transversales ou d'un point blanc. Ils positionnent leurs ailes en toit et ils ne possèdent pas de proboscis, car leur courte durée de vie ne leur permet pas de se nourrir (Razafimanantsoa et al., 2012). Les mâles sont reconnaissables par leurs grandes antennes pectinées (Lasiocampidae - Galerie et clés de détermination, n.d.). Cette famille se divise en trois sous-familles : les Lasiocampinae, Malacosomatinae et Gonometinae. Il est à noter que les descriptions morphologiques des sous-familles existent mais qu'aucune donnée phylogénétique, à ce stade des connaissances, n'existe.

La sous-famille des **Gonometinae** est caractérisée par la nervure huit des ailes postérieures qui se raccorde à la nervure sept à une certaine distance de sa base et crée une cellule secondaire presque aussi longue que la cellule médiane, les deux cellules ayant à peu près la même largeur (De Lajonquière, 1972). Cette sous-famille est endémique de Madagascar. Elle inclut le genre *Borocera*, découvert par Boisduval en 1833. Ce genre, le plus ancien de sa famille, comprend 6 espèces : *Borocera attenuata* Kenrick (1914), *Borocera mimus* De

Lajonquière (1972), *Borocera nigricornis* De Lajonquière (1972), *Borocera cajani* Vinson (1863), *Borocera madagascariensis* Boisduval (1833) et *Borocera marginepunctata* Guérin-Méneville (1844). Seules les 3 dernières espèces citées (**Figure 5**) seront abordées au sein de ce travail, avec une attention particulière accordée à *B. cajani*. Les *Borocera* présentent des antennes fasciculées ouvertement inégales sur le premier tiers du segment à partir de la base, un dimorphisme sexuel marqué et de petits yeux proéminents (De Lajonquière, 1972 ; Razafimanantsoa et al., 2012).

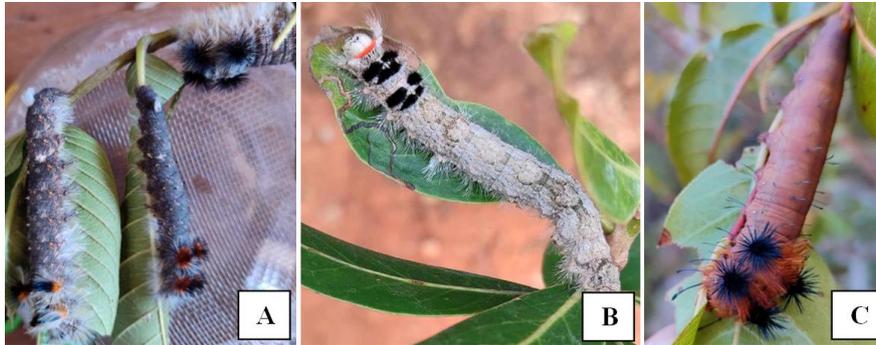


Figure 5. A. Chenille de *Borocera cajani* Vinson (1863), B. Chenille de *Borocera madagascariensis* Boisduval (1833), C. Chenille de *Borocera marginepunctata* Guérin-Méneville (1844) (Source : Trolin, 2024).

Concernant *B. cajani*, le dimorphisme sexuel se marque au niveau de la taille et, pour les imagos, il se marque aussi au niveau des couleurs mais les organes génitaux restent semblables. Le mâle mesure entre 38 et 52 mm d'envergure. Il présente des ailes sombres, brunes/rouges (**Figure 6E**), un corps épais et poilu ainsi que des antennes très développées et bipectinées (**Figure 6D**). La tête, le thorax et les pattes sont de la même couleur que l'aile antérieure. Les organes génitaux comprennent un pénis épais avec des bords dentelés et un conduit éjaculatoire proéminent. Deux valves sont situées de part et d'autre du pénis (De Lajonquière, 1972). La femelle, quant à elle, est jusqu'à 3 fois plus grande avec une envergure allant de 70 à 75 mm. Les ailes sont grises/blanches, uniformes, soyeuses et brillantes (**Figure 6B**) avec une longueur antérieure de 35 mm. Les antennes sont noires et jaunes tandis que le thorax et les pattes sont jaunes/grisâtres (**Figure 6A**). L'abdomen des femelles présente des crêtes épaisses avec des poils sensoriels. L'ouverture génitale comporte deux bourrelets superposés facilitant l'accouplement et l'oviposition (De Lajonquière, 1972).

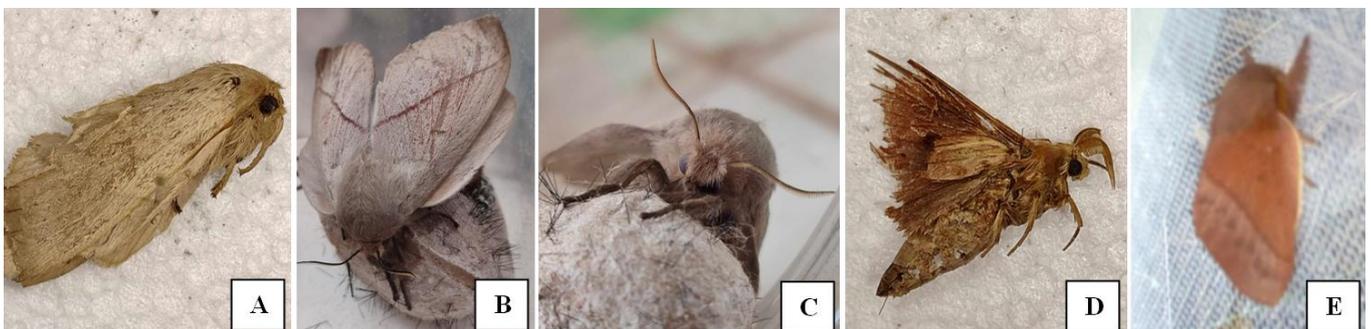


Figure 6. A. Corps d'un adulte femelle de *Borocera cajani*, B. Ailes d'un adulte femelle de *B. cajani*, C. Tête d'un adulte femelle de *B. cajani*, D. Corps (endommagé) et antennes d'un adulte mâle de *B. cajani*, E. Corps et ailes en toit d'un adulte mâle de *B. cajani* (Source : A-D. Trolin, 2024 ; E. Razafimanantsoa et al., 2012).

Bien que les populations locales connaissent les vers à soie malgaches et leur famille, il existe peu d'études, d'observations ou de photographies sur les *Borocera*. Les descriptions morphologiques des espèces existent mais aucune information phylogénétique n'est actuellement disponible à ce niveau de connaissances.

### 3.2. Répartition géographique et mode de vie de *B. cajani*

Les vers à soie *B. cajani* se trouvent à divers endroits de Madagascar, tels que Diego Suarez, Montagne d'Ambre, Nosy Be, Anjozorobe, Analavory, région d'Ankazobe, Antananarivo, Manjakatampo, massif de l'Ankarana, Ambohimahaso, massif de l'Andringitra, Bekily, Majunga, région d'Ankarafantsika, Antsingy, région d'Antsalova et Morondava (**Figure 7, couleur rouge**). Cependant, ils montrent une préférence pour les environnements entourés de forêts de Tapia des Hauts Plateaux Centraux (De Lajonquière, 1972 ; Razafimanantsoa et al., 2012). *B. madagascariensis* vit principalement sur les zones côtières de l'île (Razafimanantsoa, 2023), s'étendant de Nosy Be à Tamatave en passant par Diego Suarez (**Figure 7, couleur verte**). Quant au *B. marginepunctata*, il est présent autour de Tananarive, à Antsirabé, dans l'ouest de Madagascar avec la forêt de Lambomakandro ainsi que dans la réserve spéciale du Zombitse et à l'est avec le massif du Marojejy, la route d'Anosibe et Mananjary (**Figure 7, couleur jaune**) (De Lajonquière, 1972).

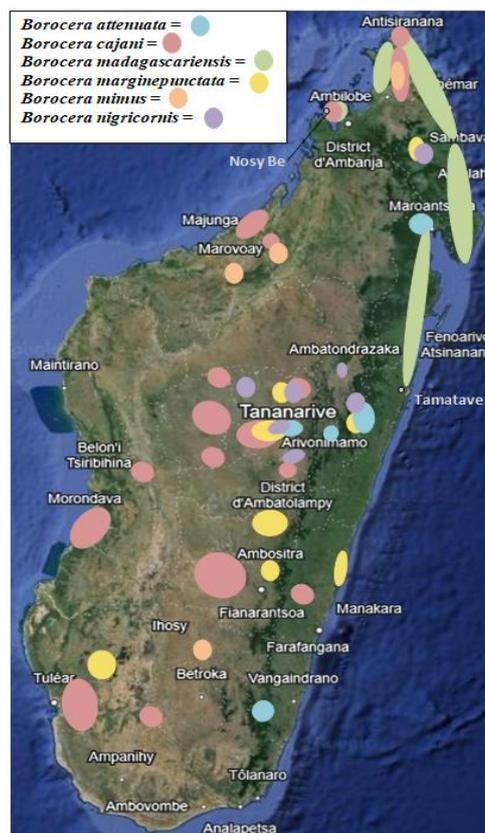


Figure 7. Carte de distribution des 6 espèces de *Borocera* créée à partir de la répartition faite par De Lajonquière, 1972 (Source : Google Earth).

*B. cajani* est un insecte à métamorphose complète (holométabole) et une espèce bivoltine, ce qui signifie qu'elle présente 2 générations par an. Cependant, les périodes varient en fonction de la situation géographique car le climat a une influence sur leur cycle (Rakotondrasoa et al., 2012). Selon Diez et al. (2013), les *B. cajani* produisent des cocons de janvier à février pour la première génération et de mai à juin, pour la deuxième. Mais Kull et al. (2005) prônent une production de cocons de novembre à décembre pour la saison des pluies et d'avril à juin pour la saison sèche. Enfin, l'expérimentation de Razafimanantsoa et al. (2013) voit éclore les œufs de janvier à mars pour la première génération et de fin avril à novembre pour la deuxième. Le cycle de vie complet de *B. cajani* varie entre 102 et 192 jours (**Figure 8**). Cette variation significative s'explique par le phénomène de diapause, un arrêt temporaire du développement survenant souvent pendant la saison sèche (Verheggen et al., 2013).

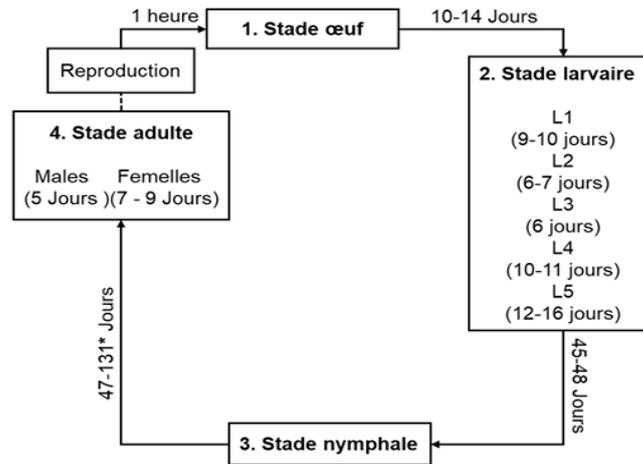


Figure 8. Cycle de développement de *Borocera cajani* observé par Razafimanantsoa et al. (2013) à l'insectarium de Sahatsiho Ambohimanjaka, région Amoron'i Mania : \*Prolongation significative de l'incubation en raison de la diapause nymphale durant la saison sèche (Source : Razafimanantsoa, 2023).

De 250 à 845 œufs sont déposés en masse sur les feuilles, les branches ou à la surface d'un tronc d'arbre (Razafimanantsoa et al., 2012). Ils sont sphériques, blancs et gris, mesurant plus ou moins 2 mm et présentant une coquille dure avec une texture granuleuse (**Figure 9A**) (Razafimanantsoa et al., 2013). Si les œufs sont fertiles, l'éclosion se déroule après 10 à 14 jours, avec un taux de réussite de 89% (Rakotondrasoa et al., 2012). Une femelle non fécondée peut pondre des œufs mais ceux-ci n'éclosent pas.

Le cycle comprend 5 stades larvaires. Le premier stade connaît la plus forte mortalité car les larves tentent de se disperser mais elles ne choisissent pas toujours la nourriture adéquate ou ne parviennent pas à l'atteindre à temps. Pourtant, il est essentiel qu'elles se nourrissent dans les 4 jours suivant leur éclosion, faute de quoi leur survie est compromise (Razafimanantsoa et al., 2012). Au deuxième stade larvaire, la larve développe 4 groupes d'épines sur son thorax (**Figure 9B**). Ces excroissances épineuses se développent simultanément avec la larve et sont déployées lorsqu'elle est alarmée ou en situation de défense. Ces 4 projecteurs sont pourvus de poils urticants qui démangent et piquent ceux qui s'y frottent (Razafimanantsoa et al., 2012). Ceux-ci sont souvent rouges et noirs, oranges et noirs, voire entièrement noirs. Le cinquième stade larvaire présente des larves entre 7 et 12 cm. La larve est très velue sur sa face latérale, et présente une coloration de plus en plus claire afin de se camoufler sur les branches (**Figure 9C**) (Razafimanantsoa, 2023).

Quant au stade chrysalide, durant entre 47 et 131 jours (**Figure 8**), il est marqué par une différence entre les cocons mâles et femelles. Le cocon femelle mesure 5 cm de long sur 3 cm de large et pèse 300 à 400 mg tandis que le cocon mâle pèse 90 à 200 mg et mesure 4 cm sur 2,5 cm (Kull et al., 2005). Les cocons présentent 3 couches de soie superposées et entourées de poils urticants venant des 4 projecteurs présents sur la larve. A l'intérieur, la nymphe présente une surface lisse et une couleur brune foncée (**Figure 9D et E**).

Le stade adulte, qui dure seulement de 5 à 9 jours, commence avec l'émergence des adultes entre 14 et 18 heures. Ensuite, la femelle attire le mâle avec des phéromones sexuelles. La copulation se déroule habituellement entre 13 et 17 heures et peut durer jusqu'à une heure. Chaque mâle peut s'accoupler avec 3 femelles maximum (Razafimanantsoa et al., 2012). Les œufs sont pondus, le même jour à partir de 19 heures et il est également possible d'obtenir une ponte en captivité même en l'absence des plantes hôtes nécessaires.

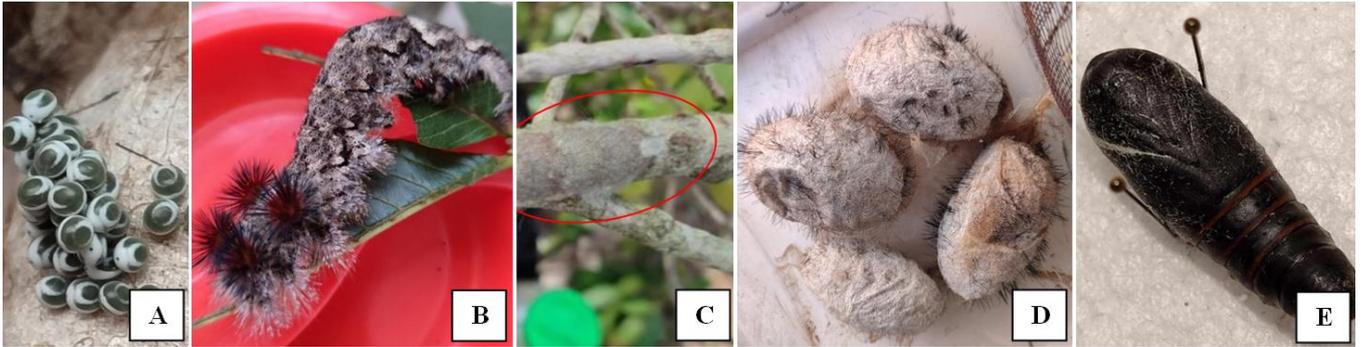


Figure 9. A. Oeufs du landibe, B. Visualisation des projecteurs du landibe sur une de stade 4, C. Camouflage du landibe sur un *Tapia*, D. Cocons avec poils urticants, E. Nymphe de landibe présente à l'intérieur du cocon (Source : Trolin, 2024).

Concernant la nourriture, la chenille est polyphage mais le feuillage du *Uapaca bojeri* Baill., 1858 (*Tapia*) constitue sa principale source de nourriture, lui procure une meilleure croissance (Haubruge et al., 2013) et une taille de cocons plus grande. Le landibe peut, aussi, se nourrir d'autres plantes appartenant à différentes familles comme l'*Aphloia theiformis* (Vahl) Benn (Aphloiaceae), le *Psidium guayava* L. (Myrtaceae), l'*Eucalyptus* spp. (Myrtaceae), la *Maesa lanceolata* Forssk. (Primulaceae), le *Dodonaea madagascariensis* Radlk. (Sapindaceae), la *Schizolaena microphylla* Perrier (Sarcolaenaceae), le *Cajanus indicus* Spreng. (Fabaceae) et le *Sarcolaena oblongifolia* Gérard (Sarcolaenaceae). Le goyavier (*Psidium guayava* L.) et l'eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) sont des arbres exotiques très appréciés par les chenilles (Razafimanantsoa et al., 2013) ; l'Ambrevade (*Cajanus indicus* Spreng.) et le Tsitoavina (*Dodonaea madagascariensis* Radlk.) sont des plantes de culture faciles et rapides. Quant à l'adulte de *B. cajani*, dépourvu de proboscis, il ne se nourrit pas (De Lajonquière, 1972 ; Razafimanantsoa et al., 2012).

### 3.3. Fonctions du landibe

#### 3.3.1. Utilisation séricicole

La filière de la soie à Madagascar est particulièrement reconnue pour son importance culturelle. Ce matériau précieux est utilisé pour fabriquer des tissus funéraires, essentiels lors des rituels tels que les enterrements malgaches, les exhumations ou "Famadihana", tradition malgache consistant à renouveler le linceul des défunts tous les 5 à 10 ans. La soie sert également à confectionner des vêtements de luxe portés par les rois, les nobles et les personnes aisées, ainsi que des écharpes, des habits et autres accessoires. La soie étant rare et précieuse, elle se vend à des prix qui varient de 125 000 à 650 000 Ariary (25 à 71 euros).

Cette soie est renommée pour sa robustesse, son élasticité et sa solidité, surpassant celle du *Bombyx mori* Linnaeus, 1758. Cependant, la soie du *B. mori* est produite en plus grande quantité, est plus facile à élever et moins coûteuse. Les efforts pour développer le marché de la soie de landibe sont limités par la rentabilité de la soie du *B. mori*, réduisant ainsi la soie de landibe au tissage des lambas traditionnels. Toutefois, elle est toujours prisée pour sa résistance et est vendue dans quelques boutiques touristiques à Ambositra, Ambatofinandrahana et Ambalavao (De Lajonquière, 1972 ; Kull et al., 2005).

La filière de la soie, dominée par les femmes, est une importante source de revenus pour les villageois vivant près des forêts de *Tapia*. Les femmes récoltent les cocons, les vendent aux intermédiaires et ces derniers les transforment en produits artisanaux. Ce système crée de nombreux emplois et permet, par exemple, aux familles situées près des forêts d'Ambatofinandrahana, de gagner jusqu'à 800 000 Ariary par an (environ 160 euros) en vendant des cocons (Kull et al., 2005).

Pour obtenir de la soie de landibe, les cocons subissent plusieurs étapes. Les poils urticants et les nymphes sont d'abord retirés (**Figure 10A**), puis les cocons sont cuits avec du savon pendant deux jours (**Figure 10B**). La masse obtenue est ensuite lavée, séchée et divisée en portions pour former des fils (**Figure 10C**). La filature prend environ 90 heures pour produire un linceul, nécessitant 4000 cocons, soit 1,5 kilos (Kull et al., 2005 ; Razafimanantsoa et al., 2012 ; Diez et al., 2013). Ensuite, les fils sont mis en pelote en attendant d'être tissés (**Figure 10D**). Le tissage est la dernière étape avant la confection d'un vêtement en soie de landibe. C'est une phase délicate qui exige du temps et de la précision (**Figure 10E**). En général, les tisseuses déplorent le manque de fonds du secteur, ce qui les pousse à travailler comme employées. Cependant, plus de 10 000 familles dépendent encore de l'industrie de la soie.



Figure 10. A. Cocons de landibe vides et sans poils urticants, B. Cocons immergés dans de l'eau bouillante pendant 2 jours, C. Filature de soie à l'aide d'eau, D. Création de pelotes de soie à partir des fils, E. Métier à tisser les fils de soie, F. Gros plan sur une écharpe (lamba) en soie de landibe (Source : Trolin, 2024).

### 3.3.2. Utilisation entomophagique

En plus de permettre l'utilisation du cocon pour la soie, la nymphe est comestible et considérée comme un mets de luxe en raison de sa rareté. Elle peut être bouillie, sautée, séchée ou moulue en poudre riche en calcium (**Figure 11A**). Appréciée en brousse pour sa valeur nutritive, elle est souvent consommée en snack ou avec du poulet et du riz (Salazar, 2020), bien que ce mets reste méconnu des citadins (Barsics et al., 2013 ; Razafimanantsoa et al., 2012). Des efforts sont en cours pour sensibiliser la population malgache à cette ressource alimentaire précieuse et assurer sa durabilité (Andriamahatody et al., 2024). Actuellement, un projet vise à repeupler la forêt d'Ambatofinandrahana et à valoriser les chrysalides sur le plan alimentaire, notamment par le développement de techniques de conservation et la création de recettes (**Figure 11B**) adaptées aux habitudes locales (Andriamahatody et al., 2024).



Figure 11. A. Nymphes de landibe, B. Plat nommé "Soherina" comprenant du landibe (Source : Andriamahatody et al., 2024 ; Abraham Ralainony, 2021).

### 3.4. Difficultés rencontrées

#### 3.4.1. Diminution de la densité naturelle de l'espèce

La diminution de la densité naturelle des vers à soie malgaches est préoccupante et résulte de plusieurs facteurs. La déforestation joue un rôle majeur dans cette diminution car la destruction de leur habitat naturel réduit considérablement leur environnement viable (Razafimanantsoa et al., 2012 ; Diez et al., 2013). Les populations de vers à soie peuvent se retrouver fragmentées, diminuant ainsi le flux génétique essentiel pour maintenir leur diversité. Cette fragmentation augmente le risque de consanguinité.

De plus, la réduction de la diversité végétale dans les forêts de *Tapia* limite leurs sources de nourriture, affectant leur survie. Les feux de brousse, bien que nuisibles à leur habitat, peuvent parfois favoriser la production de vers à soie en réduisant certains parasites (fourmis, ...) et en stimulant la croissance de nouvelles pousses de *Tapia*, particulièrement appréciées par les chenilles de landibe (Kull et al., 2005).

Enfin, la surexploitation des chrysalides pour la consommation alimentaire et le changement climatique perturbent également leur cycle de vie, contribuant à la baisse de leur population.

#### 3.4.2. Prédateurs et maladies du ver à soie

Le landibe subit diverses pressions sélectives, notamment de la part des prédateurs, des maladies et des conditions climatiques. Ces pressions peuvent entraîner l'évolution de traits spécifiques au sein des populations. Les adaptations locales, développées en réponse à ces conditions environnementales, peuvent être analysées à travers des études de génétique des populations.

Le reptile *Furcifer lateralis* Gray (1831) (**Figure 12A**), les oiseaux tels que le Martin triste (*Acridotheres tristis* Linnaeus, 1766) (**Figure 12B**), le Coucou de Madagascar (*Cuculus rochii* Hartlaub, 1863), le Coucal toulou (*Centropus toulou* Statius Müller, 1776), le Corbeau Pie (*Corvus albus* Statius Müller, 1776), le Bulbul de Madagascar (*Hypsipetes madagascariensis* Statius Müller, 1776) ou encore les chauves-souris (Razafimanantsoa et al., 2012) font partie de ses prédateurs. Au niveau des insectes, les mantes religieuses, fourmis, araignées et grillons sont friands des chenilles de vers à soie.

Quant aux parasitoïdes, des familles faisant partie de l'ordre des Hyménoptères peuvent être citées. Les Ichneumonidae piquent la chenille pour pondre à l'intérieur de celle-ci. L'hôte poursuit sa croissance tandis que l'œuf se développe et c'est au moment où la chenille tisse son cocon que le parasite entame sa nymphose, provoquant la mort de la chenille (*Pimpla* sp. Fabricius (1804), *Xanthopimpla hova* Saussure (1892), *Brachymeria* sp. Westwood (1829), *Ophion* sp. Fabricius (1798)) (**Figure 12C**). Dans ce type de cas, la chrysalide est blanche à l'intérieur du cocon. Les Braconidae se développent à l'intérieur de la chenille, puis de nombreux petits cocons jaunes de Braconidae émergent de la chenille, ce qui entraîne sa mort (*Apanteles* sp. Granger, 1949). Enfin, un diptère de la famille des Tachinidae (*Synthesiomyia nudiseta* Van Der Wulp, 1883) pique le cocon du landibe et y laisse des petits trous dans la coque (**Figure 12E**) (Razafimanantsoa et al., 2012 ; Diez et al., 2013).

Des maladies fongiques affectent le landibe : la pébrine, la muscardine et la flacherie peuvent être mentionnées (Diez et al., 2013 ; Larousse, Août-7-2024 ; Razafimanantsoa et al., 2012). La pébrine, une maladie héréditaire transmise par un sporozoaire, se manifeste par des tâches noires sur l'épiderme et une irrégularité dans la taille des vers. La muscardine, causée par un champignon, envahit les tissus du ver et produit des conidies à la

surface de la peau. Enfin, la flacherie affaiblit et immobilise la chenille avant de la faire mourir et noircir. Il n'existe pas de photographies pour illustrer ces maladies.

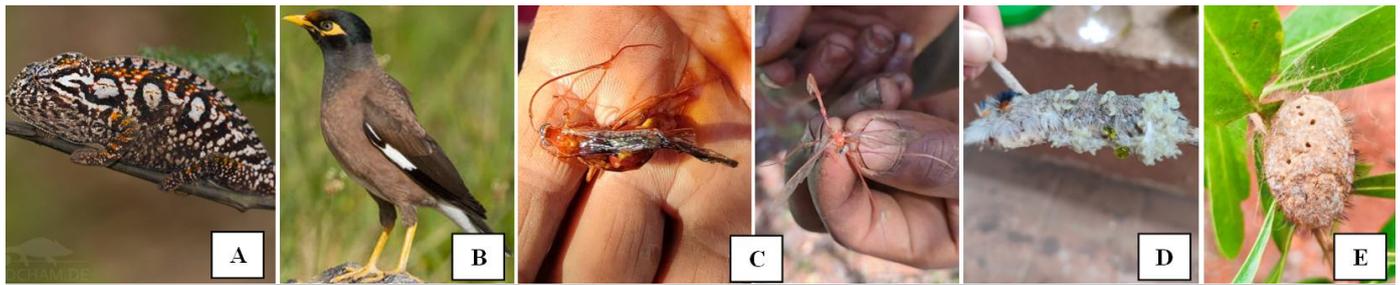


Figure 12. A. *Furcifer lateralis* Gray (1831), B. *Martin triste* (*Acridotheres tristis* Linnaeus, 1766), C. *Ophion* sp. Fabricius (1798) retrouvés dans les cocons de landibe, D. Chenille parasitée, E. Trous laissés par le *Synthesiomysia nudiseta* Van Der Wulp (1883) (Source : A. Gebüsch am Straßenrand der RN7 zwischen Ranomafana und Antsirabe, Madagascar, März 2018, Août-7-2024 ; B. *Martin triste* - *Acridotheres tristis*, Août-7-2024 ; C - E. Trolin, 2024).

### 3.4.3. Manque de débouchés

L'industrie de la soie malgache se retrouve aujourd'hui confrontée à une crise profonde, accentuée par un manque de débouchés. L'absence de modernisation de la filière, de financements adéquats pour son développement et de stratégies efficaces pour valoriser ses produits face à la compétition de la soie de *B. mori* contribue à son inévitable déclin. Cette situation entraîne un abandon progressif de cette tradition séculaire, menaçant sa survie à long terme, la préservation instinctive de l'espèce liée à sa valeur marchande et son habitat naturel. Comme le soulignent Diez et al. (2013), les villageois, autrefois maîtres dans l'art de la sériciculture, se voient contraints de délaisser cette activité ancestrale au profit de l'agriculture. Cette transition reflète non seulement un choix économique mais aussi une adaptation aux réalités d'un marché de la soie malgache de plus en plus précaire et compétitif.

## 3.5. Pistes de solutions

### 3.5.1. Compréhension de l'espèce et de son évolution

Comprendre l'évolution d'une espèce est essentiel pour plusieurs raisons. Cela permet de mettre en place des stratégies de conservation adaptées aux besoins écologiques spécifiques de l'espèce et d'anticiper les impacts des changements environnementaux, tels que le changement climatique. En préservant la biodiversité et les fonctions écologiques, on protège les relations entre les espèces et leurs habitats. Cette connaissance aide également à comprendre les mécanismes biologiques, comme les adaptations et les stratégies de survie.

La phylogénie, en particulier, joue un rôle crucial dans ce processus. Elle déchiffre les relations évolutives entre les espèces et permet d'affiner les stratégies de conservation tout en ciblant efficacement les efforts pour maintenir la biodiversité. En identifiant les espèces et en explorant leur diversité génétique, la phylogénie contribue à comprendre les adaptations spécifiques et les interactions écologiques. De plus, elle enrichit la recherche médicale et biologique en fournissant des informations précieuses pour les avancées en biomédecine et en biotechnologie (Phylogénie, Février-28-2024). Enfin, la phylogénie éclaire les études écologiques en améliorant la compréhension des interactions entre les espèces, telles que les relations prédateur-proie et les compétitions. En somme, la connaissance de l'évolution et de la phylogénie d'une espèce est indispensable pour protéger les écosystèmes, comprendre les processus naturels, et sensibiliser le public à la conservation.

Une analyse de la phylogénie du genre *Borocera* pourrait donc aider à comprendre les relations de parenté entre les taxons et l'évolution de ces relations (Phylogénie, Février-28-2024). L'établissement d'arbres phylogénétiques de *Borocera* permettrait de suivre le cours de l'évolution de l'espèce et de savoir comment celle-ci s'est adaptée aux différents changements présents au cours de sa vie (climat, environnement, migration, etc.). De nouvelles espèces pourraient apparaître et expliquer une certaine adaptation à une niche environnementale particulière qu'elle a colonisée (Radiation adaptative, Février-28-2024).

L'élevage et l'exploitation des vers à soie par l'homme peuvent influencer la structure génétique des populations, notamment à travers la sélection pour des traits spécifiques comme la production de soie, ce qui peut réduire la diversité. En outre, la déforestation et l'agriculture intensive menacent les habitats naturels des vers à soie, réduisant leur taille et leur connectivité, et impactant directement leur génétique.

La diversité génétique joue donc un rôle crucial dans la résilience des populations face aux changements environnementaux et aux maladies. Une population génétiquement diversifiée présente une meilleure capacité d'adaptation aux défis environnementaux, ce qui favorise sa survie à long terme. Les scientifiques utilisent des marqueurs génétiques, tels que les microsatellites ou l'ADN mitochondrial, pour évaluer la variation au sein et entre les populations de vers à soie. En somme, l'étude de la génétique des populations de vers à soie est essentielle pour comprendre leur dynamique évolutive, orienter les stratégies de conservation, et assurer leur survie à long terme, particulièrement dans des environnements menacés comme Madagascar.

### 3.5.2. Mesures pour la conservation de l'habitat naturel et la préservation du landibe

Divers efforts de conservation sont actuellement déployés. Des programmes de repeuplement sont en cours pour restaurer les populations de vers à soie dans les zones dégradées. La sélection des individus pour ces programmes repose sur leur diversité génétique afin de prévenir la perte de cette diversité. De plus, la création de banques de gènes, qui conservent des échantillons génétiques, permet de préserver cette diversité pour les générations futures.

La protection des habitats est également primordiale, avec la mise en place de réserves naturelles et la promotion d'une gestion durable des forêts de Tapia. L'arrêt permanent des feux de brousse, de l'exploitation forestière, le reboisement de *Uapaca bojeri* qui maintient leur capacité à stocker le carbone et l'élimination des plantes introduites (telles que le pin ou l'eucalyptus) dans la forêt de Tapia sont des actions très importantes pour le maintien des habitats naturels de *B. cajani* (Razafimanantsoa et al., 2013).

Éviter de casser les branches de Tapia lors de la récolte et choisir judicieusement les moments de collecte pour garantir la pérennité de la génération suivante sont des gestes simples mais essentiels pour la conservation. Par ailleurs, sensibiliser et éduquer les communautés locales, ainsi que les enfants, est fondamental pour améliorer les conditions de vie du ver à soie et préserver le patrimoine culturel malgache. De plus, bien que la collecte des cocons vides n'ait aucun impact sur le landibe, la récolte des cocons contenant des parasitoïdes peut être bénéfique car elle aide à réguler les populations de parasites et ainsi favoriser la population de landibe (Diez et al., 2013).

### 3.5.3. Élevage des vers à soie

Créer des élevages de landibe, à petite ou grande échelle, en respectant toutes les conditions optimales à l'espèce, constituent une piste de repeuplement pour le *B. cajani*. Cela ne fonctionnera pas si le mode de vie, les conditions changeantes ou les facteurs externes à la vie du landibe ne sont pas connus. Des paramètres

comme la température, l'humidité, le temps resté en cage, la taille de la cage, la nourriture à appliquer sont des paramètres à définir et à maîtriser (Razafimanantsoa, 2023).

Des élevages antérieurs et essais de repopulation ont révélé plusieurs points cruciaux à considérer : ces chenilles demandent beaucoup de nourriture et d'espace pour être facilement domestiquées. Au prix de grands efforts, il est possible de les élever en boîte mais elles se développent mieux en forêt (Razafimanantsoa et al., 2012). De plus, les chenilles auraient besoin de migrer pour se développer correctement et leur confinement peut nuire à leur croissance. Des conditions de température et d'humidité inappropriées dans un environnement fermé pourraient également entraver le développement optimal du landibe. Des conditions climatiques, telles que la pluie et le vent, sont connues pour provoquer la mort des chrysalides et affecter les jeunes larves, les rendant vulnérables aux chutes (Razafimanantsoa et al., 2020). Cependant, les données concrètes pour confirmer ces observations sont encore insuffisantes (Diez et al., 2013). Il est donc essentiel de poursuivre les recherches pour approfondir ces aspects.

La mise en place de cet élevage pourrait également inverser la tendance dans le domaine de la sériciculture. Il est essentiel d'investir dans la modernisation des techniques de production, de mobiliser des ressources financières significatives et de promouvoir les atouts uniques de cette soie sur les marchés internationaux. En recréant un environnement propice à la sériciculture à Madagascar et en maîtrisant l'élevage des vers à soie, il serait possible de revitaliser une industrie en déclin, de créer des opportunités économiques durables pour les communautés rurales, et de préserver un patrimoine précieux pour les générations futures.

# Contexte et objectifs de l'étude

---

Ce travail de fin d'études s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'ONG Za Bibikely (présente au sein d'Havoana Land et de son insectarium), la mention Entomologie Culture Élevage et Santé ( E-CES) du Département d'Entomologie de l'Université d'Antananarivo ainsi que la faculté de Gembloux Agro-Bio Tech de l'Université de Liège.

Dans un souci de pérenniser l'espèce, de la conserver et d'approfondir nos connaissances sur son évolution, ce travail a pour objectif principal d'évaluer la répartition des populations de *Borocera* sur différents sites et établir les relations phylogénétiques entre les espèces distinctes. Contribuer à comprendre la structure de ces populations aiderait à renforcer les efforts de conservation et de préservation de l'habitat naturel de ces espèces endémiques.

Deux objectifs secondaires complètent cet axe principal. Le premier objectif secondaire consiste à mettre en place un essai d'élevage de *Borocera* en conditions semi-contrôlées. Cet essai a pour but d'observer le développement du ver à soie et d'explorer les méthodes d'élevage possibles en vue de son repeuplement.

Dans le cadre de la gestion durable des forêts de Tapia, un second objectif secondaire vise à avoir une vue d'ensemble de la biodiversité entomologique de ces forêts afin de les valoriser et d'en comprendre les dynamiques.

En résumé, ce travail s'articule autour de 3 axes :

- **O1** : Initier une phylogénie des populations de vers à soie du genre *Borocera* par approche moléculaire suite à des collectes multisites.
- **O2** : Mise en place d'un élevage et observation du développement des vers à soie.
- **O3** : Étudier la biodiversité entomologique et son abondance dans les forêts de Tapia.

# Matériel et méthodes

## 1. LOCALISATION ET DESCRIPTION DES SITES ÉCHANTILLONNÉS

Parmi les cinq zones présentant des forêts de *Tapia* (Figure 2), trois d'entre elles ont été sélectionnées comme lieu d'échantillonnage. Ce choix a été opéré en fonction de la logistique, la distance et la sécurité des différents lieux (Figure 13A). Au sein des trois zones, 10 sites ont été choisis et échantillonnés (Figure 13B). Les zones d'Imamo et d'Itremo sont distantes d'environ 170 kilomètres à vol d'oiseau tandis que celles d'Itremo et d'Isalo sont éloignées de plus ou moins 267 kilomètres. Enfin, environ 435 kilomètres séparent les zones d'Imamo et d'Isalo (voir lignes jaunes, Figure 13B).

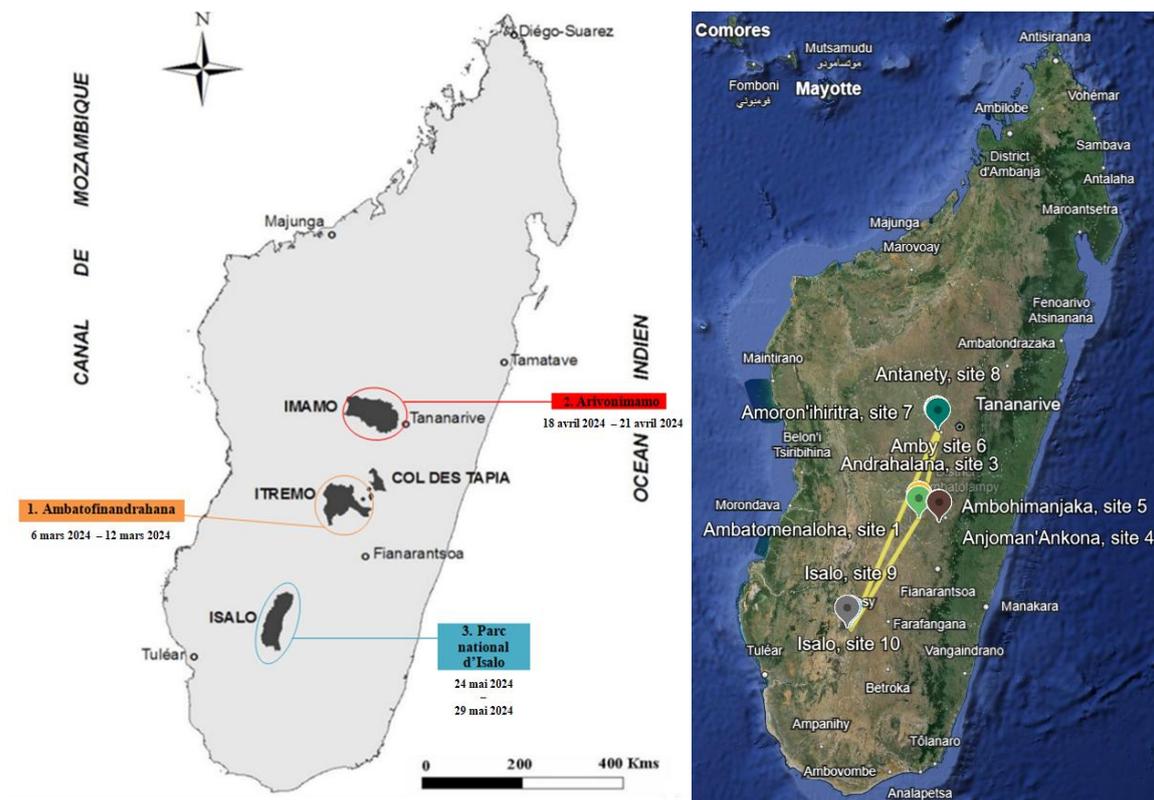


Figure 13. A. Aperçu des zones et dates de mission : 1. Ambatofinandrahana du 6 au 12 mars 2024, 2. Arivonimamo du 18 avril au 21 avril 2024, 3. Parc national d'Isalo du 24 mai au 29 mai 2024 (Source : Rakotondrasoa et al., 2012), B. Aperçu global de la localisation des sites d'échantillonnage et de la distance entre eux (Source : Google Earth).

### 1.1. Zone d'Itremo

La zone d'Itremo se trouve dans le district d'Ambatofinandrahana (20°33'07" S, 46°48'11" E), situé dans le centre de Madagascar, dans la région d'Amon'ri Mania. La région connaît des variations de température entre 9°C et 30°C. La saison sèche est confortable et dégagée tandis que la saison pluvieuse est chaude et nuageuse. La période la plus pluvieuse se concentre en janvier, comme indiqué dans les données météorologiques de Weatherspark (mars 2024). Un projet lié au ver à soie et financé par l'ARES, le Centre de Recherches sur l'Environnement (CRNE), l'Université de Liège et l'Université d'Antananarivo est déjà en cours dans la forêt de *Tapia*. Pour des raisons de logistique et de coût, quelques sites sélectionnés pour ce projet ont été repris

pour ce travail et constituent les 3 premiers sites (**Figure 14A et B**) : le site 1 d'Ambatomenaloha ( $20^{\circ}30'59''$  S,  $46^{\circ}45'24''$  E) échantillonné le 9 mars 2024, le site 2 d'Ambatomenaloha ( $20^{\circ}31'09''$  S,  $46^{\circ}45'28''$  E) réalisé le 10 mars et le site 3 d'Andrahalana ( $20^{\circ}36'01''$  S,  $46^{\circ}45'11''$  E) effectué le 11 mars 2024. Les deux derniers sites ont été sélectionnés en raison de leur proximité avec la route et leur emplacement dans une forêt de Tapia (**Figure 14C**). Leur objectif est de diversifier le matériel génétique récolté pour étudier la phylogénie des *Borocera*.

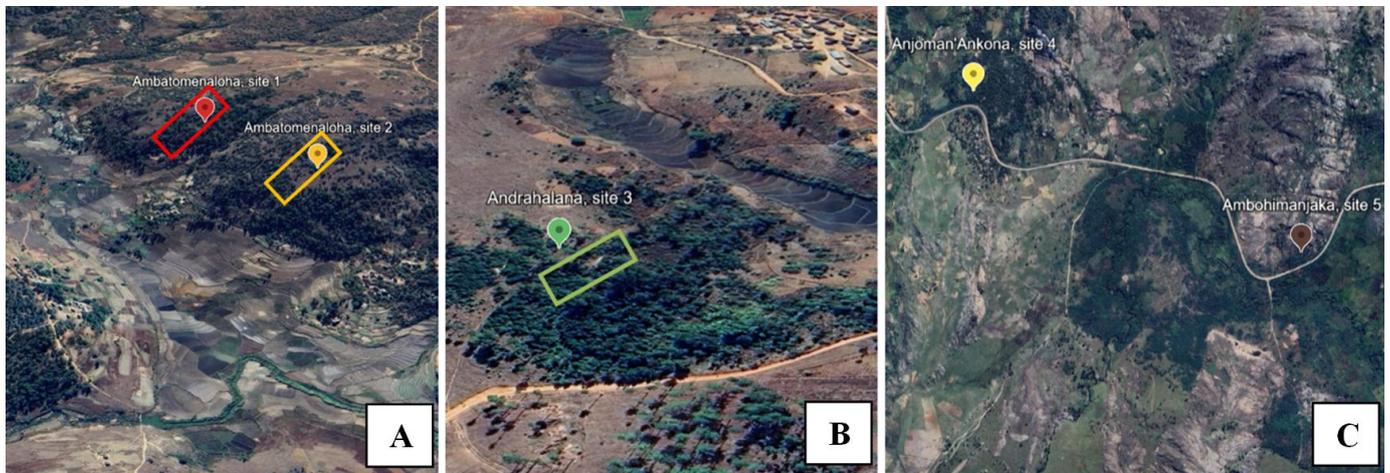


Figure 14. A. Site 1, Ambatomenaloha ( $20^{\circ}30'59''$  S,  $46^{\circ}45'24''$  E) et site 2, Ambatomenaloha ( $20^{\circ}31'09''$  S,  $46^{\circ}45'28''$  E), B. Site 3, Andrahalana ( $20^{\circ}36'01''$  S,  $46^{\circ}45'11''$  E), C. Site 4, Anjoman'Ankona ( $20^{\circ}39'57''$  S  $47^{\circ}07'24''$  E) et site 5, Ambohimanjaka ( $20^{\circ}40'15''$  S  $47^{\circ}08'04''$  E) (Source : Google Earth).

## 1.2. Zone d'Imamo

La zone d'Imamo est localisée dans le district d'Arivonimamo ( $19^{\circ}00'24''$  S,  $47^{\circ}13'59''$  E), situé dans le centre de Madagascar, dans la région d'Itasy. Un projet lié aux populations de fourmis a été mené dans cette zone. Pour des raisons de facilité et de budget, 2 sites sélectionnés pour ce projet ont été repris et échantillonnés pour ce travail de fin d'étude : le site 6 d'Amby ( $19^{\circ}01'37''$  S  $47^{\circ}07'36''$  E) échantillonné le 18 et 19 avril 2024 et le site 7 d'Amoron'irihitra ( $18^{\circ}59'46''$  S  $47^{\circ}06'04''$  E) effectué le 20 et 21 avril 2024 (**Figure 15A et B**). Les conditions météorologiques sont similaires à celles d'Ambatofinandrahana. Le site 8 d'Antanety ( $19^{\circ}00'13''$  S  $47^{\circ}06'55''$  E), situé dans une forêt de Tapia proche de la route, a été choisi afin de diversifier le matériel génétique de la zone d'Imamo (**Figure 15C**).



Figure 15. A. Site 6, Amby ( $19^{\circ}01'37''S$   $47^{\circ}07'36''E$ ), B. Site 7, Amoron'ihiritra ( $18^{\circ}59'46''S$   $47^{\circ}06'04''E$ ), C. Site 8, Antanety ( $19^{\circ}00'13''S$   $47^{\circ}06'55''E$ ) (Source : Google Earth).

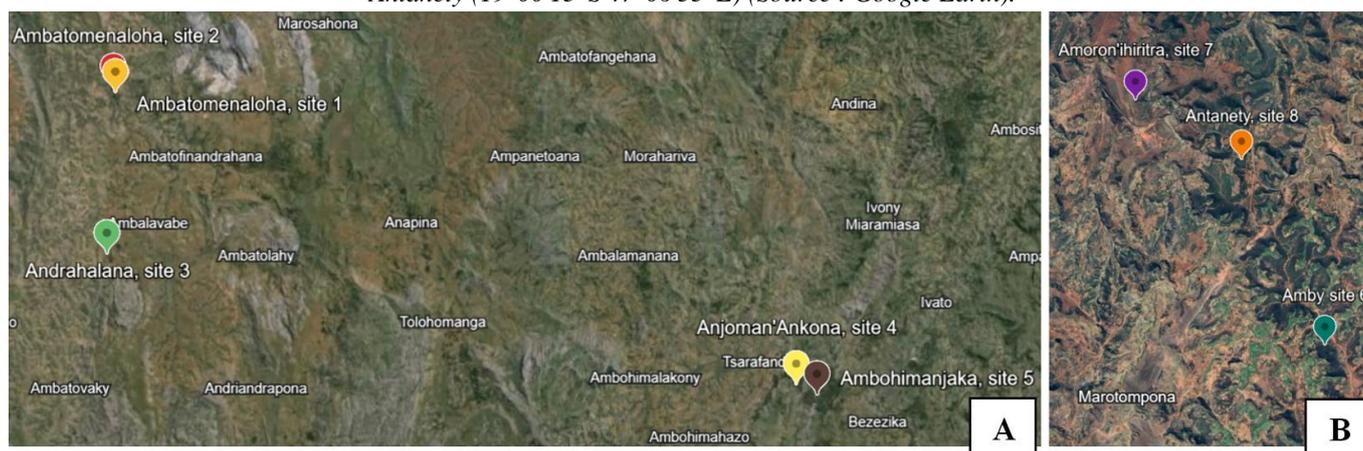


Figure 16. A. Visualisation des 5 sites composant la zone d'Itremo, B. Visualisation des 3 sites composant la zone d'Imamo (Source : Google Earth).

### 1.3. Zone d'Isalo

Enfin, la zone d'Isalo est située dans la région d'Ihorombe ( $22^{\circ}45'00''$  S,  $45^{\circ}29'00''$  E), située dans la partie sud-ouest de la province de Fianarantsoa. La zone d'Isalo constitue un parc national depuis 1999. Deux sites ont été traités dans le parc : le site 9 ( $22^{\circ}33'43''S$   $45^{\circ}22'44''E$ ), échantillonné le 26 mai 2024 et situé à proximité de la piscine naturelle du parc (**Figure 17A**) et le site 10 ( $22^{\circ}33'47''S$   $45^{\circ}20'17''E$ ), échantillonné le 27 mai 2024 et se trouvant près du site géologique (**Figure 17B**). Ces sites ont été choisis pour leur accessibilité et leur densité en Tapia. La région connaît des variations de température entre  $11^{\circ}C$  et  $31^{\circ}C$ . La saison sèche est venteuse et claire tandis que la saison des pluies est humide et nuageuse. Janvier est le mois le plus pluvieux de l'année tandis que novembre est le mois le plus chaud selon les données météorologiques de Weatherspark (mars 2024).

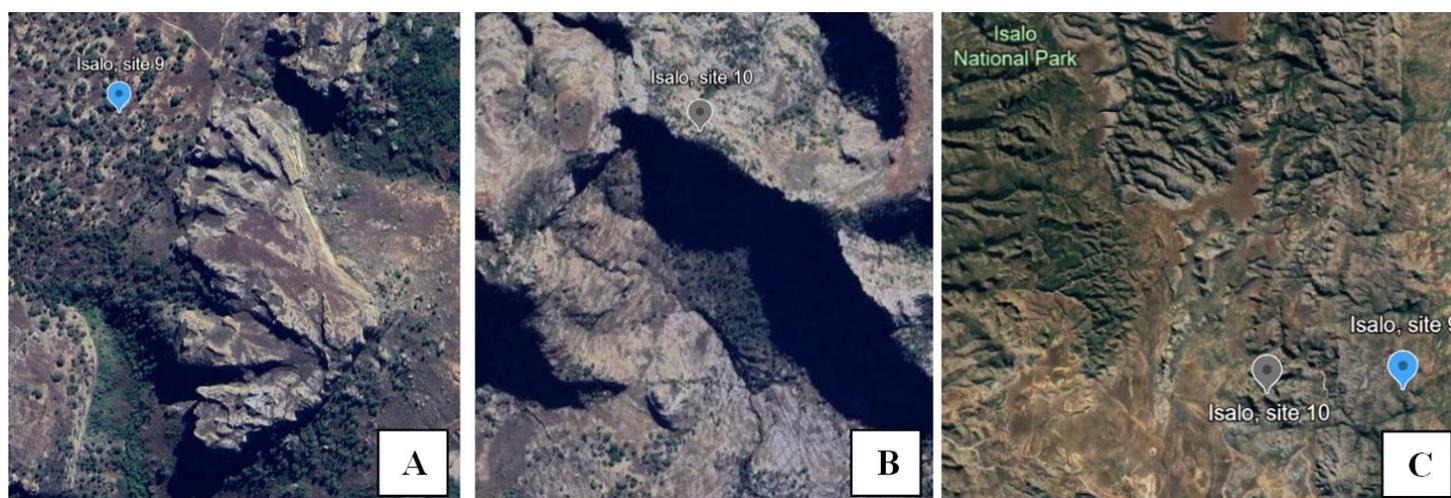


Figure 17. A. Site 9, Piscine naturelle ( $22^{\circ}33'43''S$   $45^{\circ}22'44''E$ ), B. Site 10, Site géologique ( $22^{\circ}33'47''S$   $45^{\circ}20'17''E$ ), C. Aperçu général des 2 sites de la zone d'Isalo (Source : Google Earth).

## 2. BIODIVERSITÉ ENTOMOLOGIQUE DES FORÊTS DE TAPIA

### 2.1. Mise en place du transect d'échantillonnage

Cet axe a été abordé lors des deux premières missions qui se sont déroulées du 6 au 12 mars 2024 dans la zone d'Itremo et du 18 au 21 avril 2024 dans la zone d'Imamo. Des quadrats de 50 m x 50 m ont été installés sur les sites du projet ARES (cité dans la section 1. - 1.1 du matériel et méthode), leurs emplacements ont été repris pour ce travail de fin d'étude. Chaque quadrat est divisé en 25 plots de 10 m x 10 m, dans lesquels les arbres sont identifiés et recensés (**Annexe 1**). Les missions de terrain ont servi à échantillonner la diversité entomologique présente sur les arbres se situant dans les différents plots. Un transect de 100 m de long a été mis en place dans le sens de la pente sur les 5 sites (**Figure 18A et B**). Cette méthode permet un échantillonnage efficace et représentatif des variations écologiques, facilitant la comparabilité et l'analyse des données (Bouget et al., 2009 ; Broers, 2022 ; Razafimanantsoa, 2023). Ce transect est composé de 10 plots de 10 m x 10 m (100 m<sup>2</sup>) incluant les 5 plots centraux des 25 existants ainsi que 5 nouveaux plots. Parfois, la mise en place du transect est contrainte par la disposition du site. Le transect est donc décalé vers le haut/bas du terrain afin d'avoir 10 plots contenant des arbres (**Figure 18C**).

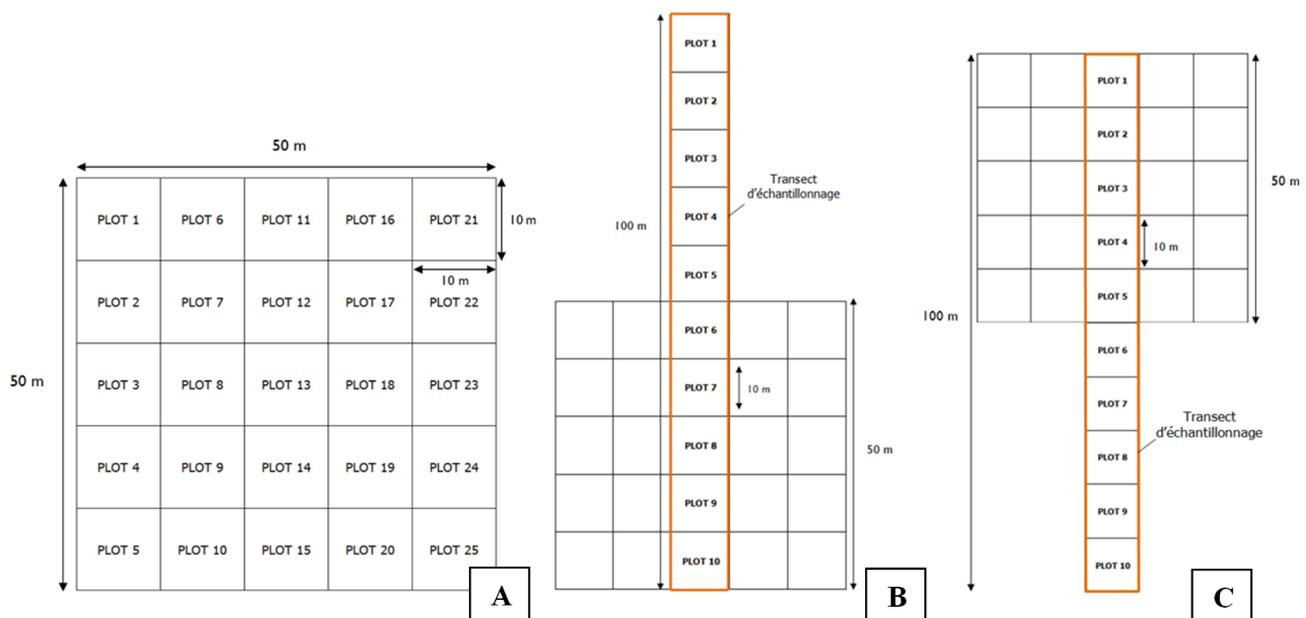


Figure 18. A. Quadrats de 50m x 50m composé de 25 plots de 10m x 10m, B. Transect de 100 m de long mis en place sur les sites 1 et 6, C. Transect de 100 m de long mis en place sur les sites 2, 3 et 7 (Source : Trolin, 2024).

Pour délimiter les parcelles, deux cordes de 100 mètres ont été utilisées pour les côtés longitudinaux (**Figure 19C**). Tous les 10 mètres, les plots sont séparés par des fanions numérotés (**Figure 19A**) grâce à une corde de la même longueur et marquée d'un repère (**Figure 19B**). Dans chaque plot, le nombre de pieds d'arbre est comptabilisé avant l'échantillonnage. L'espèce, la hauteur et le pourcentage de défoliation de chaque arbre sont également notés sur les fiches de terrain (**Annexe 2**) regroupant les données botaniques et entomologiques de chaque plot.



Figure 19. A. Fanions numérotés afin de délimiter les différents plots du transect, B. Repère en scotch permettant de savoir où se situe la fin d'un plot (10 m), C. Corde de 100m constituant la longueur du transect (Source : Trolin, 2024).

## 2.2. Technique d'échantillonnage de la biodiversité entomologique

La méthode d'échantillonnage choisie au sein du transect est celle du parapluie japonais (Razafimanantsoa, 2023). Cette technique est efficace pour capturer rapidement une grande variété d'arthropodes sans détruire la végétation, reproductible entre différents sites d'étude (Touroult et al., 2021). Elle est aussi utilisable dans des environnements difficiles d'accès et facile à transporter. Un système fait main (Razafimanantsoa, 2023) a été créé. Le cadre du parapluie est fait de 2 tubes PVC de 1,50 mètres reliés par un système de coude métallique (**Figure 20A**). Avec les morceaux de PVC restants, 2 bâtons ont été créés pour frapper les arbres délicatement (**Figure 20C**). Une toile en tissu blanc de 1 m x 1 m a été découpée et les 4 coins de la toile ont été cousus pour fixer les tubes en PVC (**Figure 20B**). Un trou a été découpé au centre de la toile pour recueillir ce qui tombe dans un récipient placé en dessous.

Deux exemplaires ont été fabriqués afin de pouvoir créer 2 équipes de travail. Chacune se composait de 3 personnes : la première personne frappait les branches des arbres pour faire tomber les insectes sur le parapluie, la deuxième tenait le parapluie et guidait la troisième personne vers les insectes visibles, celle-ci utilisait une pince pour attraper les insectes et les placer dans le pot de collecte (**Figure 20D**) contenant un mélange d'éthanol à 90% et d'eau. Immédiatement, elle identifiait les insectes et notait ses observations sur les fiches de terrain associées aux plots. Cette identification était facilitée par une légende codifiée, ce qui permettait d'accélérer le processus car chaque plot bénéficiait de 15 à 20 minutes d'échantillonnage. Si les spécimens d'un même ordre ou d'une même famille étaient différents à l'œil nu, ils étaient séparés par un tiret (**Annexe 2**). Des photos ont été prises pour les spécimens difficiles à identifier ou les chenilles spécifiques, et des observations sur la densité des vers à soie dans les plots ont été réalisées.

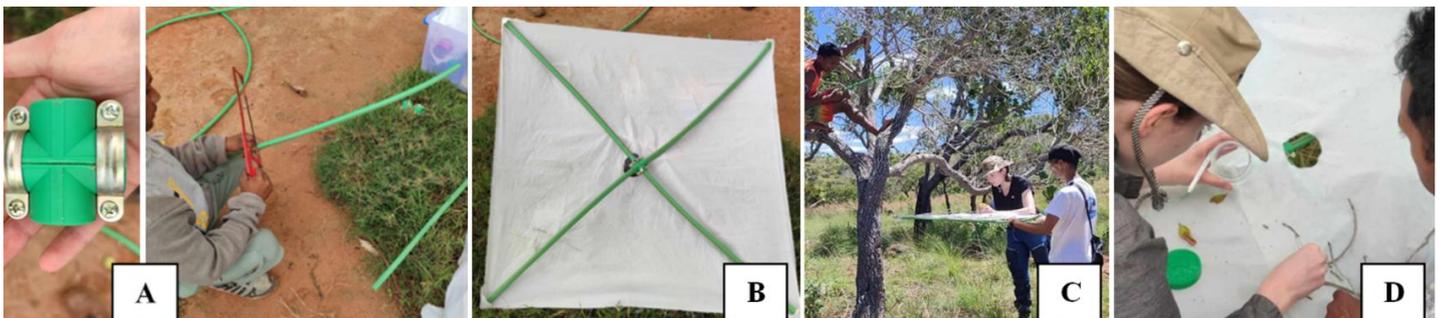


Figure 20. A. Cadre du parapluie japonais créé avec des tubes PVC et un coude métallique, B. Parapluie japonais opérationnel, C. Utilisation du parapluie japonais sur le terrain au pied d'un *Tapia*, D. Mise en alcool des spécimens récoltés avec le PJ (mélange d'alcool à 90% et d'eau) (Source : Trolin, 2024).

### 2.3. Traitement en laboratoire et traitement des données

Un récipient était attribué par plot, regroupant la faune des différents arbres du plot dans le même récipient. Chaque site comprend 10 pots de collecte, totalisant 50 pots pour les 5 sites. Ces échantillons ont ensuite été traités en laboratoire à l'aide d'un binoculaire (**Figure 21B**), d'une lampe et d'une clé d'identification. Les araignées ont été identifiées jusqu'à l'ordre tandis que les acariens l'ont été jusqu'à la sous-classe. Concernant les insectes, tous ont été identifiés jusqu'à l'ordre, et certains ont été classés jusqu'à la famille. Une légende a été établie pour ordonner les échantillons à l'aide de numéros (**Figure 21C**). Une base de données a été créée, incluant des informations sur les sites, le milieu et les spécimens. Les échantillons ont été étiquetés, organisés et conservés à Madagascar. La base de données a été analysée avec Excel (**Annexe 3**), en utilisant des tableaux croisés dynamiques pour mettre en évidence les abondances et les corrélations, simplifiant ainsi l'analyse numérique et la visualisation des données.

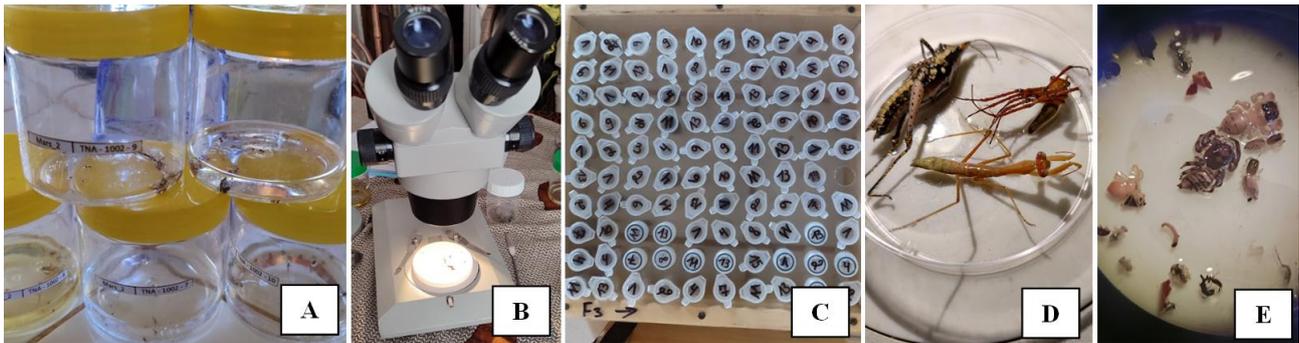


Figure 21. A. Pots de collecte codifiés, B. Binoculaire permettant l'identification, C. Échantillons triés par ordre, D. Spécimens venant des échantillons, E. Vision du binoculaire avant le tri des spécimens par ordre (Source : Trolin, 2024).

## 3. CRÉATION D'UNE PHYLOGÉNIE DES POPULATIONS DE *BOROCERA*

### 3.1. Technique d'échantillonnage

Cet axe a été exploré lors de 3 missions se déroulant du 6 au 12 mars 2024 dans la zone d'Itremo, du 18 au 21 avril 2024 dans la zone d'Imamo et du 24 au 29 mai 2024 dans la zone d'Isalo. Ces missions ont permis de collecter une variété de spécimens du genre *Borocera* sur des sites présentant des climats, milieux et espèces variées. L'échantillonnage a été réalisé sur 10 sites : les 5 sites des transects de l'axe "Biodiversité entomologique des forêts de Tapia", 3 sites situés le long des routes de mission dans les forêts de Tapia (**Figures 16**), et 2 sites dans le parc national de l'Isalo (**Figure 17**). Pour chaque site, l'effort d'échantillonnage a été uniformisé avec une recherche de 20 minutes sur les Tapia de la zone choisie.

Afin d'établir une phylogénie robuste des populations, l'objectif était de prélever 3 spécimens de *Borocera* par site. Si moins de 3 *Borocera* étaient trouvés en 20 minutes, l'effort était prolongé à 30 minutes avec une extension de la zone de recherche. En raison de la diminution des populations (voir point 3.4.1 de la section 3.), certains sites ne contiennent pas 3 spécimens distincts tandis que d'autres en comptent davantage, avec 2 ou 3 espèces de *Borocera* présentes.

Un total de 25 larves, 16 cocons et 1 adulte de *Borocera* a été prélevé et ramené en Belgique. Ils ont été transportés dans des piluliers hermétiques comprenant de l'éthanol à 90°. Ces 42 échantillons ont été traités en laboratoire où des analyses génétiques ont permis d'extraire l'ADN et de les séquencer afin d'obtenir les informations génétiques.

## 3.2. Analyses génétiques

### 3.2.1. Extraction de l'ADN des spécimens récoltés

L'extraction d'ADN a été réalisée grâce à un kit "*DNeasy®, Blood and tissues kit*" (**Annexe 4**). À l'aide d'une balance analytique, un échantillon de 25 mg de chaque spécimen est prélevé et placé dans un tube Eppendorf. Les tubes contenant le morceau d'insecte et deux billes métalliques sont ensuite agités avec un vibro-broyeur (MM 400, Retsch, Haan, Allemagne) à une fréquence de 30 Hz pendant 2 minutes. Avant de vortexer les tubes et de les centrifuger (micro-centrifugeuse 1-14, Sigma, Osterode am Harz, Allemagne) pendant 30 secondes, 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K sont ajoutés. Puis, les échantillons sont incubés pendant 2h à 56°C dans un thermomixer (Comfort 5355, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) réglé à 350 rpm. Après ces 2 heures, 200 µl de tampon AL sont ajoutés, suivis d'un vortexage, puis 200 µl d'éthanol (96°- 100°) et un nouveau vortexage. Ensuite, le contenu du tube est placé dans une colonne DNeasy comprenant une membrane en silice. Les tubes sont centrifugés à 6000 g pendant 1 minute ; le collecteur du tube est jeté et remplacé par un nouveau. 500 µl de tampon AW1 sont incorporés et les tubes sont re-centrifugés 1 minute à 6000 g. Le collecteur est à nouveau jeté et remplacé, puis 500 µl de tampon AW2 sont versés dans la colonne. Les tubes sont centrifugés à 20 000 g (vitesse maximale) pendant 3 minutes. Le collecteur est jeté, remplacé et les tubes sont centrifugés à la vitesse maximale pendant 1 minute. La colonne DNeasy est alors placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.

L'ajout de 100 µl de tampon AE est effectué et les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 1 minute et 30 secondes. L'ensemble est centrifugé pendant 1 minute à 6000 g puis la colonne est jetée. Un Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™, Fisher Scientific, Hampton, États-Unis) est utilisé pour quantifier l'ADN présent dans les 42 échantillons (**Annexe 5**). Pour établir le blanc de l'analyse, on utilise le tampon AE. L'ADN est ensuite conservé à -20°C dans le congélateur.

### 3.2.2. PCR et migration sur gel d'agarose

Les 42 échantillons ont ensuite été préparés pour une PCR et une migration sur gel d'agarose. Tout d'abord, une dilution a été effectuée pour ajuster la concentration de tous les échantillons à 10 ng/µl. Cependant, certains présentaient une concentration inférieure à 10 ng/µl ; leur concentration initiale a donc été maintenue (**Annexe 6**). Le volume final a été fixé à 50 µl. En se basant sur les calculs effectués, de l'eau prélevée d'un aliquot est transférée dans des Eppendorf numérotés à l'indélébile et pouvant contenir 1,5 ml. Ensuite, la quantité appropriée d'ADN, conservé à -20°C, est ajoutée à l'eau. Le mélange doit atteindre un volume total de 50 µl et est ensuite vortexé. En attendant les étapes suivantes, l'ADN est remis sur glace.

Le mélange de réaction PCR est préparé sous hotte. Ce mélange contient des amorces spécifiques, utilisées pour amplifier certaines régions du gène mitochondrial COI (Cytochrome Oxydase I) dans les insectes (Akter et al., 2023 ; Mohiuddin Meem et al., 2023). La première, l'amorce LCO (LCO 1490, Eurogentec, Seraing, Belgique) est complémentaire à la séquence du brin d'ADN matrice de 3' vers 5' (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') tandis que la deuxième, l'amorce HCO (HCO 2198, Eurogentec, Seraing, Belgique) est complémentaire au brin codant de l'ADN de 5' vers 3' (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAR AAY CA-3'). Ces amorces ont été sélectionnées car elles sont éprouvées pour ce type d'analyse, et leur utilisation combinée permet d'obtenir une séquence plus longue du gène COI, améliorant ainsi l'identification des espèces (Ghosh et al., 2019 ; Pachuau et al., 2012).

Un calcul doit être effectué pour déterminer combien de doses sont prévues pour le mix. Les échantillons sont traités par lot de 5 à 10 Eppendorfs, avec l'ajout d'un blanc et d'une dose de secours. Pour chaque échantillon,

le mélange est composé de : 16  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  (stérile et exempt de DNases et RNases) - 2,5  $\mu\text{l}$  d'amorce Reverse HCO - 2,5  $\mu\text{l}$  d'amorce Forward LCO et 25  $\mu\text{l}$  d'enzyme Q5, ADN polymérase à haute fidélité qui est utilisée en PCR pour des amplifications d'ADN (Q5 High-Fidelity - 2X Master Mix - M0492S, BioLabs, Paris, France). Le tout est minutieusement homogénéisé puis, 46  $\mu\text{l}$  du Mix (l'addition des 4 composants) sont transférés dans des tubes PCR numérotés. Sachant que le volume final est de 50  $\mu\text{l}$ , la quantité d'ADN à ajouter, en dehors de la hotte, est de 4  $\mu\text{l}$ . Quant au blanc, il recevra 4  $\mu\text{l}$  d'eau (aliquot). Quelques tests ont également été effectués à une concentration de 10  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  pour 10  $\mu\text{l}$  d'ADN. Le contenu des tubes est mélangé et vortexé avant d'être placé dans un thermocycleur (Thermocycleur quantitatif en temps réel/qPCR CFX96, Bio-Rad, Hercules, États-Unis) (**Figure 22A**).

La PCR comporte 3 grandes étapes qui sont répétées 35 fois afin d'amplifier l'ADN : l'étape de dénaturation qui consiste à chauffer l'échantillon pour séparer les 2 brins d'ADN (30 secondes à 98°C, 10 secondes à 98°C), l'étape d'hybridation qui permet aux amorces de s'apparier spécifiquement aux séquences complémentaires de l'ADN matrice (30 secondes à 56°C) et l'élongation qui consiste en un chauffage à une température optimale pour l'activité de la polymérase (30 secondes à 72°C, 2 minutes à 72°C). Enfin, un stockage des échantillons à 4°C (**Figure 22B**) est mis en place. Le programme total dure 1 heure et 30 minutes. Ces paramètres ont été choisis en utilisant un protocole éprouvé pour ce type d'analyse.

Un gel d'agarose est ensuite préparé pour chaque lot d'échantillons en utilisant 1 gramme d'agarose pour 100 ml de tampon TAE (1X). Le plan des PCR réalisées est disponible en annexe (**Annexe 7**). Le gel, comprenant 5  $\mu\text{l}$  de Ladder Sybr Safe (SYBR™ Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, Carlsbad, États-Unis), est coulé dans une cuve équipée d'un peigne de 20 puits et laissé à durcir pendant 20 minutes. Une fois solidifié, le gel est placé dans une cellule d'électrophorèse remplie de TAE (1X) et connectée à un bloc d'alimentation PowerPac™ Bio-Rad (**Figure 22C**). Dix  $\mu\text{l}$  des produits issus de la PCR sont prélevés et placés dans de nouveaux tubes, puis mélangés avec 2  $\mu\text{l}$  de colorant de chargement (6X Orange DNA, Thermo Scientific, Waltham, États-Unis). Le premier puits du gel est rempli avec un marqueur de poids moléculaire (MassRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Waltham, États-Unis) tandis que le deuxième contient le blanc. Les puits restants sont remplis avec 12  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon. L'électrophorèse est lancée à 100 Volts pendant 45 minutes pour permettre la migration. Après ce temps, le gel est retiré de la cuve et placé dans un transilluminateur UV (Système de documentation sur gel Doc XR+, Bio-Rad, Hercules, États-Unis). Celui-ci peut alors être visualisé à l'aide du logiciel Quantity One (version 4.6.9 Basic).



Figure 22. A. Thermocycleur quantitatif en temps réel/qPCR Bio-Rad CFX96, B. Cycle PCR appliqué aux échantillons, C. Cellule d'électrophorèse remplie de TAE (1X) et bloc d'alimentation (Source : Trolin, 2024).

Sur les gels examinés, deux échantillons ont présenté des bandes interrompues, ce qui nécessite une découpe du gel pour récupérer l'ADN amplifié. Les échantillons 26 et 35 ont donc été soigneusement découpés à l'aide d'une lampe UV et d'une lame de scalpel (**Figure 23**). La partie marquée sur le gel est ensuite transférée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, préalablement pesé. Le morceau de gel est ensuite pesé et chauffé au bain-marie pour le rendre homogène et liquéfié.



Figure 23. Image du gel contenant les échantillons 26 et 35 à couper après la migration et coupage du morceau de gel contenant l'ADN amplifié (Source : Trolin, 2024).

### 3.2.3. Purification de l'ADN des échantillons en vue d'un séquençage

Au cours de la PCR et de la migration sur gel, 6 échantillons (2, 7, 19, 21, 40, et 41) n'ont produit aucun résultat et ont donc été abandonnés. Ainsi, sur les 42 échantillons initiaux, 36 ont pu être amplifiés et prêts pour la purification. Cette étape est réalisée avec un kit NucleoSpin "Gel and PCR clean up" de chez Macherey-Nagel (**Annexe 8**). La première étape consiste à ajuster les conditions de fixation de l'ADN en mélangeant le contenu de l'échantillon avec 2 fois ce volume en tampon NTI, soit 200  $\mu$ l de NTI pour 100  $\mu$ l de PCR (**Annexe 9**). Le tout est transféré sur une colonne comprenant une membrane de silice et un tube collecteur de 2 ml et centrifugé à 11000 g pendant 30 secondes. Ensuite, 700  $\mu$ l de tampon NT3 sont ajoutés et l'échantillon est centrifugé à 11 000 g pendant 30 secondes. Cette étape est répétée une seconde fois pour garantir un nettoyage complet de la membrane. Entre les étapes, le tube collecteur est jeté et un nouveau est placé. Pour enlever ce qui reste du tampon NT3, une rotation d'1 minute à 11000 g est effectuée. Le tube collecteur est jeté et la colonne est placée dans un Eppendorf de 1,5 ml. Puis, 20  $\mu$ l du tampon NE sont ajoutés et les échantillons incubent durant 1 minute à température ambiante. La dernière étape consiste en une centrifugation d'1 minute à 11000 g. La colonne est jetée et les Eppendorfs sont fermés et numérotés.

Ces 36 échantillons sont presque prêts à être envoyés à l'entreprise *Eurofins Genomics*, située à Cologne (Gottfried-Hagen-Strasse, 20, 51105, Allemagne) afin d'être séquencés par la méthode de séquençage *Sanger* (Sanger Sequencing Steps & Method, Août-15-2024). L'étape ultime consiste en une dilution des échantillons trop concentrés (**Annexe 10**). En effet, *Eurofins* propose une procédure spécifique pour les échantillons pré-mélangés ((Eurofins Genomics, Août-12-2024), avec des exigences précises telle qu'une concentration finale de 22 ng/ $\mu$ l. Les échantillons dont la concentration est inférieure, égale ou légèrement supérieure à 22 ng/ $\mu$ l gardent leur concentration initiale (**Annexe 11**).

## 3.3. **Analyses statistiques**

### 3.3.1. Traitement des échantillons séquencés

Le traitement des fichiers de séquençage a débuté par l'examen minutieux de chaque séquence (**Annexe 12**). La séquence la plus longue, c'est-à-dire comportant le plus de paires de bases de haute qualité (zones vertes) est sélectionnée. Parfois, quelques zones jaunes sont acceptées, mais une abondance de zones jaunes, rouges ou noires indiquent une dégradation de la séquence et une fiabilité réduite du séquençage. Ces cas compromettent les résultats ou n'en donnent aucun car pour être analysée la séquence choisie doit comporter au moins 300 - 350 paires de base (**Annexe 13**). Vingt-huit échantillons ont été sauvegardés pour constituer le jeu de données final.

Les séquences brutes des 28 échantillons restants sont importées dans le logiciel Serial Cloner (SerialCloner2-6\_Install). Ce logiciel permet une analyse, une édition et une manipulation précises des séquences ADN

(Annexe 14). Enfin, un consensus des séquences Forward et Reverse de chaque échantillon est créé. Ce fichier texte (Notepad++ - npp.8.6.7.Installer.x64) est ensuite converti en format FASTA afin d'être exporté vers MEGA 11 (MEGA\_11.0.13\_win64\_setup) pour des analyses plus approfondies.

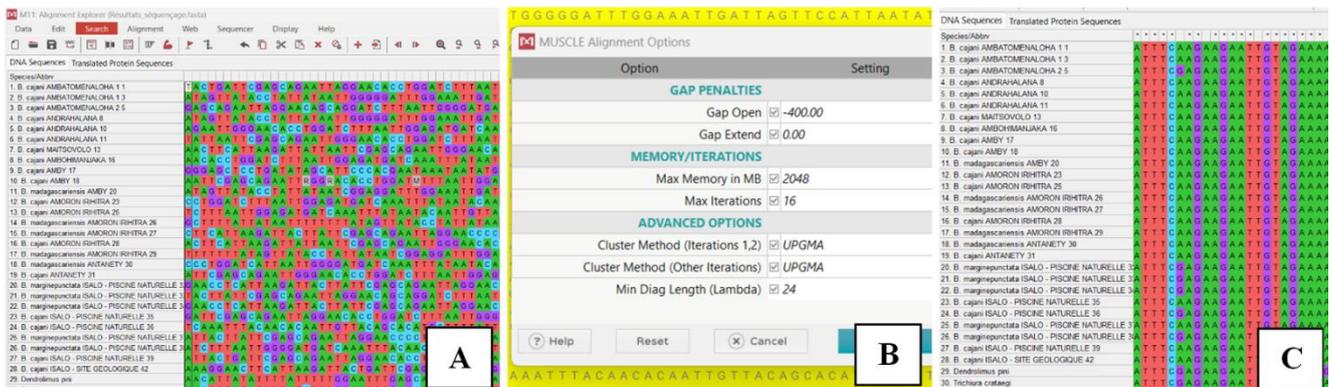
### 3.3.2. Mise en place d'arbres phylogénétiques

Pour obtenir des résultats fiables, des recherches supplémentaires ont été menées afin de comparer ces séquences à celles déjà répertoriées. Le génome des espèces de *Borocera* étant inconnu, il n'est pas possible de confirmer directement ces séquences. Cependant, elles peuvent être comparées avec des séquences proches, telles que celles des papillons hétérocères de la même famille, les Lasiocampidae.

L'accent a été mis sur le gène mitochondrial COI, reconnu pour sa forte variation interspécifique, ce qui le rend idéal pour différencier les espèces, tout en restant stable au sein d'une même espèce (Akter et al., 2023 ; Mohiudden Meem et al., 2023 ; Pachuau et al., 2012). Son amplification avec les amorces LCO et HCO, permet de construire des arbres phylogénétiques et de comparer les séquences obtenues à des bases de données. Les 28 séquences ont donc été analysées à l'aide de l'outil BLAST du site NCBI (National Center for Biotechnology Information, intégré au NIH). Le BLAST compare les séquences pour assurer une identification précise (Ghosh et al., 2019), trouver le gène COI le plus proche pour chaque séquence de *Borocera* et déterminer leur position relative (Annexe 15).

Afin de pouvoir se référer à des éléments connus et explorer les liens de parenté ou d'évolution entre les différentes séquences générées, 3 espèces de Lasiocampidae ont été ajoutées au jeu de données. Ces espèces ont été sélectionnées en fonction de leur diversité, de leur genre et de leur abondance : *Dendrolimus pini* Linnaeus, 1758 (Bombyx du pin), *Trichiura crataegi* Linnaeus, 1758 (Bombyx de l'aubépine) et *Malacosoma neustria* Linnaeus, 1758 (Livrée des arbres). Ensuite, les 31 séquences ont été analysées à l'aide du logiciel MEGA 11, utilisé pour construire des arbres phylogénétiques entre les spécimens étudiés (Ashfaq et al., 2011 ; Keklik, 2023).

Une fois le fichier FASTA exporté (Figure 24A), les séquences doivent être alignées à l'aide d'un alignement multiple de séquences (MSA). Parmi les différentes options disponibles, c'est l'algorithme MUSCLE qui a été choisi pour ce projet en raison de sa capacité à produire des alignements plus précis et plus rapides (Figure 24B) (Abu-Hashem et al., 2005 ; Edgar, 2004). Les séquences alignées affichent une astérisque au-dessus des colonnes (Figure 24C); les colonnes sans astérisque révèlent la diversité génétique entre les différentes séquences.



La prochaine étape est la reconstruction phylogénétique. Le logiciel génère un jeu de données à partir des séquences alignées, qui peut ensuite être utilisé pour créer un arbre phylogénétique. La méthode de reconstruction choisie est une méthode inhérente aux relations évolutives entre différentes espèces ou séquences génétiques : le Neighbor-Joining (Ashfaq et al., 2011). L'utilisation de la méthode de Bootstrap (**Annexe 16**) permet d'évaluer la robustesse et la fiabilité (Keklik, 2023) des branches de l'arbre (100 répliques, 7 threads). Les branches des arbres sont accompagnées de valeurs de soutien (pourcentage) qui indiquent combien de fois une branche apparaît dans ces arbres.

### 3.3.3. Lien entre la distance géographique et l'espèce de *Borocera*

En plus de l'analyse phylogénétique, il est pertinent d'explorer la possible corrélation entre la distance géographique des sites et les trois espèces de *Borocera*. Pour ce faire, le test de Mantel a été sélectionné afin d'examiner cette relation (Randrianandrasana, 2014). Ce test, en écologie et génétique, compare les matrices de distances génétiques et géographiques pour déterminer si les populations génétiquement similaires sont spatialement rapprochées, révélant ainsi l'influence de la distance sur la répartition des espèces. L'hypothèse nulle (H0) postule que les deux matrices de distance sont indépendantes l'une de l'autre. Le logiciel RStudio (version 4.3.1) a été utilisé pour créer un script intégrant le test de Mantel. Pour chacune des trois espèces, un fichier FASTA avec les séquences génétiques alignées et un fichier CSV avec les coordonnées géographiques (latitude et longitude) des sites ont été créés. Ces fichiers ont permis de calculer les distances génétiques et géographiques.

## 4. MISE EN PLACE D'UN ÉLEVAGE DE *BOROCERA*

### 4.1. **Contexte de la mise en place de l'élevage**

Cet essai a été intégré comme une expérience personnelle afin de mieux comprendre les aspects pratiques de l'élevage et d'amener des précisions/modifications à ce qui était déjà connu. Cette initiative n'a pas permis d'obtenir des adultes en raison de la durée de l'expérience mais elle a fourni des informations précieuses sur le développement des larves et leur comportement, enrichissant ainsi l'étude avec des données pratiques. Une recherche ultérieure et locale (Razafimanantsoa et al., 2013) a été réalisée pour approfondir les connaissances sur les exigences alimentaires et les besoins spécifiques des espèces élevées.

L'élevage a été réalisé à partir des spécimens récoltés lors des missions 1 et 2 (sites 1 à 8) et s'est déroulé du 9 mars au 21 mai 2024. En raison de contraintes de temps, les spécimens de la troisième mission (24 au 29 mai 2024) n'ont pas été mis en élevage mais ils ont été comptabilisés dans les récapitulatifs. Les larves étaient observées, recensées et nourries tous les 2 à 3 jours, voire tous les 4 jours si les conditions ne permettaient pas une intervention plus fréquente (**Annexe 17**). Les larves restantes à la fin de l'expérience ont été transférées à l'insectarium fin mai, en raison du manque de temps pour les observer et les entretenir, car étant sur le terrain et dans les analyses de la biodiversité, il n'était plus possible de continuer leur suivi.

### 4.2. **Conditions d'élevage et matériel**

L'élevage a été placé sur une paillasse de laboratoire au sein du laboratoire d'entomologie (**Figure 25A**). Ce laboratoire bénéficiait de fenêtres laissant passer une abondante lumière naturelle. Il était bien aéré, maintenant une température ambiante constante de +/- 20°C et une humidité ambiante, ne présentant aucune anomalie (Razafimanantsoa, 2023). Les boîtes d'élevage étaient ventilées grâce à une grille présente sur les boîtes d'élevage pour éviter l'accumulation d'humidité excessive et prévenir la formation de moisissures.



Figure 25. A. Installation de l'élevage dans le laboratoire d'entomologie, B. Visualisation de la boîte d'élevage et de sa grille en fil de fer, C. Système de pot, rempli d'eau, scotché dans les boîtes, D. Ouate rebouchant les pots pour éviter la noyade des larves (Source : Trolin, 2024).

Le matériel nécessaire comprend des boîtes d'élevage en plastique munies d'un couvercle et d'une grille en fil de fer (**Figure 25B**) permettant à l'air de circuler. À partir du 22 mars, un système de pots d'eau a été mis en place (**Figure 25C**) pour maintenir les branches de goyavier fraîches et vertes plus longtemps (Razafimanantsoa et al., 2013). Les pots étaient bouchés avec de l'ouate afin d'éviter que les chenilles ne tombent dans l'eau et se noient (**Figure 25D**). Chaque boîte était marquée au marqueur indélébile pour indiquer le nombre de chenilles, leur stade de développement et le site d'origine.

Pour garantir le bien-être des chenilles et optimiser la disponibilité de la nourriture, les boîtes d'élevage contenaient entre 1 et 5 chenilles, réparties en fonction de leur taille, stade de développement, et site d'origine. Les boîtes étaient soigneusement nettoyées tous les 3 à 4 jours. Les larves étaient temporairement transférées dans une boîte propre pendant que les feuilles mortes, l'ouate usagée, et l'eau du pot étaient remplacées. Les excréments étaient également éliminés (**Figure 26A**). Après avoir essuyé la boîte pour éliminer toute humidité, de nouvelles feuilles étaient placées dans le pot, lequel était rebouché avec de la nouvelle ouate. Les chenilles étaient alors réintroduites dans leur boîte fraîchement nettoyée.

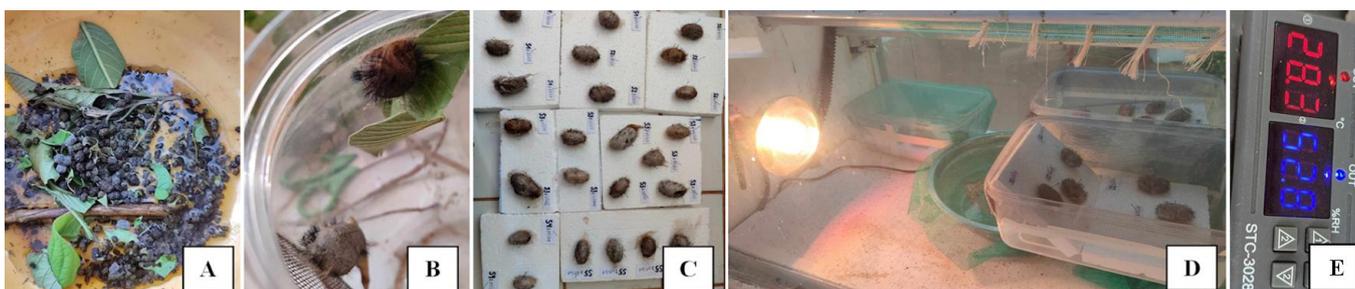


Figure 26. A. Déchets enlevés des boîtes d'élevage, B. Cocons s'étant formés dans la boîte d'élevage, C. Morceaux de frigolite contenant les cocons épinglés et étiquetés, D. Incubateur de l'insectarium "Za Bibikely", E. Valeurs du thermomètre et de l'hygromètre de l'incubateur (Source : Trolin, 2024).

Lorsque les larves se transforment en cocons (**Figure 26B**), ces derniers sont enlevés de la boîte et fixés sur des morceaux de frigolite à l'aide d'épingles entomologiques, étiquetés, puis placés dans des boîtes (**Figure 26C**). Les épingles sont placées sur les côtés longitudinaux du cocon car le *Borocera* a tendance à sortir de son cocon par l'une de ses extrémités. Pour accélérer leur développement, les cocons ont été placés dans un incubateur, où la température et l'humidité étaient rigoureusement contrôlées à l'aide d'un thermomètre et d'un hygromètre (**Figure 26D**).

### 4.3. Alimentation des larves

Il est crucial de fournir aux larves des feuilles fraîches, non traitées et renouvelées régulièrement pour assurer une alimentation optimale. Les feuilles sont remplacées tous les 3 à 4 jours pour éviter leur dégradation et éviter la contamination. Après chaque mission, les larves étaient nourries avec du Tapia cueilli sur le terrain pendant 2 à 3 jours. Faute de Tapia à Antananarivo, la nourriture a été substituée par du goyavier (*Psidium guayava* L.), également apprécié par les vers à soie et disponible au sein de l'Université (**Figure 27B**).



Figure 27. A. Feuilles de Tapia (*Uapaca Bojeri* Baill.), B. Feuilles de goyavier (*Psidium guayava* L.), C. Vers à soie mangeant une feuille de Tapia en avant-plan et une feuille de goyavier en arrière-plan (Source : Trolin, 2024).

### 4.4. Surveillance et gestion des pertes

Le suivi des stades de développement a été effectué toutes les deux semaines pour assurer une observation continue et marquer les changements des larves pendant l'expérience (**Annexe 18**). Ce suivi a été complété par un suivi des pertes et de leurs causes pour évaluer les conditions de l'élevage et optimiser les soins apportés aux larves (**Tableau 5**). Les larves étaient observées régulièrement pour détecter tout signe de maladie, de détérioration ou de mort. Les chenilles retrouvées mortes étaient examinées, recensées, puis conservées dans des piluliers hermétiques remplis d'éthanol à 90%. Ces piluliers étaient placés dans un endroit sombre à température ambiante. Chaque pot était étiqueté et marqué à l'indélébile avec des informations telles que la date de décès, le site, le stade et l'espèce.

# Résultats

## 1. BIODIVERSITÉ ENTOMOLOGIQUE DES FORÊTS DE TAPIA

Cette section présente les résultats obtenus dans le cadre de l'étude de la biodiversité entomologique et des liens d'abondance au sein des forêts de Tapia à Madagascar. Au total, **2.190** arthropodes ont été prélevés (**Tableau 1**). Comme figuré ci-dessus, l'ordre des Araneae recense le plus d'individus échantillonnés (rond rouge) par rapport aux Odonates qui en comptent le moins (rond vert).

Tableau 1. Répartition du nombre d'arthropodes sur les cinq sites étudiés ainsi que sur les 2 lieux de mission.

ORDRES/SITES	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	TOTAL GENERAL	Ambatofinandrahana	Arivonimamo
Acari	0	3	4	2	0	9	7	2
Araneae	30	33	260	219	180	722	323	399
Blattodea	2	8	11	4	5	30	21	9
Coleoptera	41	7	32	16	23	119	80	39
Collembola	1	1	4	0	1	7	6	1
Diptera	1	1	5	0	1	8	7	1
Hemiptera	2	10	7	12	18	49	19	30
Hymenoptera	66	41	194	129	280	710	301	409
Lepidoptera	16	9	43	71	52	191	68	123
Mantodea	4	3	7	9	30	53	14	39
Odonata	0	0	0	1	0	1	0	1
Orthoptera	3	5	5	8	1	22	13	9
Phasmoptera	0	0	2	1	0	3	2	1
Psocoptera	12	53	39	42	114	260	104	156
Thysanoptera	0	0	6	0	0	6	6	0
<b>TOTAL GENERAL</b>	<b>178</b>	<b>174</b>	<b>619</b>	<b>514</b>	<b>705</b>	<b>2190</b>	<b>971</b>	<b>1219</b>

Les sites 1, 2 et 3 correspondent à la mission d'Ambatofinandrahana, et malgré un site supplémentaire, ils contiennent moins d'insectes que Arivonimamo. En revanche, à l'exception des Lépidoptères, dont le nombre est deux fois plus élevé à Arivonimamo, le nombre d'individus recensés dans chaque ordre est similaire entre les deux missions. Les Lépidoptères sont représentés à 98% par des chenilles (187 individus) pour 2% de papillons capturés (4 individus).

Les Hyménoptères et les Aranéides dominant nettement (**Figure 28**), représentant chacun 33% de la diversité échantillonnée. Une deuxième tranche de pourcentage se dessine avec les psocoptères (260 - 12%), Lépidoptères (191 - 9%) et coléoptères (119 - 12%). En revanche, les Acariens, ainsi que les ordres des Mantes, Collembolés, Odonates, Orthoptères, Thysanoptères, Diptères et Hémiptères ne représentent chacun que 0 à 3% de la diversité globale, avec un nombre d'individus variant entre 0 et 50 (**Tableau 1**).

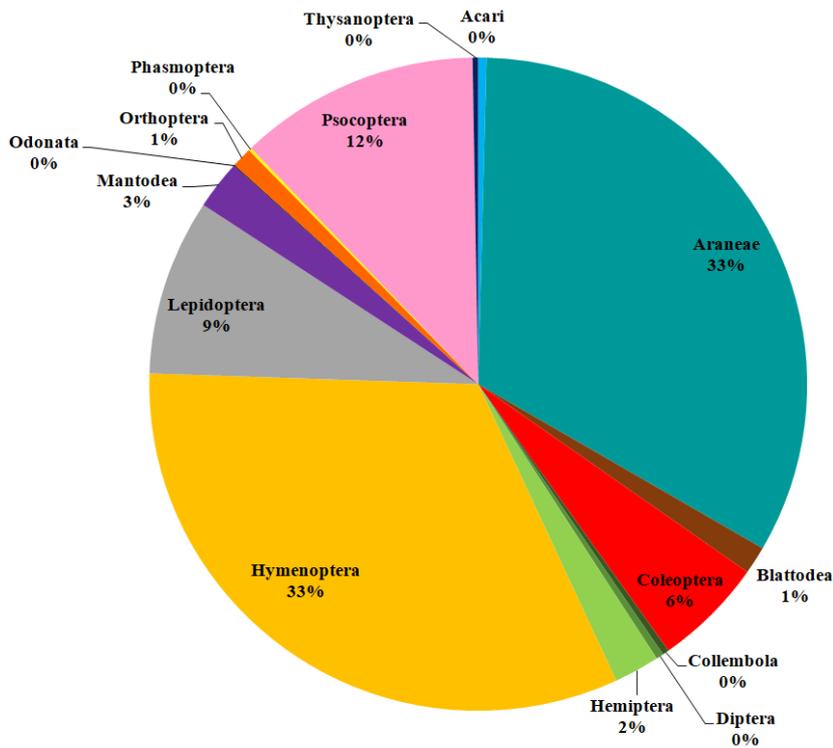


Figure 28. Profil de la diversité globale des arthropodes dans les différents sites de la forêt de Tapia.

Le site 5 abrite le plus grand nombre d'individus (**Figure 29**), avec une prédominance des Hyménoptères, suivis des Aranéides et des Psocoptères. Les sites 1 et 2 comptent le moins d'individus, tandis que le site 3 est le seul à enregistrer la présence de Thysanoptères et à compter le plus d'Araneae. D'ailleurs, ce site présente la plus grande diversité d'ordre.

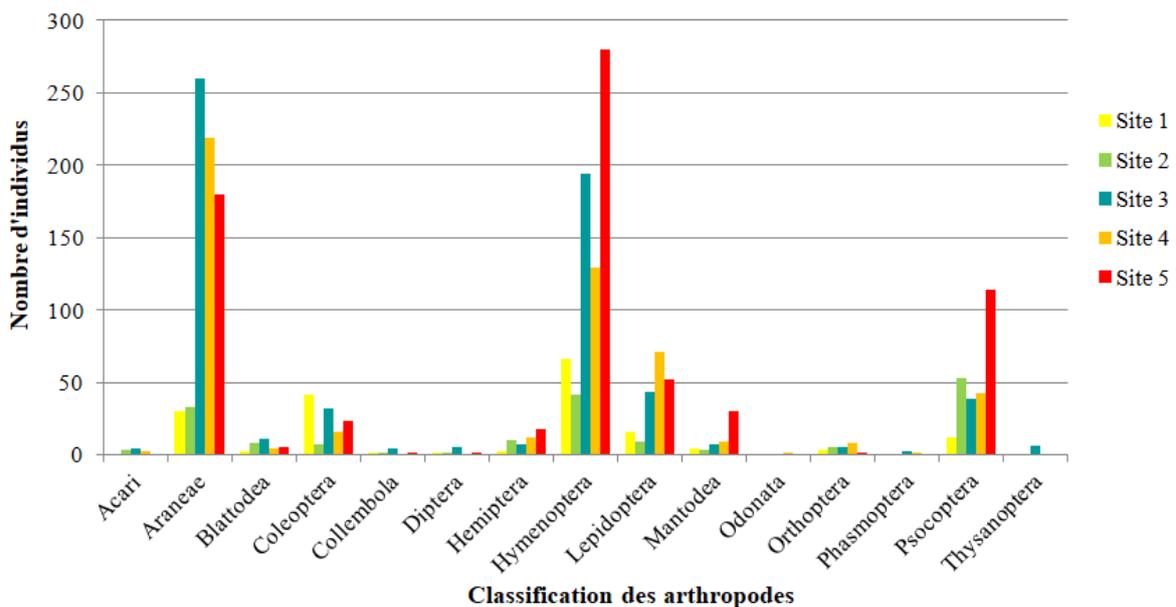


Figure 29. Comparaison de l'abondance des espèces d'arthropodes par site échantillonné, en forêt de Tapia.

## 2. CRÉATION D'UNE PHYLOGÉNIE DES POPULATIONS DE BOROCERA

### 2.1. Analyses génétiques

Au cours des PCR et des analyses sur gel, 64% des échantillons ont été amplifiés du premier coup et ont marqué correctement sur le gel d'agarose (**Figure 30**).



Figure 30. Migration sur gel d'agarose réussie des échantillons 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 et d'un blanco. Les croix rouges signifient que rien n'était présent dans le puits.

Les 36% restants ont nécessité une ré-amplification ou des ajustements pour conserver le maximum d'échantillons pour l'analyse génétique (**Annexe 7**). Malgré ces efforts, 6 échantillons (2, 7, 19, 21, 40 et 41), représentant 14%, n'ont montré aucune bande sur les gels, et aucun résultat n'a pu être obtenu (**Figure 31**). L'analyse phylogénétique se concentre désormais sur 36 échantillons.



Figure 31. Migration sur gel d'agarose montrant les échantillons 2, 7, 19, 21, 40 et 41 qui ont échoué malgré plusieurs tentatives. Les croix rouges indiquent l'absence d'échantillons dans les puits.

### 2.2. Analyses statistiques

#### 2.2.1. Phylogénie des Borocera

La technique du barcoding BLAST servant à identifier le gène COI de Lasiocampidae le plus proche pour chaque séquence de *Borocera*, révèle un fait intéressant : de manière similaire, chaque espèce de *Borocera* a une espèce de référence qui apparaît systématiquement (**Annexe 20**). Pour *B. cajani*, 61,1% des individus (11/18 individus) tombent sur *Pernattia pusilla* Donovan, 1805 (Teigne du chêne). Le *Gastropacha quercifolia* Linnaeus, 1758 (Feuille-morte du chêne) est relié à 60% (3/5 individus) de *B. marginepunctata* tandis que le *B. madagascariensis* comporte 3 individus sur 5 (60%) liés au *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai & Liu, 1962 (Chenille du pin chinois). Ces 3 espèces sont des papillons appartenant à la famille des Lasiocampidae (**Tableau 2**).

Tableau 2. Résultats du BLAST des 28 échantillons destinés à la création de l'arbre phylogénétique des *Borocera* : dix gènes COI ont été identifiés comme étant liés aux gènes COI des trois espèces de *Borocera*.

SITE	N°ECH	ESPECE	STADE	CORRESPONDANCE
AMBATOMENALO HA_1	1	B._cajani	larve	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMBATOMENALO HA_1	3	B._cajani	larve	Oenochroma sp. ANIC2 voucher 10ANIC-11150 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMBATOMENALO HA_2	5	B._cajani	cocon	Enyo sp. caviferDHJ01 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ANDRAHALANA	8	B._cajani	larve	Oenochroma sp. ANIC2 voucher 10ANIC-11150 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ANDRAHALANA	10	B._cajani	larve	Cyana sp. BOLD:ABZ7356 voucher MNVD-00213-F04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ANDRAHALANA	11	B._cajani	larve	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ANJOMAN'ANKONA	13	B._cajani	cocon	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMBOHIMANJAKA	16	B._cajani	cocon	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMBY	17	B._cajani	larve	Gymnasura saginaea voucher 10ANIC-00718 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMBY	18	B._cajani	larve	Cyana sp. BOLD:ABZ7356 voucher MNVD-00213-F04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMBY	20	madagascarier	larve	Dendrolimus tabulaeformis isolate SS110803.062 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMORON'IRIHITRA	23	B._cajani	larve	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMORON'IRIHITRA	25	B._cajani	larve	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMORON'IRIHITRA	26	madagascarier	larve	Obeidia lucifera extranigrans voucher AYK-04-0850-3 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds;
AMORON'IRIHITRA	27	madagascarier	larve	Dendrolimus tabulaeformis isolate SS110803.062 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMORON'IRIHITRA	28	B._cajani	larve	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
AMORON'IRIHITRA	29	madagascarier	cocon	Caspephyra plenimargo voucher 11ANIC-02702 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ANTANETY	30	madagascarier	cocon	Dendrolimus tabulaeformis isolate SS110803.062 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ANTANETY	31	B._cajani	cocon	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	32	marginépuncte	larve	Gastropacha populifolia angustipennis voucher AYK-04-0980-04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	33	marginépuncte	cocon	Gastropacha populifolia angustipennis voucher AYK-04-0980-04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	34	marginépuncte	cocon	Gastropacha populifolia angustipennis voucher AYK-04-0980-04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	35	B._cajani	cocon	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	36	B._cajani	cocon	Sena nr. prompta BOLD:AAL7039 voucher AZ-07-2034 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	37	marginépuncte	cocon	Dendrolimus tabulaeformis isolate SS110803.062 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	38	marginépuncte	cocon	Sena nr. prompta BOLD:AAL7039 voucher AZ-07-2034 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-PISCINE_NATURELLE	39	B._cajani	cocon	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
ISALO_-SITE_GEOLOGIQUE	42	B._cajani	cocon	Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

La figure 32 permet de réaliser que 10 séquences COI ont pu être répertoriés comme liées aux séquences des *Borocera*. Mis à part les 3 représentants revenant le plus souvent, 3 autres espèces reviennent 2 fois : *Oenochroma sp.*, *Cyana sp.*, *Sena sp.*. Ce résultat est plus surprenant car ces 3 genres, qui ne correspondent pas à une espèce précise, appartiennent à des familles bien distinctes : **Geometridae**, **Erebidae** et **Noctuidae** respectivement. Cependant, les 2 premiers genres se concentrent principalement sur l'espèce *B. cajani* alors que le genre *Sena* est associé à deux espèces différentes. Les échantillons 37 et 38 méritent une attention particulière, car ils montrent des représentants appartenant à d'autres espèces, contrairement aux résultats des autres échantillons. En ce qui concerne l'analyse des différents sites, seul le site 6 (Amaron'irihitra) avec les *B. cajani* montre une stabilité dans le nom de son référentiel. Tous les autres sites présentent des variations (**Tableau 2**).

Les branches de l'arbre sont accompagnées de valeurs de soutien (pourcentage) qui indiquent combien de fois une branche apparaît dans les arbres bootstrap. L'arbre montre des pourcentages de bootstrap élevés, avec 7 valeurs supérieures à 80%, indiquant une forte confiance dans les relations évolutives représentées (**Figure 32**). Pour une analyse approfondie de l'arbre, il est essentiel de consulter les résultats et les couleurs présentés dans le tableau 2.



### 2.2.2. Test de Mantel : lien entre la distance géographique et la distance génétique des *Borocera*

Pour *Borocera cajani*, la corrélation observée de +0,1989273 est significativement positive, surpassant les valeurs obtenues par permutation (p-valeur = 0.041), ce qui signifie que les populations génétiquement similaires sont généralement situées géographiquement plus proches les unes des autres (**Annexe 21**). Par contre, pour *Borocera madagascariensis*, le test révèle une corrélation non-significative (corr = -0.201 ; p-valeur = 0.552). Cela signifie qu'il n'y a aucune influence de la distance géographique sur la structure génétique des *Borocera madagascariensis* (**Annexe 22**). Enfin, le test de Mantel n'est pas applicable à l'espèce *Borocera marginepunctata* car les 5 individus proviennent du même site. Les distances géographiques sont donc nulles et le test ne peut fonctionner (**Annexe 23**).

## 3. FINALITÉS DE L'ÉLEVAGE DE BOROCERA

Tout au long de l'expérience, les cocons de *Borocera cajani* ont été mesurés et pesés (**Annexe 19**). Grâce à l'utilisation du logiciel RStudio, les moyennes et écarts-types des longueurs, largeurs et poids ont été calculés. Bien que le suivi différencié des mâles et des femelles n'ait pas été possible, les données recueillies peuvent être comparées avec la littérature existante. Concernant le poids (**Figure 33**), le site 6 affiche le poids moyen le plus élevé et c'est le seul à atteindre la valeur minimale attendue pour les cocons femelles (300 - 400 mg). À l'exception du site 8, qui ne compte qu'un seul cocon, tous les autres sites correspondent aux valeurs de la bibliographie pour les mâles (90 - 200 mg). En ce qui concerne la longueur (**Figure 34**), aucune des moyennes n'atteint la taille bibliographique des cocons femelles (5 cm). (**Figure 35**) Le site 4 présente les longueurs et largeurs de cocons les plus petites, mais il est à noter que ce site ne comprend que deux échantillons.

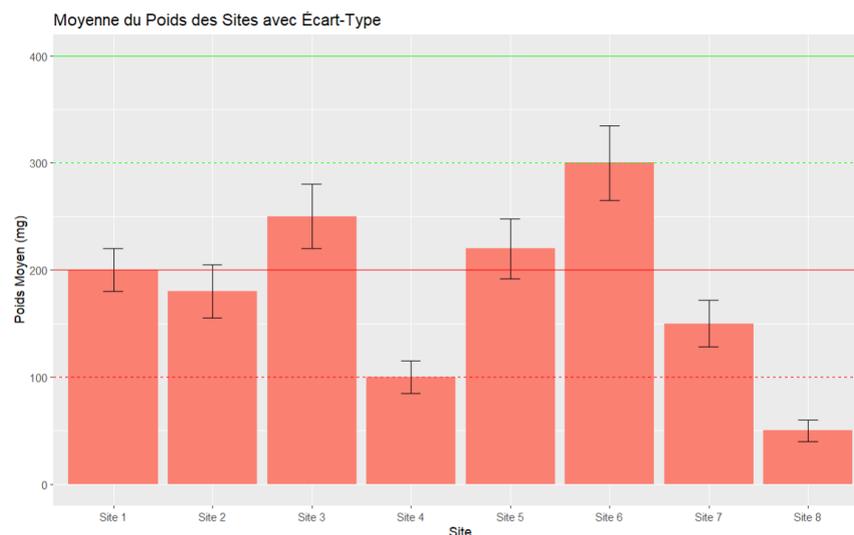


Figure 33. Comparaison des mesures bibliographiques de poids aux cocons récoltés sur les sites 1 à 8.

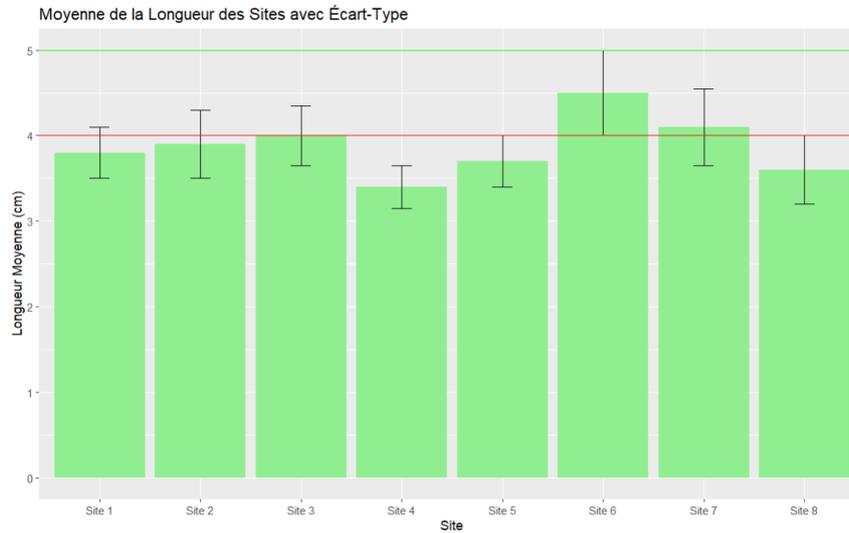


Figure 34. Comparaison des mesures bibliographiques de longueur aux cocons récoltés sur les sites 1 à 8.

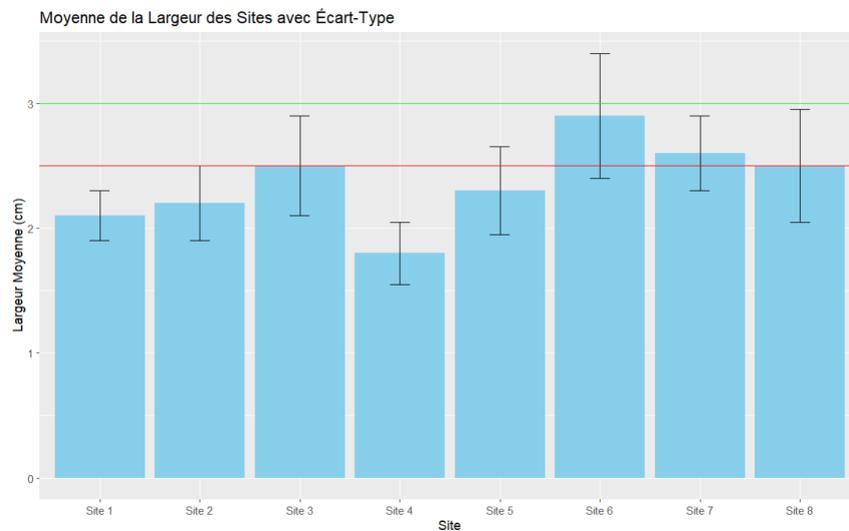


Figure 35. Comparaison des mesures bibliographiques de largeur aux cocons récoltés sur les sites 1 à 8.

À la fin de l'expérience, un récapitulatif des spécimens récoltés au cours des 3 missions a été réalisé (**Tableau 3**). En tout, 67 larves et 39 cocons de 3 espèces différentes ont été collectés. Parmi les larves, 33 se sont transformées en nymphe, tandis que 28 sont mortes pour diverses raisons. En ce qui concerne les cocons, un mâle a émergé dans l'incubateur mais s'est échappé par une interstice. Une femelle provenant du site 7 et prélevée au stade cocon a émergé en avril. Le cycle complet des cocons n'a pas pu être observé en raison de la durée limitée du séjour. Soixante échantillons ont été ramenés en Belgique afin d'être analysés génétiquement (**Tableau 4**).

Tableau 3. Répartition et évolution des spécimens de *Borocera* en élevage.

<b>TERRAIN AMBATOFINANDRAHANA</b>	<b>Début élevage</b>	<b>Fin élevage</b>
LARVES <i>B. cajani</i>	36	0
CHRYSALIDES <i>B. cajani</i>	2	25
PERTES	0	13
<b>TERRAIN ARIVONIMAMO</b>	<b>Début élevage</b>	<b>Fin élevage</b>
LARVES <i>B. cajani</i>	17	6
LARVES <i>B. madagascariensis</i>	10	0
CHRYSALIDES <i>B. madagascariensis</i>	0	6
CHRYSALIDES <i>B. cajani</i>	15	17
PERTES	0	13
<b>TERRAIN ISALO PN</b>	<b>Début élevage</b>	<b>Fin élevage</b>
LARVES <i>B. cajani</i>	1	0
LARVES <i>B. marginepunctata</i>	3	0
CHRYSALIDES <i>B. cajani</i>	28	28
CHRYSALIDES <i>B. marginepunctata</i>	2	4
PERTES	0	2
<b>TOTAL TERRAIN</b>		
TOTAL LARVES BC RÉCOLTÉES	54	
TOTAL LARVES BM RÉCOLTÉES	10	
TOTAL LARVES BMP RÉCOLTÉES	3	
TOTAL CHRYSALIDES BC RÉCOLTÉES	37	
TOTAL CHRYSALIDES BM RÉCOLTÉES	0	
TOTAL CHRYSALIDES BMP RÉCOLTÉS	2	
TOTAL LARVES --> CHRYSALIDES	33	
TOTAL CHRYSALIDES --> ADULTES	1	
TOTAL PERTES	28	

Tableau 4. Récapitulatif des spécimens ramenés en Belgique afin d'être analysés.

RÉCAPITULATIF DES SPÉCIMENS	
Total des échantillons ramenés en Belgique	60
Échantillons à traiter :	42
> Total adultes <i>B. cajani</i>	1
> Total larves <i>B. cajani</i>	21
> Total larves <i>B. madagascariensis</i>	3
> Total larves <i>B. marginepunctata</i>	1
> Total cocons <i>B. cajani</i>	10
> Total cocons <i>B. madagascariensis</i>	2
> Total cocons <i>B. marginepunctata</i>	4
Échantillons de secours :	18

Durant l'élevage, plusieurs types de pertes de spécimens ont été observés (**Tableau 5**). Parmi les chenilles mortes, trois (2 *B. cajani* et 1 *B. madagascariensis*) ont été identifiées comme parasitées, ce qui a probablement contribué à leur décès prématuré. Sur les 28 larves mortes, 18 ont été trouvées totalement molles et flasques (**Figure 36E**), indiquant une possible défaillance dans leur développement ou des conditions environnementales inadéquates. Certaines étaient accrochées par leur fausse patte arrière à une feuille et pendaient dans le vide. Enfin, certaines larves se sont durcies de manière anormale (**Figure 36B**), ce qui suggère des problèmes de déshydratation ou des altérations dans le processus de métamorphose. Ces observations mettent en lumière les défis rencontrés dans le maintien des conditions optimales pour l'élevage des *Borocera*.



Figure 36. A. Vers à soie parasité, B. Larve dure et pliée au niveau de l'abdomen, C. Larve du site 1, du 9 avril 2024, D. Larve du 21 avril du site 6, E. Larve molle et pliée à l'abdomen, F. Larves dures (Source : Trolin, 2024).

Tableau 5. Répartition des pertes d'échantillons et leurs causes selon les sites et les dates.

Dates / Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6	Site 7
13 mars		1 : parasitée sur tout son corps (larves sont sorties d'elles)					
18 mars	2 : molles	1 : molle, accrochée à une feuille par les fausses pattes arrière	1 : molle, accrochée à une feuille par les fausses pattes arrière				
20 mars			1 : molle				
22 mars			2 : molles				
1 avril			1 : dure, sur le dos				
3 avril					1 : molle, sur le dos avec du liquide brun et collant sur l'amère		
9 avril	1 : dure, torsadée, trace blanche de moisissure		1 : molle, odeur de poisson, noire-brune foncée*, parasitée				
19 avril						1 : molle et pliée sur la partie inférieure de l'abdomen	
20 avril		1 : molle et pliée sur la partie inférieure de l'abdomen					1 : molle
21 avril						1 : moitié du corps brun-noir, molle et aspect huileux 1 : molle, vide et pliée,	1 : molle et noire, renfrognée et séchée
29 avril						1 : dure, non pliée, droite	
3 mai						1 : Bm, parasitée	
6 mai							2 : molles
8 mai						1 : molle	
17 mai						1 : molle	1 : Bm, molle, pliée
21 mai						1 : dure, droite	

L'astérisque du tableau 5 indique que la larve morte a été conservée dans de l'alcool, révélant des centaines de petites larves émergeant de son corps. Bien que des mouches ressemblant à des simuliés aient été observées dans la boîte d'élevage, les autres larves présentes n'ont rencontré aucun problème pour se métamorphoser.

# Discussion

---

## **1. ANALYSE DE LA BIODIVERSITÉ ABONDANCE ENTOMOLOGIQUE DES FORÊTS DE TAPIA**

La biodiversité entomologique des forêts de Tapia a été explorée au cours de trois missions distinctes, offrant une vue d'ensemble précieuse mais confrontée à divers défis. Lors de la première mission, la standardisation des méthodes n'était pas optimale, ce qui a pu conduire à des variations dans les données collectées entre cette mission et les suivantes. En effet, le protocole ayant été créé pour ce projet, il a fallu un certain temps pour s'ajuster, déterminer le nombre de personnes nécessaires et évaluer le temps requis pour chaque tâche. Des améliorations techniques ont été mises en place au fil des missions, ce qui a permis d'affiner les méthodes et d'obtenir des résultats plus précis. La grande différence dans le nombre d'individus prélevés sur les sites 1 et 2 (2 premiers jours de mise en place du protocole) et le reste des sites, peut probablement être expliquée par ces ajustements progressifs.

Le fait que la première mission ait été réalisée en mars et la deuxième en avril a également pu influencer la biodiversité observée. Les variations saisonnières ont pu entraîner des différences dans la biodiversité observée et influencer les résultats de chaque mission. La météo instantanée a également joué un rôle dans les résultats de l'étude. Le site 1 a été échantillonné sous la pluie, ce qui a probablement contribué à un faible nombre d'échantillons récoltés. En revanche, les autres sites ont bénéficié de conditions ensoleillées, bien que certains aient été confrontés à des périodes de vent intense. Ces conditions météorologiques ont compliqué l'utilisation de la technique du parapluie japonais, car le vent emportait les feuilles et dispersait les insectes frappés par le bâton. Cerretti et al. (2004) mettent en évidence l'importance de prendre en compte les facteurs spatio-temporels dans les études de biodiversité. Les missions n'étant pas réalisées simultanément, le cycle de développement des insectes a continué en dehors des périodes de collecte, modifiant la diversité et l'abondance des espèces observées à différents moments. Les conditions environnementales varient entre deux périodes, ce qui peut avoir affecté le cycle de vie des insectes et leur présence sur le terrain. En mars, les températures et l'humidité diffèrent significativement de celles d'avril, ce qui impacte les habitudes de nidification, la disponibilité des ressources alimentaires et l'activité des prédateurs. Par ailleurs, la mise en place d'études longitudinales, couvrant plusieurs saisons et années, permettrait d'examiner plus en détail l'impact des variations saisonnières et environnementales sur la biodiversité des forêts de Tapia.

Les différents sites d'échantillonnage offrent des environnements variés, ce qui peut influencer la composition des échantillons et les résultats de l'étude. Par exemple, le site 2 est situé dans une forêt de Tapia brûlée avec de nombreuses clairières et espaces dégagés. Cette altération du couvert végétal a réduit la densité de Tapia (**Annexe 1**). En revanche, les sites 6 et 7, caractérisés par une végétation luxuriante et des pentes importantes, ont présenté des conditions plus difficiles d'accès, ce qui a pu influencer la méthode d'échantillonnage. Malgré cela, ces sites ont offert un habitat riche et diversifié, ce qui se reflète dans le nombre élevé de spécimens prélevés. De plus, la présence de cultures agricoles à proximité de certains sites, comme le site 6, a introduit des variables supplémentaires, telles que des traitements chimiques et des perturbations humaines, affectant ainsi la biodiversité locale. Cette année, les cultures étaient des haricots verts traités chimiquement, ce qui a pu influencer la composition des échantillons et la diversité des espèces observées.

En discutant avec les locaux, un autre fait a été mis en valeur : la présence de l'humain au sein de ces forêts et la collecte abusive de ce qu'elle offre. Cette présence exerce une pression croissante sur cet écosystème fragile. Les forêts de Tapia sont menacées par l'exploitation abusive des ressources telles que les feuilles, les

fruits et les branches ou encore les vers à soie. Cette collecte excessive et cette présence humaine perturbent non seulement les cycles de régénération des plantes, mais aussi l'équilibre des espèces qui y vivent (Verheggen et al., 2013). Une Malgache m'a confié : « Cela fait maintenant cinq ans que je n'ai plus vu tel papillon ou tel insecte voler ici, alors qu'auparavant, il y en avait en abondance ». Par contre, de plus en plus d'oiseaux, comme le Martin Triste, ont été observés (Diez et al., 2013). Enfin, un seul site, caractérisé par un profil de savane, abrite des thysanoptères, ce qui reflète leur préférence pour des environnements ouverts, chauds et herbacés.

Parmi les divers insectes recensés sur les sites, plusieurs se distinguent comme prédateurs importants des *Borocera*. Les araignées (722 individus recensés), surtout celles qui tissent des toiles, représentent une menace significative pour les *Borocera* adultes, capturant ces derniers (Razafimanantsoa, 2023). En parallèle, des espèces de parasitoïdes, souvent de la famille des Hyménoptères (710 individus recensés), jouent un rôle crucial dans la régulation des populations de landibe (Diez et al., 2013 ; Razafimanantsoa et al., 2013). Selon les résultats, 191 lépidoptères ont été capturés dont 187 chenilles. Sur le site 6, une grande proportion de ces chenilles sont des "*Fangasika*", entrant en compétition alimentaire avec les vers à soie pour les ressources du *Tapia*. Cette dynamique souligne l'équilibre complexe et délicat entre ces différentes espèces dans l'écosystème, illustrant la manière dont les interactions entre prédateurs et ressources influencent la stabilité et la diversité de l'habitat où évoluent ces papillons.

L'inventaire de la biodiversité aurait pu être optimisé en mettant en œuvre d'autres méthodes de piégeage ou en utilisant des techniques plus spécifiques, comme l'utilisation de pièges Malaise ou de cuvettes jaunes pour les Hyménoptères, telle que décrite dans l'étude de Razafimanantsoa et al. (2013) ou encore celle de Broers (2022). Une identification plus approfondie (famille, genre, espèce) de certains ordres aurait permis de recueillir davantage d'informations sur les interactions, les compétitions, ainsi que les effets positifs ou négatifs entre les insectes (Razafimanantsoa, 2023).

## **2. PHYLOGÉNIE DES POPULATIONS DE BOROCERA**

### **2.1. Analyses génétiques**

Le décalage des missions a eu un impact notable sur les cycles de développement des larves et, par conséquent, sur la collecte des échantillons. En effet, la troisième mission, reportée en raison d'un retard dans l'obtention des permis, a coïncidé avec une phase où les larves étaient principalement devenues des cocons. Cette transition a rendu la collecte plus difficile car les cocons sont généralement plus difficiles à détecter que les larves actives. En conséquence, le nombre d'individus échantillonnés a été plus réduit pour les sites 9 et 10, limitant ainsi la diversité et la quantité de données recueillies. Ce décalage a donc non seulement affecté la représentativité des échantillons mais aussi la qualité des analyses ultérieures, soulignant l'importance de respecter des périodes de collecte homogènes.

Parmi les 42 échantillons analysés, seuls 28 (66,6 %) sont restés génétiquement intacts, tandis que 33,3 % ont été dégradés et sont devenus inutilisables. Cette dégradation souligne l'importance d'améliorer les protocoles de manipulation et de conservation des échantillons. Les conditions de transport, telles que la température, l'humidité, la durée du trajet ou encore le pourcentage d'alcool utilisé pour conserver les spécimens peuvent affecter la stabilité de l'ADN, compromettant la qualité des analyses génétiques (Tayutivutikul et al., 2003). Pour minimiser la dégradation de l'ADN et garantir des résultats d'analyse plus fiables, il serait pertinent d'optimiser les conditions de transport et de stockage, par exemple en utilisant des boîtes hermétiques, en

contrôlant rigoureusement les paramètres environnementaux ou, comme recommandé par Tayutivutikul et al., en conservant les spécimens dans de l'éthanol à 100 %.

## 2.1. Analyses phylogénétiques

L'une des principales difficultés dans l'étude des *Borocera* a été l'absence totale de données génétiques préexistantes pour cette espèce, ce qui a limité la possibilité de comparer les résultats avec des références établies et de contextualiser les découvertes. L'article de Patwardhan et al. (2014) met en lumière les défis posés par cette absence de données dans les études phylogénétiques, confirmant que le manque de séquences spécifiques et fiables a compliqué l'interprétation des résultats pour les *Borocera*.

En l'absence de séquences génétiques spécifiques aux *Borocera*, certains échantillons ont été associés à des représentants, qui, dans certains cas, n'appartiennent même pas à la même famille des Lasiocampidae. Malgré le fait que ce soit des papillons que l'on trouve dans les tropiques, à Madagascar ou en Afrique, le *Sena sp.*, *Cyana sp.* et l'*Oenochroma sp.* font respectivement partie des familles de Noctuidae, Erebidae et Geometridae. Cette situation a compliqué l'interprétation des données, limitant la capacité à établir des relations phylogénétiques claires et à comprendre le positionnement évolutif des *Borocera* dans le contexte plus large des lépidoptères. Une solution aurait été de re-séquencer les échantillons ou de choisir d'autres fragments de séquences afin de les re-BLASTER, dans l'espoir d'obtenir des références de gènes COI autres ou plus précises (Mohiuddin Meem et al., 2023).

Pour améliorer cette résolution phylogénétique, il serait intéressant de compléter les données moléculaires par un recensement et un suivi détaillé des caractères morphologiques (Van Der Wal et al., 2019). Cette approche combinée permettrait de renforcer la robustesse des analyses, en particulier dans les groupes où les données génétiques sont limitées. Les caractères morphologiques, tels que l'apparence des larves, leur coloration, la structure des ailes ou encore les motifs corporels, peuvent offrir des informations précieuses qui complètent les séquences génétiques aidant à clarifier les relations évolutives ambiguës. De plus, l'intégration de ces données pourrait révéler des distinctions subtiles entre les espèces ou les populations, qui pourraient ne pas être détectées uniquement par les analyses moléculaires. En associant ces deux types de données, il serait possible d'obtenir une vision plus complète et précise des relations phylogénétiques. L'article de Beutel et al. (2011) souligne l'importance de combiner des données morphologiques avec des données moléculaires pour construire une phylogénie plus robuste.

La question de la significativité des 28 échantillons utilisés dans l'analyse peut aussi être soulevée. Elle dépend de plusieurs facteurs tels que la variabilité génétique au sein de la population étudiée et la robustesse statistique requise pour tirer des conclusions fiables. Par exemple, pour des espèces à forte diversité génétique comme *Borocera cajani*, un échantillonnage de 18 individus pourrait suffire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, tels que démontrés par la corrélation du Test de Mantel. Cependant, un échantillonnage de seulement 5 individus provenant du même site est insuffisant pour être représentatif de la population cible, limitant ainsi les variations génétiques observables (Randrianandrasana, 2014). Il devient donc crucial de réévaluer la taille de l'échantillonnage pour les espèces *Borocera madagascariensis* et *Borocera marginepunctata*, en élargissant les sites d'échantillonnage afin de mieux capturer la diversité génétique de ces populations.

Concernant l'arbre phylogénétique, plusieurs points méritent une analyse approfondie. Tout d'abord, la robustesse des branches, indiquée par les pourcentages de soutien bootstrap élevés, est un élément clé qui témoigne de la fiabilité des relations évolutives représentées. Cependant, il est important de se pencher sur les quelques branches avec des pourcentages inférieurs, qui pourraient indiquer des zones de l'arbre où les

relations évolutives sont moins claires ou moins bien supportées (Edgar, 2004). Ces zones pourraient suggérer une nécessité d'explorer davantage ces relations avec d'autres méthodes comme celle du Maximum Likelihood ou des données supplémentaires, telles que des marqueurs génétiques différents ou une meilleure résolution des séquences.

Ensuite, la longueur des branches, qui reflète la quantité de divergence génétique, offre des informations sur la distance évolutive entre les groupes. L'observation d'une longueur de branche plus importante pour certains clades, comme celui regroupant principalement les *B. marginepunctata*, suggère une divergence évolutive plus marquée (Ashfaq et al., 2011). Il serait intéressant de discuter pourquoi ces spécimens montrent une telle divergence, en examinant des facteurs potentiels tels que la variation géographique, l'adaptation locale, ou l'histoire évolutive des populations. C'est pour cela qu'une analyse approfondie des variations intraspécifiques aurait pu être très intéressante mais le manque de temps n'a pas permis d'explorer cette piste.

L'intégration d'espèces comme *Trichiura crataegi* et *Malacosoma neustria* dans l'arbre permet également de contextualiser les *Borocera* par rapport à d'autres membres des lépidoptères. Le regroupement cohérent de certains échantillons en fonction de leurs gènes de référence, comme ceux avec le gène COI de *Dendrolimus tabulaeformis* ou *Gastropacha quercifolia*, confirme la validité de l'approche phylogénétique utilisée. Cependant, des cas atypiques comme l'échantillon 29, identifié comme un *B. madagascariensis* mais associé à une espèce de Geometridae, soulèvent des questions sur la précision de l'identification ou sur la possibilité de phénomènes comme l'hybridation, les erreurs de séquençage, la contamination entre échantillons ou encore l'existence de lignées cryptiques non reconnues (Ashfaq et al., 2011).

L'analyse des regroupements sur la base de sites géographiques, comme les échantillons d'Amby, bien qu'ils partagent des gènes de référence différents, offre une perspective intéressante sur l'influence de la localité sur la structuration génétique des populations. Cela pourrait amener à discuter de l'impact potentiel des barrières géographiques. L'étude sur la diversité mitochondriale élevée chez les papillons de Madagascar de Linares et al. (2009) renforce l'idée que la structuration génétique des populations peut être fortement influencée par les localités géographiques. Mais, dans ce cas-ci, l'échantillonnage actuel n'est pas suffisamment étendu pour répondre de manière concluante à cette question.

### **3. ESSAI D'UN ÉLEVAGE DE BOROCERA**

Initialement, l'élevage de *Borocera* n'était pas prévu dans le cadre de ce projet. Cependant, étant donné que les protocoles des analyses génétiques liées à la phylogénie semblaient se concentrer principalement sur les individus adultes, il était conseillé d'amener les larves au stade adulte pour obtenir des échantillons adéquats. Cette nécessité d'élever les larves jusqu'à leur maturité s'est imposée en parallèle avec le désir de comparer les données bibliographiques aux observations réelles.

Lors de la mise en place de cet élevage, plusieurs problèmes ont été rencontrés. Le laboratoire d'entomologie, où l'élevage a été installé, n'offrait pas des conditions environnementales idéales pour le développement des larves. La température ambiante, bien que globalement stable, était inférieure à la plage optimale connue des papillons (25°C - 30°C), ce qui a pu affecter leur croissance. De plus, les données de température et d'humidité n'étaient pas contrôlées et relevées de manière stricte comme dans l'étude de Razafimanantsoa et al. (2013). Le mois de mai a été particulièrement froid à Antananarivo (entre 13°C et 24°C), ces températures ont probablement eu un impact négatif sur les vers à soie, affectant leur développement et leur métamorphose. À la fin de l'expérience, un incubateur a été mis en place pour accélérer le développement des cocons et espérer l'émergence des adultes. Cependant, cet incubateur n'a pas donné les résultats escomptés. Non hermétique, il

présentait des trous, ce qui a entraîné des variations de température et d'humidité. Un mâle de l'espèce *B. cajani* s'est échappé par une fissure. Après deux semaines d'utilisation, des problèmes logistiques ont provoqué la défaillance de l'incubateur. Pour un futur élevage, il est essentiel de garantir des conditions optimales avec des équipements adaptés. Bien que les conditions ambiantes soient tolérées, il reste crucial de les surveiller, notamment la température et l'humidité (Razafimanantsoa, 2023). Il faut aussi assurer un espace suffisant pour le développement, l'alimentation et l'émergence des papillons car les chenilles ont besoin de migrer (Diez et al., 2013). Un tel élevage dans des conditions améliorées pourrait réduire la mortalité et augmenter les taux d'émergence. Si ces ajustements sont efficaces, un élevage à plus grande échelle pourrait être envisagé, avec une augmentation du nombre de spécimens. Cette initiative pourrait être proposée à l'insectarium de la capitale (*Za Bibikely*) pour des applications pédagogiques, commerciales et nutritives.

Cependant, des magnaneries traditionnelles (**Annexe 24**) localisées en brousse et fonctionnant sans outils sophistiqués, offrent des résultats impressionnants. Par exemple, le centre de grainage de *Sahatsiho Ambohimanjaka* (région Amoron'i Mania) produit 2 fois par an 3000 à 4000 cocons, dont 3000 sont conservés pour la production et le surplus est relâché dans la forêt voisine, principalement au stade œuf (Razafimanantsoa, 2023). Les connaissances traditionnelles sur les conditions optimales d'élevage permettent une gestion attentive et minutieuse des cycles de développement. Les locaux arrivent à un faible taux de mortalité et un développement harmonieux des *Borocera*. Les papillons sont placés dans des bassines recouvertes de voile et sont triés par stade. Des *Borocera* sauvages sont réintroduits dans l'élevage à chaque génération, ce qui permet de maintenir un élevage bien contrôlé et doté d'une diversité génétique importante (Razafimanantsoa, 2023).

Selon les recommandations des locaux, les *Borocera* mis en élevage doivent être nourris quotidiennement ou tous les 2 jours avec des feuilles fraîches. Étant donné que l'alimentation influence fortement le taux de croissance et la survie des vers à soie, il est essentiel de veiller à la qualité et à la disponibilité de la nourriture (Haubruge et al., 2013 ; Razafimanantsoa et al., 2020).

Les feuilles étaient remplacées quotidiennement au retour des missions puis tous les 2 à 4 jours quand elles étaient mises en élevage. Ce délai plus long n'a pas augmenté la mortalité, car le pot d'eau gardait les feuilles fraîches plus longtemps (Razafimanantsoa et al., 2013). Ainsi, durant l'expérience, aucun *Borocera* n'a manqué de nourriture ou n'a eu de carence alimentaire visible.

Les chenilles avaient une tendance marquée à se nourrir principalement tôt le matin et en début d'après-midi tandis qu'elles se reposaient durant la matinée et en fin d'après-midi (Razafimanantsoa et al., 2013). Elles consomment les feuilles en se positionnant sur les branches ou au fond de la boîte. Leur alimentation est caractérisée par des comportements spécifiques: elles mangent la feuille en ligne ou créent des coupures nettes en forme de cercle. Bien qu'elles soient généralement peu mobiles, elles augmentent leur activité et présentent leur défense si elles sont stimulées par un contact ou un danger. Comme l'ont souligné Razafimanantsoa et al. (2013) dans leur étude, la période d'immobilité des *B. cajani* pourrait représenter une stratégie d'adaptation pour se protéger des prédateurs et se camoufler sur les branches (Razafimanantsoa, 2023).

Le suivi des stades de développement (**Annexe 18**) montre que, malgré des conditions moins optimales, les chenilles ont bien évolué. En deux mois et demi, 33 larves se sont transformées en cocons, et 2 adultes ont émergé. Cela indique que leur développement en élevage est possible, mais il nécessite une attention et des précautions particulières. Un ver à soie qui va effectuer sa métamorphose devient moins mobile, se nourrit moins (Razafimanantsoa et al., 2013) et cherche une surface (feuille, branche, ...) pour y créer son cocon. Lors de la transformation en cocon, la chenille se replie sur elle-même et s'emballe dans des couches de soie qu'elle fabrique. La première est assez claire et brillante. La dernière couche, en revanche, présente une distribution homogène de poils urticants que l'on trouve sur le corps de la larve.

Les mortalités peuvent résulter de divers facteurs tels que des erreurs de manipulation, des conditions de vie inadaptées, des maladies ou encore une mauvaise alimentation (Razafimanantsoa et al., 2013). Un suivi rigoureux des conditions à chaque étape de l'élevage est essentiel pour identifier les problèmes récurrents et développer des solutions visant à améliorer la survie et la croissance des papillons. Malgré les soins apportés, un taux élevé de mortalité a été observé au sein de l'élevage. Des chenilles présentaient des signes de parasitisme, mouraient de manière inattendue, devenaient molles et flasques, ou se desséchaient complètement (Diez et al., 2013). Le parasitisme a été détecté sur 3 larves, qui semblaient saines à première vue. Les parasites sont devenus visibles uniquement dans des conditions anaérobies, dans l'alcool ou lors de la mort des chenilles (Razafimanantsoa et al., 2013). Les autres chenilles présentes dans la même boîte n'étaient pas affectées, suggérant que le problème provenait probablement de la chenille elle-même, potentiellement parasitée dès sa capture sur le terrain. Les chenilles peuvent devenir flasques et vides en mourant de déshydratation, de la décomposition des tissus, de blessures ou de conditions environnementales défavorables. Ici, le premier et le dernier cas sont les plus plausibles. Enfin, certaines chenilles présentaient un corps noirci au moment de leur mort, ce qui pourrait indiquer une infection par la maladie de la flacherie, comme mentionné dans l'introduction.

## Conclusions et perspectives

---

Ce mémoire constitue une contribution à l'étude de la biodiversité entomologique des forêts de Tapia à Madagascar ainsi qu'à la compréhension de la phylogénie des populations de vers à soie du genre *Borocera*. Les résultats ont mis en évidence des divergences génétiques marquées entre différentes populations, soulignant l'importance des facteurs géographiques dans la structuration de la diversité génétique. De plus, l'élevage expérimental de *Borocera* a démontré le potentiel de production de vers à soie sous conditions maîtrisées, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour le développement de la sériciculture à Madagascar.

Les objectifs principaux étaient d'initier la phylogénie des *Borocera*, de comprendre leur dynamique entre différents sites et d'obtenir une vue d'ensemble de la biodiversité entomologique des forêts de Tapia. Sur le plan de la conservation, cette étude souligne l'urgence de renforcer les efforts pour préserver les forêts de Tapia, qui sont des habitats essentiels pour de nombreuses espèces, y compris les *Borocera*. Il est nécessaire de mettre en place des zones protégées et de sensibiliser les communautés locales pour garantir la pérennité de cet écosystème unique. En outre, les recherches sur l'élevage de *Borocera* montrent que la production de soie pourrait être optimisée, offrant ainsi des opportunités économiques pour les populations locales, tout en préservant l'environnement. Les analyses phylogénétiques offrent des perspectives précieuses sur les relations évolutives entre les espèces de *Borocera*, bien que leur portée ait été limitée par l'absence de données génétiques préexistantes pour certaines d'entre elles. Enfin, pour améliorer la résolution phylogénétique, il serait intéressant de combiner les données moléculaires avec des caractères morphologiques, renforçant ainsi les analyses et obtenant une vision plus complète des relations évolutives.

Les perspectives pour des études phylogénétiques plus approfondies sont également ouvertes par les découvertes faites dans ce mémoire. Il serait pertinent d'élargir cette recherche à d'autres espèces de vers à soie pour mieux comprendre les mécanismes évolutifs ou encore de s'attarder sur les relations intraspécifiques. Enfin, l'implication des communautés locales est cruciale pour la réussite des initiatives de conservation et de développement durable. Leur participation active et leur implication, notamment à travers des programmes

d'éducation et de sensibilisation, sera déterminante pour la protection à long terme des forêts de Tapia et des espèces qui y vivent.

Malgré ces défis, l'exploration a réussi à atteindre ses objectifs et a contribué à une meilleure compréhension de la biodiversité et de la dynamique des populations dans cet écosystème unique. Les bases sont posées pour des recherches futures et des actions concrètes visant à protéger la biodiversité de Madagascar tout en explorant des opportunités de développement économique durable.

## Contribution de l'étudiante

Durant 7 mois, l'étudiante a joué un rôle clé et polyvalent dans ce travail de fin d'études. Elle a conçu le protocole expérimental, planifié les phases du projet, et géré l'organisation des missions de terrain, incluant la logistique, le management et la formation des équipes (**Annexe 25**). Une des principales responsabilités était la gestion du budget, qui impliquait l'optimisation des dépenses, la couverture des coûts des trois missions et la négociation avec les fournisseurs sans oublier le suivi administratif et légal de celles-ci (**Annexe 26**). En assurant un suivi rigoureux des résultats et en adaptant les stratégies selon les besoins, elle a démontré une grande capacité à gérer la complexité, les imprévus et à s'engager pleinement dans la réussite du projet dans une logique d'adaptabilité constante et continue.

TFE - TROLIN NAYA		Avant Février	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août
<b>Chronogramme des activités par mois</b>		Belgique		Madagascar				Belgique	
Prise de contact avec les membres du projet et définition des objectifs									
Préparation à la mobilité (papiers administratifs, ...)									
Bibliographie									
Mise en place d'un protocole									
Visite des lieux (insectarium, Université, ...)									
Terrain sur la biodiversité entomologique des forêts de Tapia									
Terrain sur la phylogénie des populations de Borocera									
Identification morphologique des spécimens (Ordre)									
Traitement des données et encodage des spécimens									
Analyses moléculaires									
Analyses descriptives et statistiques									
Rédaction du rapport									
Finalisation / Présentation orale									

Figure 37. Chronogramme des activités déroulées sur 7 mois.

# Bibliographie

---

- Abu-Hashem M.A., Rashid N.A., Abdullah R., Abdulrazzaq A. & Hasan A.A., 2005. FILTERED DISTANCE MATRIX FOR CONSTRUCTING HIGH-THROUGHPUT MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT ON PROTEIN DATA. . Vol. **86**(3).
- Akter K., Meem S.M., Mamun & Hossain M., 2023. UTILIZING COI GENE FOR THE IDENTIFICATION OF THIRTEEN HESPERIIDAE BUTTERFLIES AND DETERMINING THEIR GENETIC RELATIONSHIP **9**(2), DOI:<https://doi.org/10.3329/jbcbm.v9i2.70037>.
- Andriamahatody Z., RAVELOMANANA A. & FRANCIS F., 2024. Pérennisation du succès de repeuplement de la forêt de tapia en ver à soie comestible *Borocera cajani* et vers une gestion durable de cette forêt en tant que lieu de refuge des insectes auxiliaires de l'agriculture.
- Andriamanohera M.A., Rakotoarisoa S.E. & Lehmann C.E.R., 2020. UAPACA BOJERI: Phyllanthaceae. *Curtis's Botanical Magazine* **37**(3), 313–323, DOI:[10.1111/curt.12345](https://doi.org/10.1111/curt.12345).
- Ashfaq M., Ara J., Noor A.R., Hebert P.D.N. & Mansoor S., 2011. Molecular phylogenetic analysis of a scale insect (*Drosicha mangiferae*; Hemiptera: Monophlebidae) infesting mango orchards in Pakistan. *Eur. J. Entomol.* **108**(4), 553–559, DOI:[10.14411/eje.2011.071](https://doi.org/10.14411/eje.2011.071).
- Barsics F., Malaisse F., Verheggen F., Haubruge E. & Razafimanantsoa T.M., 2013. Les ressources sauvages comestibles des bois de tapia : inventaire des produits connus et consommés par les villageois. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/153904/1/chap14.pdf>, (15/08/2024).
- Barsics F., Razafimanantsoa T.M., Minet J., Haubruge E. & Verheggen F., 2013. Nocturnal Moth inventory in Malagasy Tapia woods, with focus on silk-producing species. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/153900/1/chap6.pdf>, (15/08/2024).
- Beutel R.G., Friedrich F., Hörnschemeyer T., Pohl H., Hünefeld F., Beckmann F., Meier R., Misof B., Whiting M.F. & Vilhelmsen L., 2011. Morphological and molecular evidence converge upon a robust phylogeny of the megadiverse Holometabola. *Cladistics* **27**(4), 341–355, DOI:[10.1111/j.1096-0031.2010.00338.x](https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00338.x).
- Birkinshaw C., Margaret Koopman, & Hans Rajaonera, 2003. Ravintsara, a newsletter on Malagasy plants and their conservation. *Missouri Botanical Garden* **1**(2).
- Bouget C. & Nageleisen L.-M., 2009. L'étude des insectes en forêt : méthodes et techniques, éléments essentiels pour une standardisation.
- Broers J., 2022. Évaluation et valorisation de la biodiversité entomologique de Madagascar.
- Cerretti P., Whitmore D., Mason F. & Taglianti A., 2004. Survey on the spatio-temporal distribution of tachinid flies (Diptera, Tachinidae) – using Malaise traps. 229–256.
- Coulon J.G., Lebailly P., Haubruge E. & Verheggen F., 2013. La filière de la soie sauvage à Madagascar : approche socio-économique appliquée à la région d'Arivonimamo. 297–305.
- De Lajonquiere Y., 1972. INSECTES LÉPIDOPTÈRES LASIOCAMPIDAE.
- Diez L., Poncelet M., Rakotoniaina N., Rajoelison G., Verheggen F.J. & Haubruge É., 2013. La soie de landibe : connaissances biologiques et savoir-faire des populations rurales de la région d'Arivonimamo. *In: Les Vers à Soie Malgaches - Enjeux Écologiques et Socio-Économiques*. 287–295.

- Edgar R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**(5), 1792–1797, DOI:[10.1093/nar/gkh340](https://doi.org/10.1093/nar/gkh340).
- Gade D.W., 1996. Deforestation and Its Effects in Highland Madagascar. *Mountain Research and Development* **16**(2), 101, DOI:[10.2307/3674005](https://doi.org/10.2307/3674005).
- Ghosh A., Hossain M., Sohel Abedin M. & Jabber Howlader A., 2019. Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Satyrinae butterflies in Bangladesh using Cytochrome c oxidase subunit I gene **8**(1), 67–74.
- Keklik G., 2023. UNDERSTANDING EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS AND ANALYSIS METHODS THROUGH MEGA SOFTWARE **1**(2).
- Koechlin J., Dorr L.J., Guillaumet J.-L. & Morat P., 1997. Flore et végétation de Madagascar. *Taxon* **47**(3), 783, DOI:[10.2307/1223621](https://doi.org/10.2307/1223621).
- Kull C.A., RATSIRARSON J. & RANDRIAMBOAVONJY G., 2005. Les forêts de tapia des Hautes Terres malgaches. [https://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture/Arbres-Bois-de-Rapport-Reforestation/FICHES\\_ARBRES/tapia-uapaca%20bojeri/Les%20for%C3%AAs%20de%20tapia%20des%20HautesTerres%20malgaches\\_terre-mg24\(2\).pdf](https://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture/Arbres-Bois-de-Rapport-Reforestation/FICHES_ARBRES/tapia-uapaca%20bojeri/Les%20for%C3%AAs%20de%20tapia%20des%20HautesTerres%20malgaches_terre-mg24(2).pdf), (28/03/2024).
- Linares M.C., Soto-Calderón I.D., Lees D.C. & Anthony N.M., 2009. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: A test of the DNA barcoding approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **50**(3), 485–495, DOI:[10.1016/j.ympev.2008.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.11.008).
- Lisan B., February-26-2024. Fiche presentation tapia. <https://www.doc-developpement-durable.org/fiches-arbres/Fiche-presentation-tapia.pdf>, (26/02/2024).
- Mittermeier R.A., BROOKS T., PILGRIM J., HOFFMAN M. & ROBLES GIL P., 2004. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions | Thomas Brooks - Academia.edu. [https://www.academia.edu/1438756/Hotspots\\_revisited\\_Earths\\_biologically\\_richest\\_and\\_most\\_endangered\\_terrestrial\\_ecoregions](https://www.academia.edu/1438756/Hotspots_revisited_Earths_biologically_richest_and_most_endangered_terrestrial_ecoregions), (01/04/2024).
- Mohiudden Meem S., Sohel Abedin M. & Hossain M., 2023. DNA barcoding and phylogenetic relationships of ten butterfly caterpillars. Jahangirnagar University J. Biol. Sci. **8**(3), DOI:<https://doi.org/10.3329/aaajbb.v8i3.68609>.
- Myers N., 1988. Threatened biotas: “Hot spots” in tropical forests. *Environmentalist* **8**(3), 187–208, DOI:[10.1007/BF02240252](https://doi.org/10.1007/BF02240252).
- Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query, August-15-2024. . [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), (15/08/2024).
- Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Ed.), 2014. *Insectes comestibles: perspectives pour la sécurité alimentaire et l'alimentation animale*, Etude FAO forêts, Rome: FAO.
- Otoni C., Bekaert B. & Decorte R., 2017. DNA Degradation: Current Knowledge and Progress in DNA Analysis. In: Schotsmans, E.M.J., Márquez-Grant, N., Forbes, S.L. eds. *Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment*. Wiley, 65–80.
- Pachau L., Kumar S. & Gurusubramanian G., 2012. Analysis of phylogenetic relationship among species of Danainae butterflies using nuclear and mitochondrial gene markers.

[https://mzuir.inflibnet.ac.in/bitstream/123456789/411/1/Lahlimpua%20Pachua%20\(BioTech\).pdf](https://mzuir.inflibnet.ac.in/bitstream/123456789/411/1/Lahlimpua%20Pachua%20(BioTech).pdf),

(15/08/2024).

- Patwardhan A., Ray S. & Roy A., 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *J Phylogenetics Evol Biol* **02**(02), DOI:[10.4172/2329-9002.1000131](https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131).
- Poncelet M., 2013. Tissu social, coopérations et conflits entre les acteurs de la filière soie de landibe dans la région d'Itasy.
- Rajoelison G., 2013. La soie naturelle des Hauts-Plateaux de Madagascar: les facteurs socio-institutionnels entravant une filière dynamique et pérenne.
- Rakotofiringa S., n.d. Biodiversité animale à Madagascar caractéristiques géographiques.
- Rakotondrasoa O.L., Malaisse F., Rajoelison G.L., Gaye J., Razafimanantsoa T.M., Rabearisoa M.R., Ramamonjisoa B.S., Raminosoa N., Verheggen F., Poncelet M., Haubruge E. & Bogaert J., 2013. Identification des indicateurs de dégradation de la forêt de tapia (*Uapaca bojeri*) par une analyse sylvicole.
- Rakotondrasoa O.L., Malaisse F., Rajoelison G.L., Razafimanantsoa T.M., Rabearisoa M.R., Ramamonjisoa B.S., Raminosoa N., Verheggen F.J., Poncelet M., Haubruge É. & Bogaert J., 2012. La forêt de tapia, écosystème endémique de Madagascar: écologie, fonctions, causes de dégradation et de transformation (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*
- Rakotovo L.H., Ramiarison C. & Rajeriarison C., 2014. Monographie nationale sur la diversité biologique : 1 | Convention sur la Diversité Biologique. [https://mg.chm-cbd.net/biodiversity/foi\\_mono\\_biodiv/Monogr1documentnationaux.PDF](https://mg.chm-cbd.net/biodiversity/foi_mono_biodiv/Monogr1documentnationaux.PDF), (01/04/2024).
- Randrianandrasana M., 2014. ANTHERINA SURAKA (LEPIDOPTERA: SATURNIIDAE): ECOLOGY, SYSTEMATICS, AND POTENTIAL ECONOMIC USES TO PROMOTE CONSERVATION IN MADAGASCAR.
- Razafimanantsoa T.M., Malaisse F., Raminosoa N., Rakotondrasoa O.L., Rajoelison G.L., Rabearisoa M.R., Ramamonjisoa B.S., Poncelet M., Bogaert J., Haubruge E. & Verheggen F., 2013. Influence de la plante hôte sur les stades de développement de *Borocera cajani* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology* **66**.
- Razafimanantsoa T.M., Rajoelison G., Ramamonjisoa B., Raminosoa N., Poncelet M., Bogaert J., Haubruge É. & Verheggen F.J., 2012. Silk moths in Madagascar: A review of the biology, uses, and challenges related to *Borocera cajani* (Vinson, 1863) (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16**(2), 269–276.
- Razafimanantsoa T.M., Rakotondrasary L., Hantanirina I.H. & Razafimanantsoa M.S., 2020. Article 37 : Production de « Landibe » *Borocera cajani* (Vinson, 1863) dans son milieu naturel, cas de la forêt de Tapia d'Arivonimamo.
- Razafimanantsoa T.M., Raminosoa N., Rakotondrasoa O.L., Rajoelison G., Bogaert J., Verheggen F., Haubruge E., Rabearisoa M.R., Ramamonjisoa B.S. & Poncelet M., 2013. Silk moths inventory in their natural tapia forest habitat (Madagascar): diversity, population dynamics and host plants. *African Entomology* **Vol. 21**(No. 1), 137–150, DOI:[10.4001/003.021.0123](https://doi.org/10.4001/003.021.0123).
- Razafimanantsoa T.M., Raminosoa N., Rakotondrasoa O.L., Rajoelison G.L., Bogaert J., Rabearisoa M.R., Ramamonjisoa B.S., Poncelet M., Haubruge E. & Verheggen F., 2013. Activité journalière et comportement d'alimentation de *Borocera cajani* Vinson 1863 (Lepidoptera: Lasiocampidae) sur deux de ses plantes hôtes : *Uapaca bojeri* Baillon 1874 et *Aphloia theiformis* (Vahl) Bennett 1840 **66**, 109–116.

- Razafimanantsoa T.M., Razafimanantsoa M.S., Razafindrazanakolona A.D., Rakoto H., Razafimanjato G. & Malaisse F., 2013. Parasitoids of the silkworm *Borocera cajani* Vinson or “Landibe” (Lepidoptera: Lasiocampidae) in the Arivonimamo Tapia forest: Diversity and abundance.
- Razafimanantsoa Z.T.A., 2023. Evaluation de la réintroduction de cocons pour le repeuplement de la forêt de Tapia d'Ambatofinandrahana par *Borocera cajani* Vinson, 1863 (Lepidoptera : Lasiocampidae).
- Tayutivutikul J., Pongprasert W., Royce L.A. & Ruangrit K., 2003. Comparison of Preservation Techniques for Silkworm (*Bombyx mori* L.) DNA Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) Products **2**(2).
- TOUROULT J., POIRIER E. & JOURDAN T., 2021. Inventaire entomologique de la Réserve Biologique Dirigée Nord Grande Terre, Guadeloupe, 2020.
- Van Der Wal C., Ahyong S., Ho S., Lins L. & Lo N., 2019. Combining morphological and molecular data resolves the phylogeny of Squilloidea (Crustacea: Malacostraca). *Invertebrate Systematics* **33**, 89–100, DOI:[10.1071/IS18035](https://doi.org/10.1071/IS18035).
- Vences M., Vieites D.R., Glaw F., Brinkmann H., Kosuch J., Veith M. & Meyer A., 2003. Multiple overseas dispersal in amphibians. *Proc. R. Soc. Lond. B* **270**(1532), 2435–2442, DOI:[10.1098/rspb.2003.2516](https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2516).
- Verheggen F.U. de L.-Ul.> S. agronomiques > E. fonctionnelle et évolutive, Bogaert J.U. de L.-Ul.> F. & Haubruge E.U. de L.-Ul.> V.-R. de G.A.B.T., 2013. Les vers à soie malgaches - Enjeux écologiques et socio-économiques.

(50 réf.)

## Webographie

---

- Afromoths.net, July-23-2024. Moths FrontOffice. <https://www.afromoths.net/species/27116>, (23/07/2024).
- Climat, météo par mois, température moyenne pour Ambatofinandrahana (Madagascar) - Weather Spark, Mars-1-2024. . <https://fr.weatherspark.com/y/103990/M%C3%A9t%C3%A9o-moyenne-%C3%A0-Ambatofinandrahana-Madagascar-tout-au-long-de-l'ann%C3%A9e>, (01/03/2024).
- Climat, météo par mois, température moyenne pour Arivonimamo (Madagascar) - Weather Spark, Mars-1-2024. . <https://fr.weatherspark.com/y/104289/M%C3%A9t%C3%A9o-moyenne-%C3%A0-Arivonimamo-Madagascar-tout-au-long-de-l'ann%C3%A9e>, (01/03/2024).
- Climat, météo par mois, température moyenne pour Ranohira (Madagascar) - Weather Spark, Mars-1-2024. . <https://fr.weatherspark.com/y/103640/M%C3%A9t%C3%A9o-moyenne-%C3%A0-Ranohira-Madagascar-tout-au-long-de-l'ann%C3%A9e>, (01/03/2024).
- Eurofins Genomics T.L., Août-15-2024. Tube Light Run. <https://eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/gatc-services/lightrun-tube/>, (15/08/2024).
- Expédition M., 2020. La soie de Madagascar : un article proposé par Mahay Expédition. *Mahay Expédition*. <https://www.mahayexpedition.com/la-soie-de-madagascar/>, (10/07/2024).
- F. Chevillot, August-15-2024. *Dendrolimus pini* (Linnaeus, 1758) - Bombyx du Pin (Le)-Présentation. [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/54779](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/54779), (15/08/2024).

- Larousse É., August-7-2024a. Définitions : muscardine - Dictionnaire de français Larousse. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/muscardine/53347>, (07/08/2024).
- Larousse É., August-7-2024b. Définitions : pébrine - Dictionnaire de français Larousse. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/p%C3%A9brine/58865>, (07/08/2024).
- Larousse É., August-16-2024c. Définitions : flacherie - Dictionnaire de français Larousse. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/flacherie/33936>, (16/08/2024).
- Lasiocampidae - Galerie et clés de détermination, n.d. . *La Galerie de Quel est cet Animal*. <https://quelestcetanimal-lagalerie.com/lepidopteres/lasiocampidae/#:~:text=Les%20Lasiocampidae%20ou%20bombyx%20sont,blanc%20sur%20l'aile%20ant%C3%A9rieure>, (03/08/2024).
- Madagascar, une île fragilisée | WWF France, Avril-1-2024. . <https://www.wwf.fr/espaces-prioritaires/madagascar>, (01/04/2024).
- Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query, August-15-2024. . [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), (08/08/2024).
- P. Chatard M. national d'Histoire, August-11-2024a. Malacosoma neustria (Linnaeus, 1758) - Livrée des arbres (La), Bombyx à livrée (Le). *Inventaire National du Patrimoine Naturel*. [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/54744](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/54744), (11/08/2024).
- P. Chatard M. national d'Histoire, August-11-2024b. Trichiura crataegi (Linnaeus, 1758) - Bombyx de l'Aubépine (Le). *Inventaire National du Patrimoine Naturel*. [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/54752](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/54752), (11/08/2024).
- Pelsy F., August-7-2024. Martin triste - Acridotheres tristis. <https://www.oiseaux.net/oiseaux/martin.triste.html>, (07/08/2024).
- Phylogénie : définition et explications, February-28-2024. . *AquaPortail*. <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/1802/phylogenie>, (28/02/2024).
- Radiation adaptative : définition et explications, February-28-2024. . *AquaPortail*. <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/10938/radiation-adaptative>, (28/02/2024).
- Radiation évolutive : définition et explications, February-28-2024. . *AquaPortail*. <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/10937/radiation-evolutive>, (28/02/2024).
- Salazar M., 2020. Madagascar : préserver la forêt préserve le secteur de la soie endémique. *Nouvelles de l'environnement*. <https://fr.mongabay.com/2020/01/madagascar-preserver-la-foret-preserve-le-secteur-de-la-soie-endemique/>, (20/01/2024).
- Sigma Aldrich, August-15-2024. Sanger Sequencing Steps & Method. <https://www.sigmaaldrich.com/BE/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>, (15/08/2024).
- WWF France, April-1-2024. Madagascar, une île fragilisée | WWF France. <https://www.wwf.fr/espaces-prioritaires/madagascar>, (01/04/2024).

(22 réf.)

# Annexes

**Annexe 1.** Recensement des arbres et des Tapia présents dans les plots des différents sites des zones d'Itremo (Ambatofinandrahana) et d'Imamo (Arivonimamo). La couleur rouge indique les nombres qui ont changé entre le total d'arbres initialement sur le site et le nombre réel de Tapia. Les autres arbres sont souvent des Hazo kesika (*Pinus spp.*), Hatsikana, Haezana, Voafotsy (*Aphloia theiformis* (Vahl) Bennett, 1840), Voandroza, Mahatratranify, etc.

PLOT	Arbres Site 1	Arbres Site 2	Arbres Site 3	PLOT	Tapia Site 1	Tapia Site 2	Tapia Site 3	PLOT	Arbres Site 6	Arbres Site 7	PLOT	Tapia Site 6	Tapia Site 7
1	3	3	9	1	2	3	8	1	12	8	1	12	8
2	2	2	7	2	2	2	6	2	10	11	2	9	9
3	4	2	10	3	3	2	9	3	6	9	3	6	9
4	2	5	7	4	2	1	7	4	12	7	4	11	7
5	4	4	7	5	4	1	4	5	9	7	5	9	6
6	3	6	6	6	2	1	4	6	8	5	6	7	5
7	6	1	1	7	4	0	1	7	3	6	7	3	5
8	2	5	2	8	2	3	0	8	3	7	8	3	7
9	4	2	6	9	4	0	2	9	7	4	9	5	4
10	2	2	3	10	2	1	0	10	8	6	10	8	5

Arbres présents sur les sites d'Ambatofinandrahana

Tapia présent sur les sites d'Ambatofinandrahana

Arbres présents sur les sites d'Arivonimamo

Tapia présent sur les sites d'Arivonimamo

**Annexe 2.** Fiche de terrain servant à récolter les données botaniques et entomologiques des différents plots. Les légendes servent à accélérer le processus et à optimiser les fiches. Dans la diversité entomologique de la fiche, lorsque des spécimens appartiennent à la même famille/ordre mais qu'ils sont différents morphologiquement, ils sont séparés par un tiret pour effectuer un premier tri visuel.

### FICHE TERRAIN COLLECTE – TFE – TROLIN NAYA

Localité : ..... Environnement : .....

Site de collecte : ..... Climat : .....

Date : / / 2024 Point GPS : .....

Heure de collecte : ..... Altitude : .....

Code de collecte : .....

Méthode de collecte : .....

Prise de photos (dégâts, individus, méthodologie, ...):  OUI  NON

Pied d'arbre	Caractéristiques arbre	Nombre de <i>Borocera</i> échantillonné	Diversité entomologique
1	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		A: 1-2 -1 - ... F: 1-1-3- ...
2	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		
3	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		
4	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		
5	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		
6	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		
7	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		
8	Espèce : Hauteur (m) : % défoliation :		

#### Légende :

**A:** Araignée  
**B:** Blatte  
**C:** Chenille  
**Co:** Coléoptère  
**Coll:** Collembole  
**D:** Diptère

**F:** Fourmis  
**Hé:** Hémiptère  
**Hy:** Hyménoptère  
**M:** Mante religieuse  
**O:** Orthoptère  
**Pap:** Papillon  
**Ph:** Phasme

#### Légende :

**T:** Tapia  
**P:** Pinus sp.  
**Voa:** Voafotsy  
**Vo:** Voandroza  
**Hae:** Haezana  
**Ha:** Hatsikana  
**Ma:** Mahatratranify

**Annexe 3.** Visualisation de la base de données sur la diversité entomologique des différents sites de terrain ainsi que la légende numérotée des ordres présents.

Date_Tri	Plot_rangement	Mois de collecte	Date_col	Method	Commune	LocaliteName	Site	Habitat	Collection code	Plot	Id Order	Order	Family	Stage	Abundance	Nb.sp
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	5	2
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	2	Coleoptera	Elateridae	-	1	1
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	2	Coleoptera	-	-	5	2
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	4	Lepidoptera	-	Chenille	1	2
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	5	Collembola	-	-	1	1
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	6	Hemiptera	Homoptera	-	1	11
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	7	Dthoptera	Acrididae	-	1	1
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	10	Manodea	Manidae	-	1	1
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	11	Asachride	-	-	4	4
23-mai-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	1	13	Psocoptera	-	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	2	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	3	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	2	2	Coleoptera	-	-	3	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	2	4	Lepidoptera	-	Chenille	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	2	11	Asachride	-	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	7	3
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	1	Hymenoptera	-	-	2	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	2	Coleoptera	-	-	12	3
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	4	Lepidoptera	-	Chenille	2	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	6	Hemiptera	Heteroptera	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	7	Psocoptera	Acrididae	-	3	3
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	10	Manodea	Manidae	-	2	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	11	Asachride	-	-	11	7
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	3	13	Psocoptera	-	-	3	3
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	4	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	3	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	4	2	Coleoptera	Scarabidae	-	4	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	4	11	Asachride	-	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	4	13	Psocoptera	-	-	7	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	5	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	8	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	5	2	Coleoptera	-	-	3	3
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	5	4	Lepidoptera	-	Chenille	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	5	11	Asachride	Blaberidae	-	3	3
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	6	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	8	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	6	2	Coleoptera	-	-	2	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	6	3	Diptera	-	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	6	7	Dthoptera	Acrididae	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	6	9	Blatodea	Blaberidae	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	6	11	Manodea	Manidae	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	6	13	Psocoptera	-	-	4	4
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	7	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	5	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	7	2	Coleoptera	Scarabidae	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	7	2	Coleoptera	-	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	7	4	Lepidoptera	-	Chenille	2	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	7	11	Asachride	-	-	4	4
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	9	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	19	3
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	9	2	Coleoptera	Scarabidae	-	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	9	4	Lepidoptera	-	Chenille	5	4
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	10	1	Hymenoptera	Fornicidae	-	6	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	10	2	Coleoptera	-	-	2	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	10	4	Lepidoptera	-	Chenille	1	1
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	10	11	Asachride	-	-	2	2
4-juin-24	PT_21	Mars	9-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	1	Forêt de Tapia	1000	10	13	Psocoptera	-	-	4	3
4-juin-24	PT_21	Mars	10-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	2	Forêt de Tapia brulée	1002	1	1	Psocoptera	Fornicidae	-	6	2
4-juin-24	PT_21	Mars	10-mars-24	PJ	Ambatofinandahana	Ambatomenaloha	2	Forêt de Tapia brulée	1002	1	1	Hymenoptera	-	-	1	1

LEGENDE DES ORDRES	
1	Hymenoptera
2	Coleoptera
3	Diptera
4	Lepidoptera
5	Collembola
6	Hemiptera
7	Orthoptera
8	Acarien
9	Blatodea
10	Manodea
11	Arachride
12	Thysanoptera
13	Psocoptera
14	Psocoptera
15	Odonata

**Annexe 4.** Kit “DNeasy®, Blood and tissues kit (50)” de chez Qiagen (Hilden, Allemagne), servant à extraire l’ADN des échantillons.



**Annexe 5.** Résultats de la quantification d’ADN, réalisée avec un Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/OneC Spectrophotomètre UV-visible à microvolume), sur les 42 échantillons de *Borocera*.

Concentration (ng/µl)	Ratio	Ratio	ESPECE	DILUTION ADN (ng/µl)	TYPE PRÉLEVÉ	21	9,5	1,83	0,51	CAJANI	9,5	L4, moelle-peau	
1	155,2	1,91	1,62	CAJANI	10	L3, segment-peau	22	107,4	2,2	1,82	CAJANI	10	L4, segment-peau
2	12,8	1,44	0,43	CAJANI	12,8	L4, segment-peau	23	61	1,98	0,74	CAJANI	10	L2, segment
3	124,2	2,05	1,24	CAJANI	10	L4, moelle	24	8,3	1,9	0,41	CAJANI	8,3	A, pattes
4	46,1	1,95	0,75	CAJANI	10	L4, moelle-peau	25	219,7	2,1	1,77	CAJANI	10	L3, segment
5	2,6	3,02	0,13	CAJANI	2,6	C, tête	26	167	2,08	1,92	MADAGASCARIENSIS	10	L4, segment-peau
6	108,8	2,19	1,67	CAJANI	10	L4, moelle-peau	27	10,5	/	/	MADAGASCARIENSIS	10,5	L3, segment-peau
7	14,1	1,37	0,29	CAJANI	14,1	L4, moelle	28	311,6	/	/	CAJANI	10	L3, moelle-peau
8	177	2,08	1,87	CAJANI	10	L4, moelle-peau	29	437,5	0,98	0,73	MADAGASCARIENSIS	10	C, intérieur
9	26,6	2,08	0,75	CAJANI	10	L4, moelle-peau	30	51,2	2,02	1,56	MADAGASCARIENSIS	10	C, pattes
10	70,8	2,14	1,26	CAJANI	10	L5, segment-peau	31	50,8	0,84	0,48	CAJANI	10	C, intérieur
11	126,7	2,09	1,53	CAJANI	10	L5, segment-peau	32	107,3	2,09	1,38	MARGINEPUNCTATA	10	L5, moelle-peau
12	72,7	2,36	1	CAJANI	10	L3, moelle-peau	33	1270,7	0,35	0,32	MARGINEPUNCTATA	10	C, intérieur
13	108,1	2,07	2,09	CAJANI	10	C, tête	34	470	2,13	2,25	MARGINEPUNCTATA	10	C, intérieur
14	11,8	1,99	1,01	CAJANI	11,8	C, pattes	35	3,8	1,26	0,25	CAJANI	3,8	C, tête
15	114,1	2,1	1,36	CAJANI	10	L3, segment-peau	36	4,5	1,42	0,39	CAJANI	4,5	C, tête
16	39,7	0,65	0,51	CAJANI	10	C, tête	37	264,1	1,59	1,06	MARGINEPUNCTATA	10	C, intérieur
17	37,3	2,06	1,04	CAJANI	10	L2, segment	38	8,6	1,37	0,34	MARGINEPUNCTATA	8,6	C, peau
18	18,1	1,94	0,54	CAJANI	10	L3, segment-peau	39	3	1,18	0,15	CAJANI	3	C, tête
19	64,4	1,99	1,12	CAJANI	10	L3, segment-peau	40	157,7	2,09	1,6	CAJANI	10	L3, segment-peau
20	9,3	2,38	0,36	MADAGASCARIENSIS	9,3	L4, segment-peau	41	10,8	1,3	0,35	CAJANI	10,8	C, tête
							42	366,3	2,08	1,85	CAJANI	10	C, intérieur
Echantillons refaits :													
2	18,3			CAJANI						10	L4, segment-peau		
7	8,4			CAJANI						8,4	L4, segment-peau		
18	38,6			CAJANI						10	L3, peau		
19	62,7			CAJANI						10	L3, segment-peau		
21	3,5			CAJANI						3,5	L4, peau		
27	135,4			MADAGASCARIENSIS						10	L3, peau-moelle		
40	21			CAJANI						10	L3, peau		
41	24,3			CAJANI						10	C, mue (tête)		
42	6,1			CAJANI						6,1	C, mue tête-patte		



**Annexe 9.** A. Données de poids des 2 échantillons qui ont été coupés (26 et 35) et de la dose de tampon NTI à leur appliquer, B. Dose de tampon NT1 à appliquer aux autres échantillons de *Borocera* dans la purification de l'ADN.

Poids:		26	35
saux gel		1,0775	1,0897
wec gel		1,1778	1,2542
Gel		0,1003	0,1645
		<u>100,3 mg</u>	<u>164,5 mg</u>
2 Tampon :		200,6 µl	329 µl
200 µl Tampon NT1 / 100 µl éch (µl)			

1	3	4	5	6	8	9	10
60	60	60	60	60	60	60	60
11	12	13	14	15	16	17	18
80	60	60	80	80	80	80	80
20	22	23	24	25	26	27	28
80	80	80	80	80	/	80	80
30	31	32	33	34	35	36	37
80	80	80	80	80	/	60	80
38	39	42	29				
60	80	80	80				

**Annexe 10.** Préparation des échantillons purifiés pour les 3 étapes du séquençage Sanger (Sanger Sequencing Steps & Method, Août-15-2024) chez Eurofins Genomics en Allemagne (Tube LightRun, Août-15-2024).

**Informations connexes**

- Préparation et soumission des échantillons

**Exemples d'exigences :**

Prenez 5 µl d'ADN matrice purifié avec l'une des concentrations suivantes :

- ADN plasmidique purifié :
  - 50 - 100 ng/µl
- Produits PCR purifiés :
  - 150-300 pb : 1 ng/µl
  - 300-1000 pb : 5 ng/µl
  - 1000-3000 pb : 10 ng/µl

Ajouter 5 µl d'amorce avec une concentration de 5 pmol/µl (5 µM)

Veillez envoyer un échantillon total de 10 µl dans des tubes de 1,5 ml

Pour garantir la meilleure qualité possible des données de séquence, le volume total de l'échantillon ne doit pas être inférieur à 10 µl.

Nous recommandons de mesurer la concentration d'ADN sur un gel d'agarose.

**Soumission d'échantillons :**



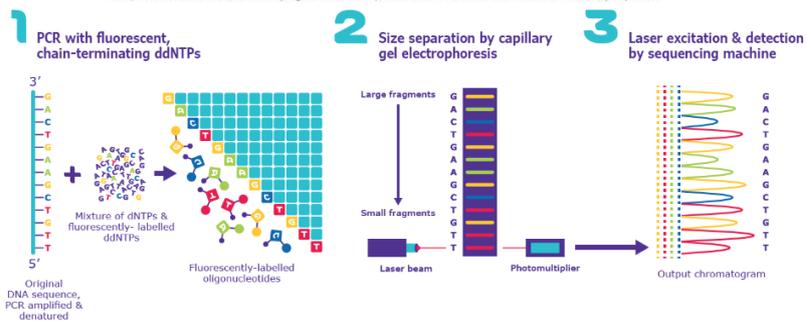
**Condition:**

Les modèles d'ADN doivent être purifiés. Les réactions de séquençage ne peuvent pas être répétées et toutes les réactions seront facturées. Les échantillons ne sont pas stockés. Pour les échantillons contenant des séquences difficiles à lire (riches en GC, structures en épingle à cheveux...), nous recommandons notre service TubeSeq Supreme.

**Amorces de séquençage**

**Conditions d'apprêt optimales :**

- Les amorces ne doivent pas contenir de phosphorylation ou de colorants fluorescents
- La longueur optimale de l'amorce est comprise entre 16 et 25 bases
- La température de fusion de l'apprêt (Tm) doit être de 50 à 62°C
- La teneur en GC de l'amorce doit être de 35 à 60 %
- Idéalement, un G ou un C devrait être situé à l'extrémité 3' de l'amorce
- Le nombre de 3' G ou C ne doit pas dépasser 2 G ou C
- Si possible, évitez >3 bases identiques d'affilée dans la séquence
- Étiquetez vos amorces incluses avec nos étiquettes de tubes gratuites

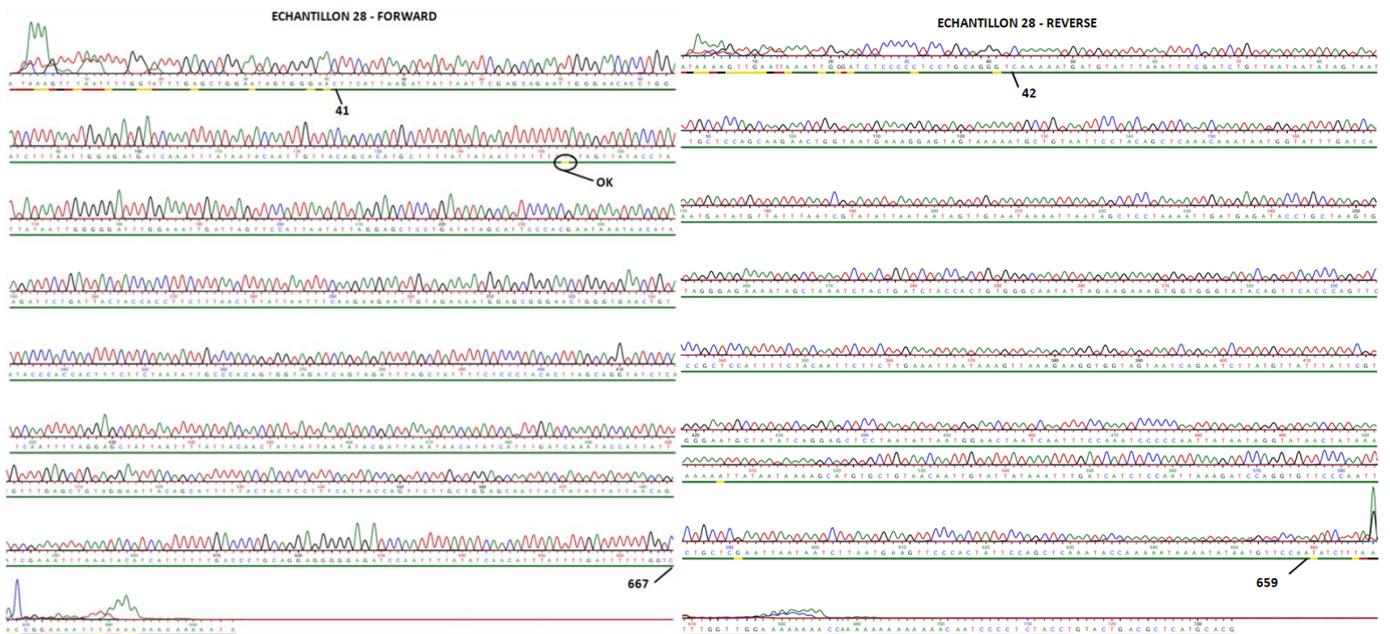


**Annexe 11.** Dilution des échantillons de *Borocera* purifiés pour les ajuster à une concentration de  $\geq 22$  ng/ $\mu$ l.

Dilution des échantillons:		
-1: 86,8	$\rightarrow$	$86,8 \cdot V_i = 50 \cdot V_f \rightarrow C_f = 22,7$ $V_f = 12,67$ $V_i = 18$ $eau = 37,33$
-3: 40,2	$\rightarrow$	$V_f = 32,9$ $V_i = 18$ $eau = 14,9$
-4: 53,0	$\rightarrow$	$V_f = 44$ $V_i = 18$ $eau = 26$
-5: 23,3		
-6: 40,3	$\rightarrow$	$V_f = 40,34$ $V_i = 18$ $eau = 22,34$
-8: 50	$\rightarrow$	$V_f = 40,9$ $V_i = 18$ $eau = 22,9$
-9: 42,3	$\rightarrow$	$V_f = 34,44$ $V_i = 18$ $eau = 16,44$
-10: 31,6	$\rightarrow$	$V_f = 25,85$ $V_i = 18$ $eau = 7,85$
-11: 57,4	$\rightarrow$	$V_f = 47,1$ $V_i = 18$ $eau = 29,1$
-12: 27,6	$\rightarrow$	$V_f = 22,3$ $V_i = 18$ $eau = 4,3$
-13: 43,6	$\rightarrow$	$V_f = 35,67$ $V_i = 18$ $eau = 17,67$
-14: 72,7	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 15,13$ $eau = 34,87$
-15: 61	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 18$ $eau = 32$
-16: 57,7	$\rightarrow$	$V_f = 44,26$ $V_i = 18$ $eau = 26,26$
-17: 20,9		
-18: 44,2	$\rightarrow$	$V_f = 36,1$ $V_i = 18$ $eau = 18,1$
-20: 16,9		
-22: 68,7	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 16$ $eau = 34$
-23: 20,9		
-24: 47,6	$\rightarrow$	$V_f = 39,76$ $V_i = 18$ $eau = 21,76$
-25: 48,8	$\rightarrow$	$V_f = 39,9$ $V_i = 18$ $eau = 21,9$
-26: 20		
-27: 57,4	$\rightarrow$	$V_f = 47,1$ $V_i = 18$ $eau = 29,1$
-28: 42,4	$\rightarrow$	$V_f = 34,7$ $V_i = 18$ $eau = 16,7$
-29: 87,7	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 12,4$ $eau = 37,6$
-30: 7,2	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 15,27$ $eau = 34,73$
-31: 38,4	$\rightarrow$	$V_f = 31,17$ $V_i = 18$ $eau = 13,17$
-32: 67,4	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 16,32$ $eau = 33,68$
-33: 31,6	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 13,98$ $eau = 36,02$
-34: 97,1	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 11,33$ $eau = 38,67$
-35: 22,2		
-36: 14,8		
-37: 77,1	$\rightarrow$	$V_f = 50$ $V_i = 14,26$ $eau = 35,74$
-38: 20,1		
-39: 46,7	$\rightarrow$	$V_f = 37,7$ $V_i = 18$ $eau = 19,7$
-42: 45,7	$\rightarrow$	$V_f = 37,4$ $V_i = 18$ $eau = 19,4$

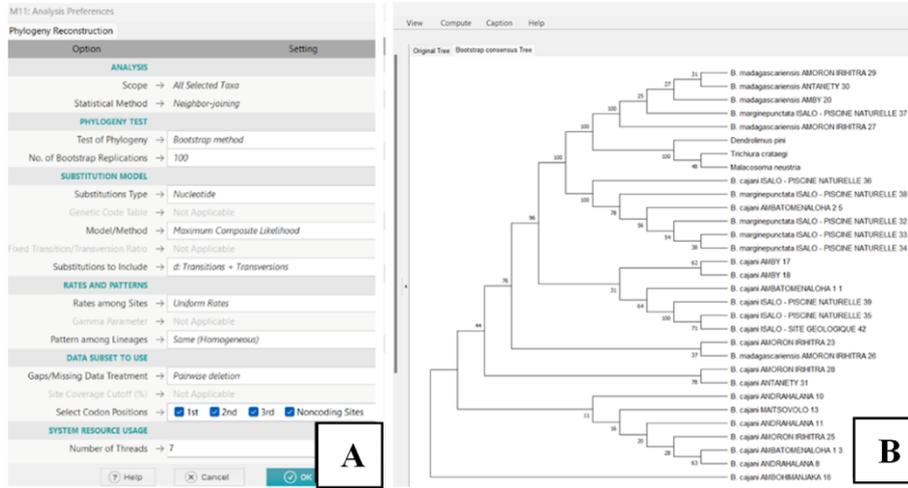
**Annexe 12.** PDF des séquences Forward et Reverse de l'échantillon 28. La séquence la plus longue et de meilleure qualité s'étend de 41 à 667 paires de bases pour le fichier Forward et de 42 à 659 paires de bases pour le fichier Reverse.

Quality: 0 - 9  
 10 - 19  
 20 - 29  
 >= 30





**Annexe 16.** A. Construction d'un arbre phylogénétique sur base de la méthode Neighbor-joining et d'un test bootstrap (100 répliquions, 7 threads), B. Interface du logiciel MEGA 11.



**Annexe 17.** Tableau des données d'élevage des 7 sites, collectées du 9 mars au 21 mai 2024, incluant les informations sur les pertes, la nourriture, les changements de stade, et leur légende.

SITES / DATES		TERRAIN AMBATOFINANDRAHANA																			
		09-03-24	10-03-24	11-03-24	12-03-24	13-03-24	14-03-24	16-03-24	18-03-24	20-03-24	22-03-24	25-03-24	27-03-24	28-03-24	01-04-24	03-04-24	05-04-24	09-04-24	12-04-24	16-04-24	
AMBATOFINANDRAHANA	SITE 1 : AMBATOMENALOHA	LARVE	8	8	8	8	7	7	7	5	5	5	4	4	3	2	2	2	1		
		CHRYSALE					1	1	1	1	1	1	2	2	3	4	4	4	4	5	5
	SITE 2 : AMBATOMENALOHA	LARVE		8	8	8	7	7	6	5	5	5	5	5	4	3	2	2	1	1	1
		CHRYSALE							1		1	1	1	1	2	3	4	4	5	5	5
	SITE 3 : MAROVALAHAVA	LARVE			13	13	13	12	12	11	10	7	7	7	7	6	3	2			
		CHRYSALE			2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	7	8	9	9	9	9
	SITE 4 : MAITSOVOLO	LARVE				2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			1		
		CHRYSALE																			
	SITE 5 : AMBOHIMANJAKA	LARVE				5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	3	2	2		
		CHRYSALE																			
ARVONIMAMO	SITE 6 : AMBY	LARVE BC																			
		CHRYSALE																			
	SITE 7 : AMORON'RHITRA	LARVE BC																			
		CHRYSALE																			
	SITE 8 : ANTANETY	LARVE BC																			
		CHRYSALE																			
	SITE 9 : PISCINE NATURELLE	LARVE BC																			
		LARVE BMP																			
		CHRYSALE																			
		CHRYSALE																			
SITE 10 : SITE GÉOLOGIQUE	LARVE BC																				
	LARVE BMP																				
	CHRYSALE																				
	CHRYSALE																				

**LEGENDE**

TAPIA

GOYAVIER

RIEN

PAS DE MISE EN ELEVAGE

AUCUN SPECIMENT



**Annexe 19.** Mesures de la longueur (cm), largeur (cm) et du poids (gr) des cocons des 7 sites.

S1				COCONS			
	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)				
13-mars	1,7	3,5	2				
25-mars	1,7	3,5	0,9				
28-mars	2,3	4,8	1				
01-avr	2,0	3,5	1				
12-avr	2,3	4,5	5				
S2				S6 - BC			
	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	
16-mars	2,0	3,6	2	19-avr	3,0	5,0	3
28-mars	2,0	3,8	1	19-avr	2,3	4,5	4
01-avr	1,7	3,3	2	19-avr	3,0	4,5	1
03-avr	2,5	4,0	2				
09-avr	2,0	4,0	2				
S3				S7 - BC			
	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	
11-mars	2,0	4,8	5	20-avr	2,5	4,3	2
11-mars	2,5	3,6	1	20-avr	2,0	4,0	2
14-mars	2,5	3,5	2	20-avr	3,0	4,5	5
22-mars	2,3	4,5	1	21-avr	2,0	4,0	1>0
03-avr	2,0	3,5	2	21-avr	2,3	3,8	1
03-avr	2,0	3,6	2	21-avr	2	3,5	1>0
03-avr	2,3	4,0	2	21-avr	3	4,5	1
05-avr	2,2	3,5	2	21-avr	2,5	4,3	1
09-avr	2,5	5,0	5	21-avr	2	3,5	1>0
S4				21-avr	2,3	5	1
	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	21-avr	3,5	4,8	2
01-avr	1,8	3,2	1	21-avr	3	4,5	1
01-avr	1,8	3,5	1	21-avr	2	3,8	2
S5				S8 - BC			
	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	Largeur (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	
27-mars	2,5	5,0	4	18-avr	2,3	3,5	0,5
01-avr	2,2	3,0	1				
09-avr	2,0	3,5	2				
09-avr	1,8	3,8	2				

**Annexe 20.** A. Gène COI de l'espèce *Pernattia pusilla* relié à % à *B. cajani*, B. Gène COI de l'espèce *Dendrolimus tabulaeformis* relié à % à *B. madagascariensis*, C. Gène COI de l'espèce *Gastropacha quercifolia* relié à % à *B. marginepunctata*.

**Pernattia pusilla voucher AZ-07-3112 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial**

Sequence ID: [GU695934.1](#) Length: 658 Number of Matches: 1

A

Range 1: 57 to 612 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
773 bits(418)	0.0	510/556(92%)	0/556(0%)	Plus/Plus

**Dendrolimus tabulaeformis isolate SS110803.062 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial**

Sequence ID: [MF052320.1](#) Length: 618 Number of Matches: 1

B

Range 1: 115 to 568 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
673 bits(364)	0.0	424/454(93%)	0/454(0%)	Plus/Plus

**Gastropacha populifolia angustipennis voucher AYK-04-0980-04 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial**

Sequence ID: [KF491756.1](#) Length: 658 Number of Matches: 1

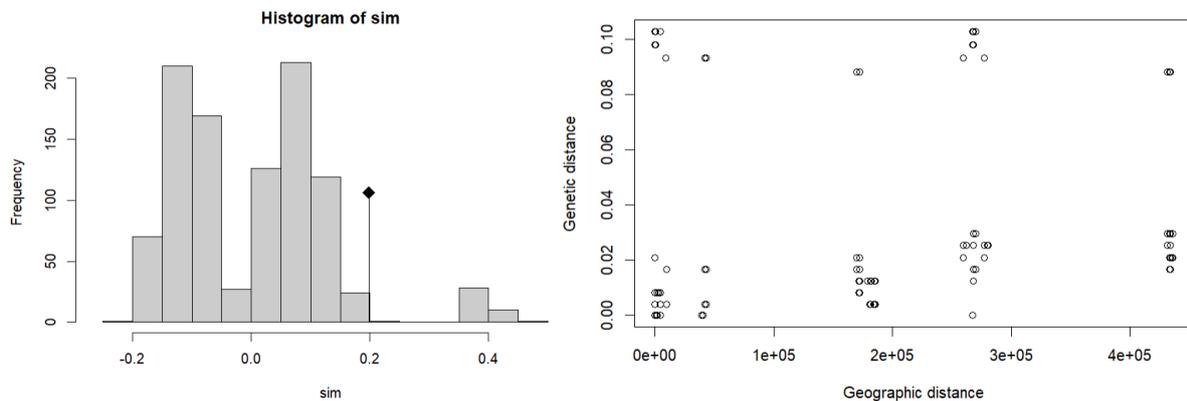
C

Range 1: 44 to 599 [GenBank](#) [Graphics](#)

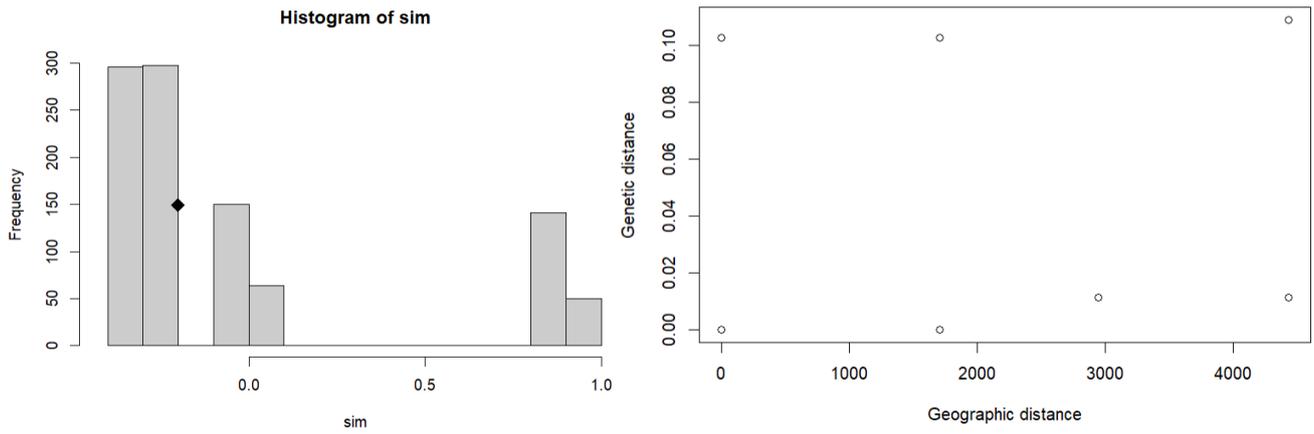
▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
728 bits(394)	0.0	503/557(90%)	1/557(0%)	Plus/Plus

**Annexe 21.** Graphique du test de Mantel, jeu de données des *Borocera cajani*.

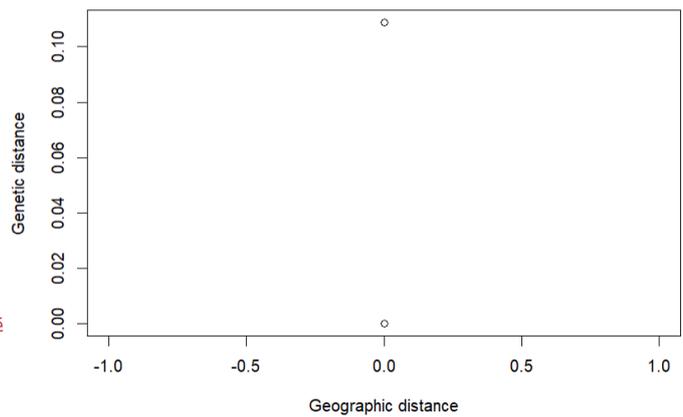


**Annexe 22.** Graphique du test de Mantel, jeu de données des *Borocera madagascariensis*.



**Annexe 23.** Graphique du test de Mantel, jeu de données des *Borocera marginepunctata*.

```
> plot(ibd_test)
Erreur dans plot.window(...): 'xlim' nécessite des valeurs finies
De plus : Messages d'avis :
1: Dans max(h0$count): aucun argument pour max ; -Inf est renvoyé
2: Dans min(x) : aucun argument trouvé pour min ; Inf est renvoyé
3: Dans max(x) : aucun argument pour max ; -Inf est renvoyé
4: Dans min(x) : aucun argument trouvé pour min ; Inf est renvoyé
5: Dans max(x) : aucun argument pour max ; -Inf est renvoyé
```



**Annexe 24.** A. Magnanerie d'Ankhalalana, B. Intérieur de la magnanerie, C. Bassine contenant des chenilles de landibe au stade L3, D. Bassines contenant des cocons vides et cocons défectueux, E. Cage de reproduction (Source : Trolin, 2024).



**Annexe 25.** Calendrier des 4 mois passés à Madagascar avec le déroulement des missions, de temps alloué à l'élevage et du temps passé en laboratoire

LEGENDEACTIVITE	
Weekend	
JOURS OFF	Pas de travail scolaire
TERRAIN	Mission hors de Tana, trajets, collecte
BUREAUTIQUE	Rédaction TFE, Biblio, Excel, traitement des données, Réunions, préparation matériel, budget, ...
ELEVAGE	Nettoyage des boîtes, nourrir les larves, comptage, observations, ...
LABORATOIRE	Traitement des échantillons, travail de binoculaire, identification, ...

FEVRIER		
Date	Programme	Activité
22 février 2024	Arrivée Antananarivo	
23 février 2024	Team building équipe entomo	
24 février 2024	Adaptation et installation	
25 février 2024	Adaptation et installation	
26 février 2024	Adaptation et installation	
27 février 2024	Découverte de l'Université	
28 février 2024	Remaniement du protocole	
29 février 2024	Remaniement du protocole	

AVRIL		
Date	Programme	Activité
1 avril 2024	Elevage et Deadline Introduction	
2 avril 2024	Rédaction	
3 avril 2024	Elevage et réunion budget mission 2	
4 avril 2024	Récapitulatif matériel et besoin des missions	
5 avril 2024	Elevage et traitement des données	
6 avril 2024		
7 avril 2024		
8 avril 2024	Réunion récapitulative mission 2 et budget mission 3	
9 avril 2024	Elevage (mesure de larves, décollement des cocons) + cours de stat	
10 avril 2024	Traitement des échantillons du site 3	
11 avril 2024	Pesées et mesures des cocons, mise en place des boîtes de transport	
12 avril 2024	Check de l'élevage (arrêt de nourriture) + préparation matériel terrain + validation budget	
13 avril 2024		
14 avril 2024		
15 avril 2024	Traitement des échantillons du site 3	
16 avril 2024	Check matériel terrain	
17 avril 2024	Terrain Arivonimamo	
18 avril 2024	Terrain Arivonimamo	
19 avril 2024	Terrain Arivonimamo	
20 avril 2024	Terrain Arivonimamo	
21 avril 2024	Terrain Arivonimamo	
22 avril 2024	Rangement du matériel de terrain, réponse et compte-rendu par mail	
23 avril 2024	Installation des nouveaux individus en élevage, récupération du budget mission 3	
24 avril 2024	Rangement des documents des missions, récapitulatif du budget	
25 avril 2024	Rapport financier, Rapport de mission et encodage des données	
26 avril 2024	Elevage et analyse des échantillons du site 3	
27 avril 2024		
28 avril 2024		
29 avril 2024	Elevage et triage des échantillons	
30 avril 2024	Triage des échantillons	

MARS		
Date	Programme	Activité
1 mars 2024	Remaniement du protocole	
2 mars 2024		
3 mars 2024		
4 mars 2024	Réunion de préparation au terrain	
5 mars 2024	Préparation du matériel et achat	
6 mars 2024	Préparation du matériel et achat	
7 mars 2024	Terrain Ambatofinandrahana	
8 mars 2024	Terrain Ambatofinandrahana	
9 mars 2024	Terrain Ambatofinandrahana	
10 mars 2024	Terrain Ambatofinandrahana	
11 mars 2024	Terrain Ambatofinandrahana	
12 mars 2024	Terrain Ambatofinandrahana	
13 mars 2024	Commencement de l'élevage des Borocera	
14 mars 2024	Traitement des données de terrain + Elevage	
15 mars 2024	Traitement des données	
16 mars 2024	Elevage	
17 mars 2024		
18 mars 2024	Elevage	
19 mars 2024	Réunion préparation mission 2 et 3	
20 mars 2024	Elevage	
21 mars 2024	Rédaction	
22 mars 2024	Elevage	
23 mars 2024		
24 mars 2024		
25 mars 2024	Elevage	
26 mars 2024	Rédaction et biblio	
27 mars 2024	Elevage	
28 mars 2024	Elevage	
29 mars 2024	Jours OFF	
30 mars 2024	Jours OFF	
31 mars 2024	Jours OFF	

MAI		
Date	Programme	Activité
1 mai 2024	Elevage et triage des échantillons	
2 mai 2024	JOUR OFF	
3 mai 2024	JOUR OFF	
4 mai 2024		
5 mai 2024		
6 mai 2024	JOUR OFF	
7 mai 2024	JOUR OFF	
8 mai 2024	JOUR OFF	
9 mai 2024	JOUR OFF	
10 mai 2024	JOUR OFF	
11 mai 2024		
12 mai 2024		
13 mai 2024	Elevage et triage des échantillons	
14 mai 2024	Triage des échantillons	
15 mai 2024	Elevage et triage des échantillons	
16 mai 2024	Rédaction du TFE et du rapport MNP	
17 mai 2024	Elevage et triage des échantillons	
18 mai 2024		
19 mai 2024		
20 mai 2024		
21 mai 2024	Elevage et triage des échantillons	
22 mai 2024	Triage des échantillons	
23 mai 2024	Elevage et triage des échantillons	
24 mai 2024	Terrain Isalo PN	
25 mai 2024	Terrain Isalo PN	
26 mai 2024	Terrain Isalo PN	
27 mai 2024	Terrain Isalo PN	
28 mai 2024	Terrain Isalo PN	
29 mai 2024	Terrain Isalo PN	
30 mai 2024	JOUR OFF	
31 mai 2024	Rapport RF, comptes et début du rapport MNP	

JUN		
Date	Programme	Activité
1 juin 2024		
2 juin 2024		
3 juin 2024	Rapport RF, Compte-rendu DREDD et triage échantillons	
4 juin 2024	Triage des échantillons	
5 juin 2024	Triage des échantillons	
6 juin 2024	Triage des échantillons	
7 juin 2024	Triage des échantillons	
8 juin 2024		
9 juin 2024		
10 juin 2024	Elevage et triage des échantillons	
11 juin 2024	Etude Espagnol	
12 juin 2024	Etude Espagnol	
13 juin 2024	Examen d'Espagnol	
14 juin 2024	Triage des échantillons et base de données	
15 juin 2024		
16 juin 2024		
17 juin 2024	Rangement matériel, base de données	
18 juin 2024	Finitions	
19 juin 2024	Rangement et valises	

## Annexe 26. Liste du matériel et du coût financier de la mission d'Arivonimamo.

	Domaine	Désignation	Utilisation et détails	Notes	Nombre	Fournisseur	Prix unitaire	Prix total	Réel coût
1	Accommodation	Ordre de route	pièces justificatives de la mission		2	Nante	-	-	5.000
2	Accommodation	Assurance	Assurance voyage		2	Nante	10.000	20.000	6.000
3	Hébergement	Hébergement	Nuitée des équipes sur terrain	3 nuits * 2 personnes	6	Nante	20.000	120.000	100.000
4	Matériel terrain	Parapluie japonais	Récolte spécimens	Drap de 1m sur 1m	2	Université	-	-	-
5	Matériel terrain	Parapluie japonais	Colliers métalliques et Tubes PPR		4	Université	-	-	-
6	Matériel terrain	Pillulier 100 ml	1 paquet de 30 piluliers	2 sites x 1 collecte x 10 plots (1paquet)	1	Université	-	-	-
7	Matériel terrain	Alcool 90°	Liquide de conservation	40 ml par échantillon --> bouteille d'un litre	1	Pharmacie Ankadifotsoa	19.600	19.600	19.600
8	Matériel terrain	Fiche de collecte	Fiche de données (plot x site)	1 fiche de collecte par plot, 2/page	10	Imprimerie	-	-	-
9	Matériel terrain	Documents	Code collection, matériel, agenda, dispositif	2 pages/document	7	Imprimerie	100	700	1.100
10	Matériel terrain	Pince dure	Préhension des spécimens		1	Etudiant	-	-	-
11	Matériel terrain	Pince molle	Préhension des spécimens		2	Etudiant	-	-	-
12	Matériel terrain	Ciseaux	Découper le matériel		1	Etudiant	-	-	-
13	Matériel terrain	Crayons	Notes terrain		2	Etudiant	-	-	-
14	Matériel terrain	Support écriture	Notes terrain		1	Etudiant	-	-	-
15	Matériel terrain	Cahier de note	Notes terrain		1	Etudiant	-	-	-
16	Matériel terrain	Marqueurs	Notes terrain		2	Etudiant	-	-	-
17	Matériel terrain	Corde	Cordes déjà achetées	1 de 50m, 1 de 20m	2	Université	-	-	-
18	Matériel terrain	Corde	Corde 100 m	Corde bleue sur bâton	1	Université	-	-	-
19	Matériel terrain	Boite 3L pour larves	Transport des papillons vivants	Collecte ver à soie	10	Université	-	-	-
20	Matériel terrain	Cartons	Transport des spécimens	Rangement	3	Université	-	-	-
21	Matériel terrain	Bac de rangement	Rangement flacons 100 ml		2	Université	-	-	-
22	Matériel terrain	flague	marquage des plots	1 m * 6000Ar	1	Magasin Nante ?	6.000	6.000	3.000
23	Salaires	Per-diem technicien	Salaires / jour Nante		4	Nante	60.000	240.000	240.000
24	Salaires	Salaires Assistant	2 assistants / jour	2 assistants * 4 jours	8	Nante	10.000	80.000	90.000
25	Transport	Déplacements sur terrain	par personne et par jour	2 déplacements * 2 personnes	4	Nante	6.000	24.000	29.000
26	Transport	Trajet taxi brousse	Trajet Tana - Arivonimamo	(2 places + 1 de matériel)*2	6	Nante	8.000	48.000	18.000
							<b>TOTAL</b>	<b>558.300</b>	<b>511.700</b>
								<b>111,66 €</b>	<b>102,34 €</b>
							<b>ECONOMIE</b>		<b>46.600</b>
									<b>9,32 €</b>