



HAL
open science

Histoire d'une convergence évolutive : évolution des défenses chimiques au sein de communautés de papillons mimétiques amazoniens

Ombeline Sculfort

► To cite this version:

Ombeline Sculfort. Histoire d'une convergence évolutive : évolution des défenses chimiques au sein de communautés de papillons mimétiques amazoniens. Biochimie [q-bio.BM]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2019. Français. NNT : 2019MNHN0016 . tel-03413104

HAL Id: tel-03413104

<https://theses.hal.science/tel-03413104>

Submitted on 3 Nov 2021

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

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

Muséum National d'Histoire Naturelle



École Doctorale 227
Sciences de la Nature et de l'Homme : évolution et écologie

Année 2019

N° attribué par la bibliothèque
|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur Du Muséum National d'Histoire Naturelle

Spécialité : Biologie – Chimie – Evolution

Présentée et soutenue publiquement par

Ombeline Sculfort

Le 18 décembre 2019

*Histoire d'une convergence évolutive :
évolution des défenses chimiques au sein de communautés
de papillons mimétiques amazoniens*

Sous la direction de :

Madame Violaine Llaurens, Chargée de recherche, CNRS, Directrice de thèse

Monsieur Bastien Nay, Directeur de recherche, CNRS, Directeur de thèse

Devant le jury :

Madame Martine Maibèche, Professeure, Sorbonne Université, Rapporteur

Monsieur Michel Baguette, Professeur, MNHN, Rapporteur

Madame Laurence Després, Professeure, Université Grenoble Alpes, Examinatrice

Madame Magali Proffit, Chargée de recherche, CNRS, Examinatrice

Monsieur Mathieu Chouteau, Chargé de recherche, CNRS, Examineur



*« Sur les ailes déployées de ces papillons,
la Nature écrit comme sur une tablette
l'histoire des modifications des espèces »*

Henry Walter Bates, Un naturaliste sur le fleuve Amazone, 1863

Pour la Science

Résumé de thèse

De nombreuses espèces de papillons aposématiqués possèdent des défenses chimiques associées à des patrons de coloration vifs constituant un signal d'alerte visuel pour les prédateurs. En population naturelle, il est fréquemment observé des convergences évolutives de ces motifs colorés entre espèces phylogénétiquement distantes. Ainsi, des « cercles mimétiques » formés de plusieurs espèces à l'apparence similaire émergent localement. Ces interactions de mimétisme Müllérien sont positives pour les papillons. En effet, plus le nombre d'individus et/ou d'espèces partageant le même motif est grand, plus ce signal d'alerte est efficacement appris par les prédateurs qui subissent les effets des défenses chimiques. Bien que l'évolution de l'aposématisme ne soit pas totalement élucidée, l'évolution des défenses chimiques au sein des lignées de lépidoptères a probablement joué un rôle important dans l'émergence de la convergence évolutive pour le signal d'alerte coloré entre espèces mimétiques.

Dans le cadre de cette thèse je m'intéresse à des papillons mimétiques, principalement de la tribu des Heliconiini mais aussi de la tribu des Ithomiini (Nymphalidae). Ces deux clades ont divergé il y a 82 millions d'années. Si des espèces de ces deux tribus ont convergé vers un même patron de coloration, elles présentent en revanche des défenses chimiques très différentes dont les voies d'acquisition sont contrastées, ce qui peut causer d'importantes variations intra et interspécifiques qui à leur tour ont des conséquences sur le comportement des prédateurs et la dynamique du mimétisme. Les Heliconiini séquestrent des glucosides cyanogènes au stade larvaire à partir des feuilles de passiflores (Passifloraceae) mais synthétisent aussi de façon endogène ces métabolites secondaires tout au long de leur vie. En revanche, chez les Ithomiini, les défenses chimiques proviennent d'alkaloïdes pyrrolizidiniques acquis principalement au stade adulte à partir de fleurs ou végétaux en décomposition de la famille des Asteraceae, des Boraginaceae et des Apocynaceae. Les origines végétales variées et la possibilité d'une voie endogène des défenses chimiques ainsi que la différence dans les stades développementaux où elles sont acquises (chenille ou adulte) suggèrent une évolution différente des défenses chimiques dans ces deux tribus.

Au cours de cette thèse j'ai pu montrer que la considération du mimétisme Müllérien est cruciale pour l'implémentation de modèle théorique visant à comprendre les boucles de

rétroaction entre mimétisme, aposématisme et spécialisation sur les plantes hôtes. L'analyse des variations qualitatives et quantitatives des glucosides cyanogènes d'Heliconiini sauvages a mis l'accent sur l'influence des relations phylogénétiques mais aussi de facteurs écologiques : interaction mimétique, spécialisation à la plante hôte et micro-habitat, sur l'évolution des défenses chimiques. Elever des Heliconiini en conditions contrôlées précisa les variations des défenses chimiques au cours du développement et le contrôle génétique sur les glucosides cyanogènes synthétisés. Les papillons de ces deux tribus peuvent séquestrer un très grand panel de molécules candidates aux vues de la diversité des molécules produites par les plantes. Pourtant, la diversité des molécules de défenses connues des Heliconiini est assez restreinte contrairement à celle des Ithomiini. En exploitant des techniques de chimie analytique j'ai pu explorer la diversité des glucosides cyanogènes des Heliconiini et des alcaloïdes pyrrolizidiniques des Ithomiini pour tenter de découvrir de nouvelles molécules de défenses. La combinaison d'approches méthodologiques : de modélisation, de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, de signal phylogénétique, d'élevage de papillon, d'imagerie par spectrométrie de masse et de réseau moléculaire a permis d'explorer des questions évolutives en alliant biologie, chimie des substances naturelles et phylogénie.



Thesis summary

Many species of aposematic butterflies express chemical defences associated with bright colour pattern perceived as a visual warning signal by predator. Within natural population, evolutionary convergent for a given colour pattern is frequently observed between phylogenetical distant species. Locally, this leads to the emergence of “mimicry rings” composed by several species sharing a given colour pattern. Müllerian mimetic interactions are positive for butterflies. Indeed, the more individuals and/or species share a given colour pattern, the better the warning signal is learnt by predator which undergo chemical defence effects. Although aposematism evolution is not fully understood, chemical defence evolution probably played an important role in the emergence of evolutionary convergence toward a coloured warning signal among mimetic species.

As part of this thesis, I was interested in mimetic butterflies mostly from the Heliconiini tribe but also from the Ithomiini tribe (Nymphalidae). These two clades have diverged 82 million years ago. Although some species from these tribes have converged toward a given colour pattern, they express dramatically different defensive compounds acquired by contrasted ways. Important chemical defence variations can have consequences on predator’s behaviour and then on the whole mimicry dynamic. During larval stage, Heliconiini butterflies sequester cyanogenic glucosides from passion-vines (Passifloraceae) but also synthesize these metabolites through their lifetime. By contrast, Ithomiini uptake pyrrolizidine alkaloids mostly during adulthood from flowers and spoiled plants from Asteraceae, Apocynaceae and Boraginaceae families. The multitude plant sources and the possibility of an endogen synthesis of chemical defences, as well as their acquisition during different developmental stage (caterpillar versus adult) suggest a different evolution of chemical defences within these two tribes.

During this thesis, I showed that considering Müllerian mimicry is a crucial factor to design theoretical models aiming to unravel interplays between mimicry, aposematism and host plant specialization. Within wild Heliconiini, analysing qualitative and quantitative variation of cyanogenic glucosides highlighted the strong influence of phylogenetic relationship but also ecological factors: mimicry, host plant specialization and local habitat, on chemical defence evolution. Rearing Heliconiini in controlled conditions helped characterising chemical defence

variation over developmental stages and the genetic control over cyanogenic glucoside synthesis. Theoretically, butterflies from these two tribes can sequester a plethora of molecules in regards of the wide diversity of secondary metabolites produced by plants. Within Heliconiini, the panel of known defensive metabolite is pretty narrow by contract to the Ithomiini one. Taking advantage of analytical chemistry methods, I explored the diversity of cyanogenic glucosides from the Heliconiini tribe, and pyrrolizidine alkaloids from the Ithomiini tribe, and I tried to reveal new defensive molecules. The combination of different methodological approaches: modelling, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, phylogenetic signal, rearing butterflies, imaging mass spectrometry and molecular network allowed me to explore evolutionary thematic by associating biology, natural product chemistry and phylogeny.



Remerciements

J'en avais rêvé petite et c'était devenu mon objectif, j'y suis arrivée et je peux maintenant m'envoler vers de nouveaux horizons (tropicaux).

Merci Violaine et Bastien, mes chers directeurs de thèse, pour avoir concocté un sujet si fascinant et me l'avoir confié aveuglément (mais surtout avec confiance). Cela a été un plaisir de travailler avec vous, sereinement et avec une très grande liberté qui m'est précieuse. Violaine, merci pour tout, pour ta présence et d'avoir surfé avec moi autant aux sommets que dans le creux des vagues. J'aurais beaucoup appris de toi et j'espère pouvoir m'en inspirer (tout comme toi Maryse, ton prénom me vient quand je pense aux personnes qui m'inspirent). Marianne, heureusement que tu étais là, toujours disponible (une prouesse !), toujours avec une idée d'avance et des critiques constructives !

J'ai beaucoup aimé mon environnement de travail, ma fine équipe et les fleurs du jardin des plantes l'ont rendu encore plus agréable. Mes super compères de thèse, Camille, Charline et Léa, toujours prêts à se fendre la poire, à s'arracher les cheveux sur R et à partager du chocolat pour se remonter le moral.

Je suis plus qu'heureuse d'avoir mis les pieds dans les prémices de « l'Enfer Vert » et je compte bien y retourner. Au Pérou, j'ai pu rencontrer des Canadiens et des chats formidables ! Merci Melanie et Mathieu pour votre base scientifique et le bon temps passé ensemble. Votre expérience du terrain et de l'élevage de papillon m'aura été plus que bénéfique.

J'ai pu mener ma thèse à bien en collaborant avec toute une petite armée de gens passionnés (et j'ai la pression pour ne pas oublier quelqu'un) : après m'être fait embringer dans la modélisation par Violaine, Thomas a pris le relais avec toute la pédagogie et la bienveillance qu'on lui connaît. Trouver un moyen d'analyser correctement mes échantillons de papillons aura été un grand casse-tête, qu'Erika a pu m'aider à résoudre, direction le laboratoire de l'Université de Copenhague pour des analyses à la chaîne en fin de thèse. J'ai eu le chic de m'embarquer dans un domaine complètement exploratoire, détecter les défenses chimiques des Heliconiini en utilisant l'imagerie en spectrométrie de masse dans le laboratoire d'Edith. Un vrai défi qui m'a emballé et rembarré, même en m'appuyant sur Thomas, mon gourou de la mouche ; il paraît que la droso on y revient toujours... En fait j'aurais vraiment découvert la

chimie analytique et le de réseau moléculaire qui m'a tapé dans l'œil. Une aubaine d'avoir fait la connaissance de Grégory, spécialiste dans le domaine. Merci à toutes les personnes de mon unité de chimie, UMR 7245 MCAM, qui m'ont aidé quand j'avais besoin d'emprunter du matériel !

Paradoxalement, plus j'avance dans la recherche, moins je sais de choses... Cette corrélation négative doit bien suggérer qu'il y a de l'avenir dans le domaine !

Ce travail de thèse a bénéficié d'une aide de l'Etat gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du LabEx ANR-10-LABX-0003-BCDiv, dans le cadre du programme Investissements d'avenir portant la référence n° ANR-11-IDEX-0004-02 (voilà c'est dit tout bien comme il faut). Grâce à cet argent, j'ai aussi pu participer à plein de congrès nationaux et internationaux pour partager mes recherches et j'en garde toujours de bons souvenirs.

Merci Papa Minmin, d'avoir eu l'élégance de nous élever « dans la forêt ». Merci de m'avoir laissé retourner les pierres, mettre les mains dans les massifs, collectionner tout plein de merveilles, des plumes, des coquillages, des crânes, des insectes morts, des nids, des œufs, des algues... Et d'avoir stimulé Minouchette avec des livres, des imageries, des sorties et de m'avoir encouragée à faire les études et les stages que je voulais, ça crée des vocations.

Coucou Magali et Benoît !

Camille, Lise et Johanna, vous êtes mes meilleures amies et votre présence dans ma vie fait mon équilibre.



Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
PROBLEMATIQUE	47
Chapitre I : Evolution of conspicuousness in defended species involved in Müllerian mimicry.....	54
Chapitre II : Variation of chemical compounds in wild Heliconiini reveals ecological factors involved in the evolution of chemical defences in mimetic butterflies	843
Chapitre III : Environmental and genetic factors shaping chemical defences in aposematic butterflies.	117
Chapitre IV : Peut-on explorer qualitativement le panel des défenses chimiques des Heliconiini et déterminer leur allocation ?.....	137
Chapitre V : Quelles sont les défenses chimiques des papillons mimétiques des Heliconiini ? Diversité des alcaloïdes pyrrolizidiniques des Ithomiini.	171
DISCUSSION GENERALE.....	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	213



INTRODUCTION GENERALE

Adaptation des papillons à des plantes hôtes chimiquement défendues

Les relations plantes – herbivores déchainent les passions des naturalistes et scientifiques depuis des siècles. En 1964, Ehrlich et Raven inspirés des travaux de Brues sur les interactions papillons – plantes hôtes, formulent l’hypothèse de coévolution entre espèces (Brues, 1924; Ehrlich & Raven, 1964). Cette théorie stipule que les défenses des plantes exercent une pression de sélection sur leurs herbivores et que cela peut éventuellement conduire à la sélection d’individus porteurs de mutation leur permettant de surpasser les défenses des plantes. L’adaptation des herbivores aux défenses des plantes exerce en retour une forte pression de sélection sur ces dernières. L’influence réciproque des espèces en interaction peuvent entraîner des changements évolutifs successifs d’un ou plusieurs traits et peuvent ainsi mener à la formation de nouvelles espèces. L’enchaînement de cycles d’émergence d’attaques et contre-attaques est souvent qualifié de « course aux armement » ou « d’hypothèse de la Reine Rouge » (Van Valen, 1973).

Les plantes et herbivores interagissent notamment via des médiateurs chimiques (Zagrobelny *et al.*, 2008). Ce sont des molécules de petite taille en général, qui peuvent induire une réponse comportementale et/ou physiologique chez l’autre partenaire de l’interaction (Hossaert-McKey *et al.*, 2012). Les plantes produisent une multitude de métabolites perçus par les herbivores dans des processus d’attraction, de répulsion, de défense et d’attaque (Detzel & Wink, 1993; Li & Ishikawa, 2006; Chantawee & Soonwera, 2018). En retour, les herbivores ont acquis des mécanismes leur permettant de contourner et manipuler les défenses chimiques des plantes, via des voies métaboliques de détoxification, excrétion ou séquestration des composés chimiques en jeu (Nishida & Fukami, 1990; Pentzold *et al.*, 2014).

Parmi les espèces animales décrites (953 434 espèces décrites pour une estimation totale de 7,77 millions), au moins une sur quatre est un insecte herbivore (Janz *et al.*, 2006; Mora *et al.*, 2011). Les interactions plantes – insectes sont au cœur des investigations scientifiques comme support d’études des phénomènes de l’évolution et de l’écologie. Les lépidoptères (Lepidoptera), communément appelés papillons, forment l’un des clades d’insectes phytophages les plus riches en terme de nombre d’espèces (Kristensen, 1999). Les données

considérables sur les interactions papillons – plantes hôtes en font un modèle privilégié pour analyser en particulier les mécanismes évolutifs de coévolutions dans un contexte de défenses chimiques. Les tandems les plus intensément étudiés regroupent : les familles des piérides (Pieridae) et brassicacées (Brassicaceae, anciennement Cruciferaeae), le genre des monarques (*Danaus*, Nymphalidae : Danainae) et des asclépiades (*Asclepias*, Asclepiadaceae) ainsi que la tribu des Heliconiini (Nymphalidae : Heliconiinae) et la famille des passifloracées (Passifloraceae) (Fig. 1) (Brower *et al.*, 1972; Benson *et al.*, 1975; Braby *et al.*, 2012).

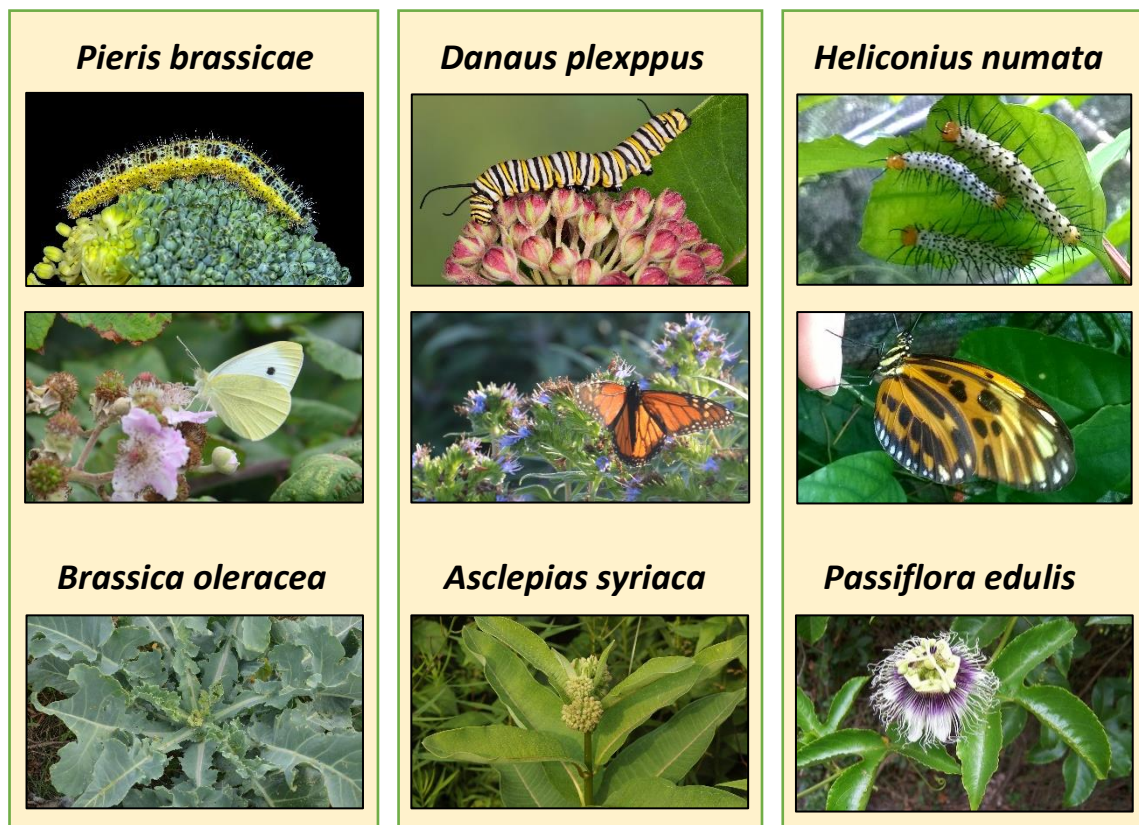


Figure 1 : Illustration de quelques systèmes modèles pour l'étude des mécanismes de coévolution entre plantes hôtes et papillons chimiquement défendus. Colonne de gauche la piéride du chou *Pieris brassicae* au stade larvaire et adulte ainsi qu'une de ses plantes hôtes : le chou commun *Brassica oleracea*. Crédits photos : Didier Descouens, Ombeline Sculfort pour l'adulte et sa plante hôte. Colonne du milieu, le monarque *Danaus plexippus* et la plante hôte *Asclepias syriaca*. Crédits photos : Fondation David Suzuki, Ombeline Sculfort et Derek Ramsey. La présente thèse s'ancre dans le système Heliconiini – Passifloraceae représenté colonne de droite avec le papillon *Heliconius numata* et la passiflore *Passiflora edulis*. Crédits photos : Ombeline Sculfort pour les papillons et Bruno Navez pour la passiflore.

Heliconiini et Passifloraceae : partenaires d'interactions évolutives

Grâce aux prospections naturalistes et scientifiques, une quantité importante d'observations et de données existent sur les interactions entre les Heliconiini et leurs plantes hôtes de la famille des Passifloraceae (Benson, 1978; Brown, 1981; Gilbert, 1982). Ils sont autant connus pour patrons de coloration chatoyants et contrastés que pour leur association très étroite avec les Passifloraceae ayant pourtant évolué plusieurs traits physiques et physiologiques avantageux contre la plupart des herbivores.

Heliconiini (Nymphalidae : Heliconiinae), une diversité fascinante

Les Heliconiini constituent la famille des Heliconiinae avec trois autres tribus : Acraeini (régions tropicales d'Amérique et Afrique), Argynniini (régions tempérées, alpines et arctiques), Vagrantini (distribués en Asie) (Penz & Peggie, 2003). Les Heliconiini sont des papillons américains dont la répartition s'étend des Etats-Unis à l'Argentine en passant par les Galapagos, les Bermudes, les Caraïbes, les Antilles et Hawaii (où ils ont été introduit comme prédateurs naturels pour lutter contre les passiflores invasives) (Brown, 1981; Waage *et al.*, 1981; Rosser *et al.*, 2012). La diversité des espèces atteint son paroxysme dans le bassin amazonien supérieur ou les aires de répartition des espèces andéennes et de basse-Amazonie se chevauchent (Fig. 2) (Rosser *et al.*, 2012). Les relations d'apparentements entre les espèces des Heliconiini ont récemment été mises à jour grâce aux techniques de la phylogénie moléculaire, en se basant sur 22 marqueurs mitochondriaux et nucléaires et en prenant en compte 92% des espèces de la tribu (Fig. 3) (Kozak *et al.*, 2015). Cette tribu de papillons compte 77 espèces et 8 genres : *Agraulis*, *Dione*, *Dryadula*, *Dryas*, *Eueides*, *Heliconius*, *Philaethria* et *Podotricha* (Kozak *et al.*, 2015).

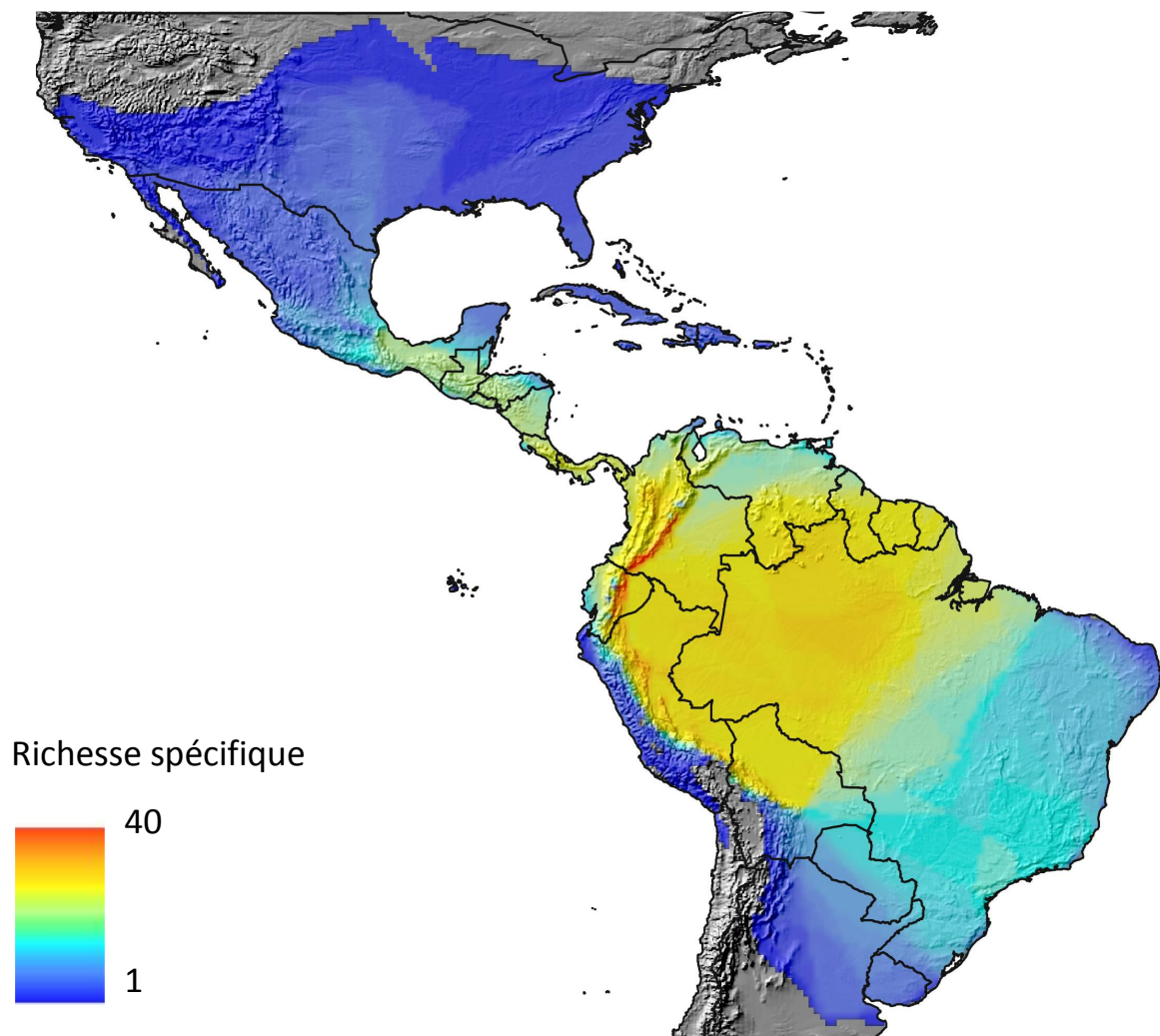


Figure 2 : Aire de distribution et richesse spécifique des *Heliconiini*. Illustration d'après Rosser et al. (2012). Le code couleur représente le nombre d'espèces présente au sein d'une localité (minimum : bleu foncé = 1 espèce, maximum : rouge = 40 espèces).

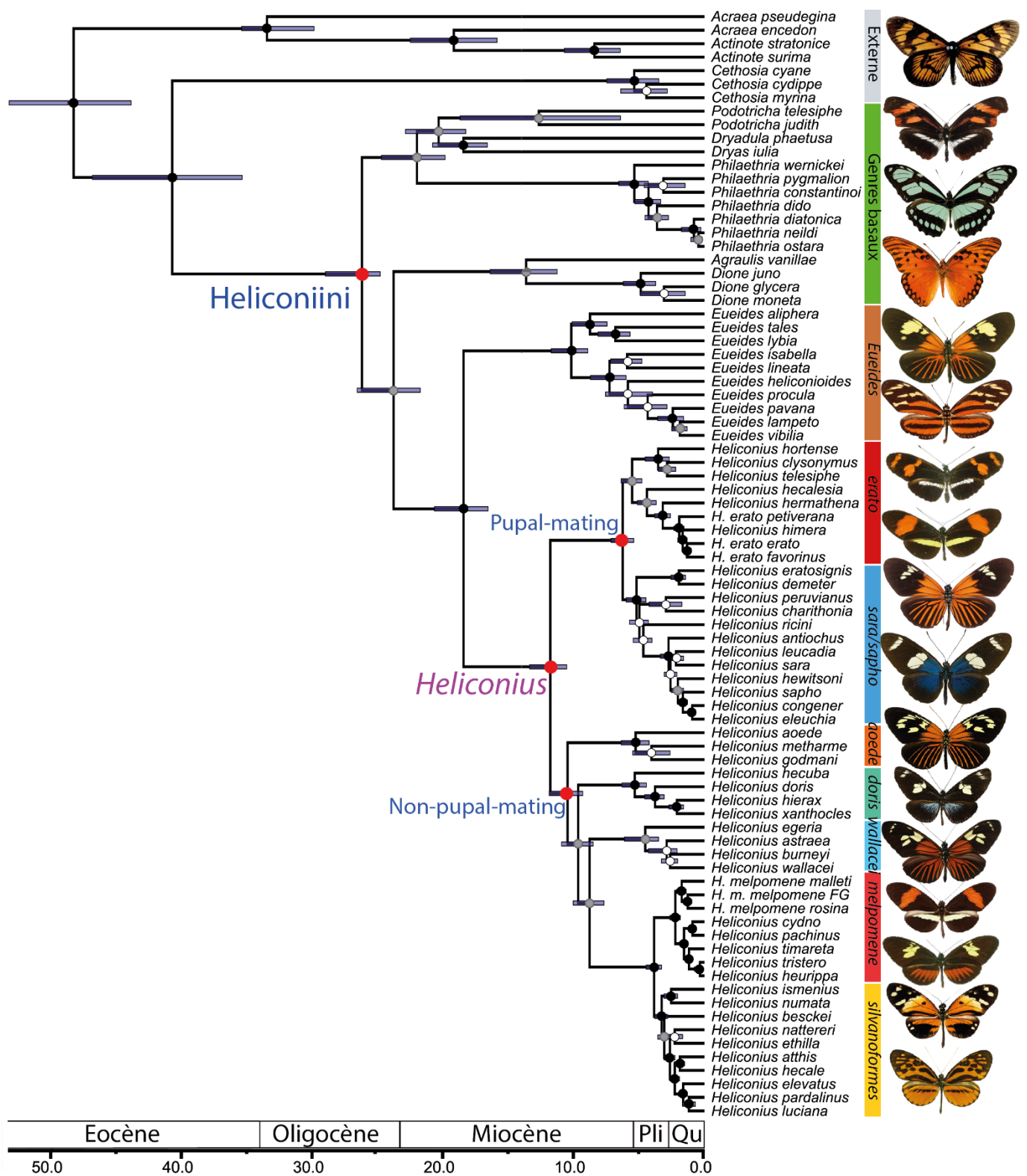


Figure 3 : Phylogénie des Heliconiini basée sur 71 des 77 espèces, soit 92% des espèces de la tribu, et 20 marqueurs nucléaires et 2 marqueurs mitochondriaux. En ordonnée l'échelle des temps géologiques, Pli : Pliocène, Qu : Quaternaire. D'après Kozak et al.(2015).

Heliconius est le genre le plus riche et diversifié des Heliconiini avec 46 espèces, représentant 60% de la tribu. Leur première description est signée par le collectionneur britannique James Petiver, qui publia en 1705 une illustration de *Papilio mexicanus* et *Papilio surinamensis* qui seront plus tard renommés *Heliconius erato petiverana* (en hommage à Petiver) et *Heliconius numata* (Fig. 4) (Petiver, 1705). La même année Maria Sibylla Merian, une artiste et entomologiste amateur néerlandaise, publia ses observations naturalistes faites au Surinam. Elle peigna la première représentation des différents stades développementaux d'un Heliconiini, ceux d'*Agraulis vanillae* associés à une orchidée la vanille (*Vanilla planifolia*), et sa fille peigna *Heliconius ricini* sur une plante de ricin commun (*Ricinus communis*) (Fig. 5) (Merian, 1705). Il semble que le choix des plantes fut purement esthétique mais elles furent associées à tort par Carl von Linné aux plantes hôtes des papillons, ce qui inspira le nom d'espèce de ces Heliconiini. Au XVIII^{ème} siècle, les premières taxonomies sont réalisées par Carl von Linné (1758) et Kluk (1780), et le nom *Heliconius* qui signifie « habitants du Mont Helicon » fut établi. Cette montagne grecque était considérée divine car habitée par les muses ; les neuf filles de Zeus et de Mnémosyne. Ainsi, de nombreuses espèces portent aujourd'hui des noms inspirés de la mythologie grecque, tel *H. erato*, *H. melpomene*, *H. charithonia*...

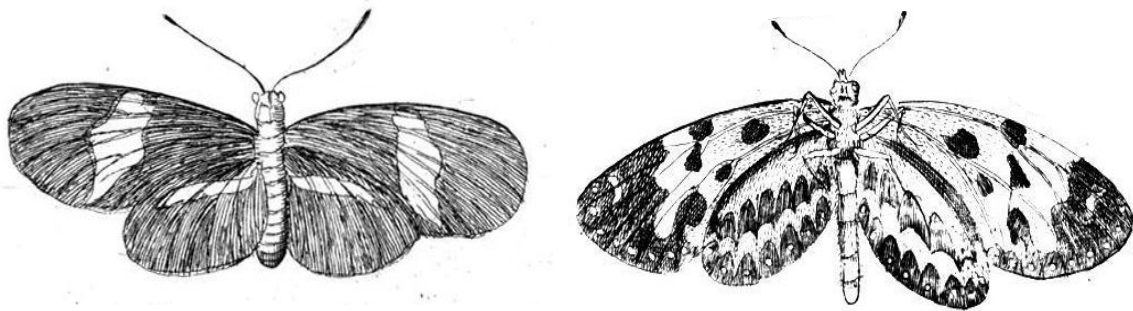


Figure 4 : Premiers dessins publiés en 1705 par James Petiver d'*Heliconius erato* (à gauche) et d'*Heliconius numata* (à droite).



Figure 5 : Peinture de Maria Sibylla Merian figurant une chenille, une pupe et deux adultes d'*Agraulis vanillae* sur une vanille (à gauche). Représentation d'*Heliconius ricini* adulte et d'une plante de ricin commun.

Les Heliconiini sont un sujet d'étude récurrent depuis le XIX^{ème} siècle dans de nombreux domaines tels que la génétique et génomique, l'évolution, la radiation adaptative, la spéciation, le comportement, la neurobiologie, l'aposématisme et les interactions mimétiques (Charlesworth & Charlesworth, 2011; Joron *et al.*, 2011; Finkbeiner *et al.*, 2012; Le Poul *et al.*, 2014; Merrill *et al.*, 2015; Montgomery *et al.*, 2016). Le célèbre naturaliste Henry Walter Bates se servit déjà du genre *Heliconius* pour illustrer les mécanismes de spéciation et la théorie naissante de la sélection naturelle (Bates, 1863). Les Heliconiini étant un modèle d'étude biologique, il est attendu que les résultats obtenus au sein de cette tribu soient extrapolables à d'autres organismes. Cependant il faut garder à l'esprit que ces papillons ne représentent que 0.02% des lépidoptères et qu'ils ont une écologie très particulière (Brown, 1981; Jiggins, 2016).

Le genre *Heliconius* est divisé en deux clades : le « pupal-mating » clade et le « non-pupal-mating » clade (Kozak *et al.*, 2015; Thurman *et al.*, 2018). La plupart du temps, les mâles du « pupal-mating » clade réalisent un comportement de reproduction caractéristique où ils repèrent une chrysalide et s'accouplent avec la femelle alors même qu'elle émerge. Ainsi, les femelles de ce clade ne choisissent souvent pas leur partenaire. En revanche, les femelles du « non-pupal-mating » clade, peuvent rejeter ou accepter un mâle en se basant sur la qualité de sa parade sexuelle (Deinert *et al.*, 1994).

En plus de consommer du nectar, les imagos du genre *Heliconius* consomment du pollen qu'ils récoltent avec leur trompe particulière, un trait unique parmi les lépidoptères (Fig. 6) (Gilbert, 1972). Les adultes mangent le pollen d'espèces très variées, par exemple des cucurbitacées des genres *Gurania* et *Psiguria* (Cucurbitaceae) (Estrada & Jiggins, 2002). Les variations entre les espèces de fleurs visitées, dépendent des différences de micro-habitats entre les espèces de papillons parfois très proches. Par exemple, *Heliconius melpomene* et *H. cydno* partagent une même localité mais vivent dans des micro-habitats différents qui expliquent les différences de collection de pollen entre ces deux espèces au Panama (Estrada & Jiggins, 2002). *H. melpomene* préfère les milieux ouverts tandis qu'*H. cydno* favorise les milieux plutôt fermés. Les *Heliconius* participent à la pollinisation des plantes, comme le révèlent certaines observations d'*H. ethilla* ou *H. wallacei* les ailes couvertes de pollen après avoir visité les passiflores *P. kernesina* ou *P. coccinea* (Benson *et al.*, 1975). Les enzymes salivaires du papillon digèrent le pollen et libèrent les nutriments et acides aminés (Harpel *et al.*, 2015). Ces valeurs nutritives sont investies dans i) la production de métabolites secondaires tel que les glucosides cyanogènes (Nahrstedt & Davis, 1985; mais voir aussi Cardoso & Gilbert, 2013), ii) la composition du spermatophore que le mâle transmet à la femelle lors de l'accouplement (Cardoso & Gilbert, 2006; de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019), iii) la production d'œufs (Gilbert, 1972; Dunlap-Pianka *et al.*, 1977) ainsi qu'au sein des œufs (O'Brien *et al.*, 2003) et iv) expliquerait également l'importante longévité de ces papillons, jusqu'à 6 mois dans la nature et 9 mois en captivité (Gilbert, 1972). Bien que les adultes s'alimentent sur diverses essences florales, les chenilles consomment presque exclusivement des plantes du genre *Passiflora* et du genre frère *Dilkea* (Brown, 1981; Janzen, 1983). C'est en raison de leur très étroite interaction avec leurs plante hôtes, que les Heliconiini sont communément appelés « papillons des passiflores » (Benson *et al.*, 1975; Smiley, 1978).

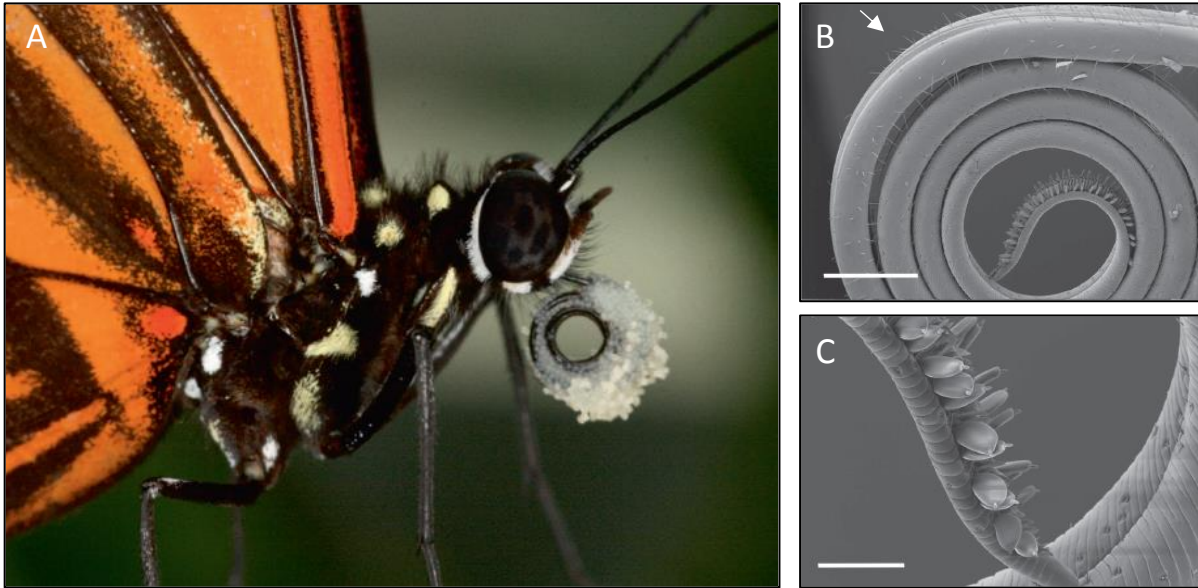


Figure 6 : A) *Heliconius melpomene aglaope* portant sur sa trompe sa récolte de pollen de *Psiguria sp.* (Cucurbitaceae). A noter que les Heliconiini ont de très grands yeux et la première paires de pattes atrophiées comme chez tous les Nymphalidae (Jiggins, 2016). B) Vue globale de la trompe d'*H. melpomene* et de ses sensilles trichomes (flèche), barre d'échelle = 500µm, et C) élargissement de la partie distale de la trompe et des sensilles styloconiques, barre d'échelle = 100µm. B et C, images en microscopie électronique à balayage de Krenn & Penz (1998).

Passifloraceae et *Passiflora*

La famille des Passifloraceae –passifloracées– a émergé il y a 65.5 millions d'années et est composée d'environ 750 espèces classées en 17 genres (Fig. 7) (Krosnick *et al.*, 2013; Sader *et al.*, 2019). Le genre *Passiflora* –communément appelé « passiflore »– est le plus important en terme de nombre d'espèces et le plus connu, grâce à ces nombreuses variétés de fleurs ornementales et la production de fruits comestibles ; les grenadilles et maracuja. Le genre *Passiflora* comprend environ 550 espèces réparties en 5 sous-genres : *Astrophea* (60 espèces), *Decaloba* (226 espèces), *Passiflora* (250 espèces), *Tetrapathea* (3 espèces), et le sous-genre polyphylétique *Deidamioides* (11 espèces). Les passiflores ont émergé il y a environ 42.9 millions d'années et sont majoritairement distribuées dans les forêts tropicales du Mexique à l'Argentine, bien que 26 espèces soient répertoriées dans les régions sub-tropicales asiatiques et océaniques (Hansen *et al.*, 2006; Sader *et al.*, 2019). Ardemment étudiés par les ethnobotanistes et biochimistes, certains métabolites secondaires sont exploités en médecine traditionnelle et dans l'industrie pharmaceutique en raison de leurs propriétés aphrodisiaque,

sédative, anxiolytique, coagulante, anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne (Ingale & Hivrale, 2010).

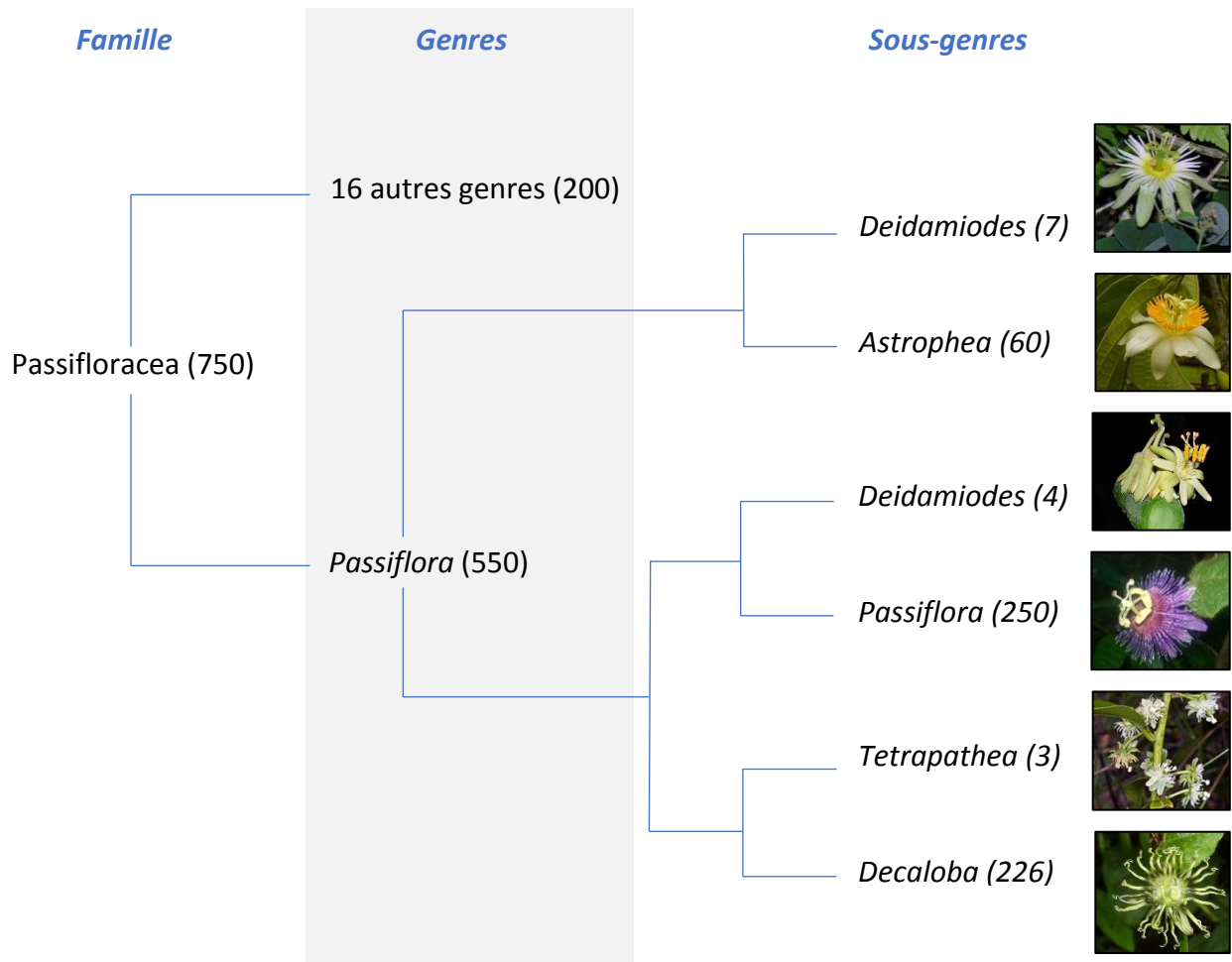


Figure 7 : Phylogénie simplifiée des Passifloraceae d'après Krosnick et al. (2013). Entre parenthèses est indiqué le nombre d'espèces au sein de chaque clade. Passiflora est à la fois un nom de genre et sous-genre mais le terme générique « passiflore » se réfère au genre. Une photo illustre une espèce par sous-genre. Espèces et crédits photos de haut en bas, *P. arbelaezii* (Miguel Molinari), *P. arborea* (John Ocampo), *P. ovalis* (Fernando Campos Neto), *P. menispermifolia* (Ombeline Sculfort), *P. tetrandia* (Jeremy Rolfe) et *P. auriculata* (John Smiley).

Adaptation des Heliconiini aux défenses des passiflores

Les interactions *Heliconius* – plantes sont donc opportunistes lorsque les papillons adultes participent à la pollinisation lors de leur collecte de pollen. En revanche au stade larvaire ces papillons font des ravages et impactent négativement la survie de la passiflore qu'ils attaquent, les chenilles très voraces étant les principales consommatrices des passiflores (Benson *et al.*, 1975). Les passiflores –et les plantes de façon général– sont des organismes sessiles ne pouvant pas physiquement fuir les attaques. Certains traits de défenses ont évolué chez les passiflores sous la pression des herbivores et en particulier des chenilles Heliconiini, tel que des trichomes acérés perforant les jeunes chenilles (Gilbert, 1971).

Identifier une plante hôte et dépasser les barrières physiques pré-oviposition

Une fois accouplée, les femelles Heliconiini arpentent la forêt à la recherche des plantes les plus convenables pour y pondre leurs œufs. La première étape étant de repérer les feuilles de la meilleure espèce de plante hôte parmi la végétation foisonnante et diversifiée. Les feuilles de passiflore ont des morphologies très variées ; limbe simple ou composée, poilue ou non, plus ou moins lobée ou dentée, de forme elliptique, falciforme, hastée, lancéolée, oblongue, ovale, palmée... (Fig. 8) (Wosch *et al.*, 2015). Les feuilles des passiflores peuvent aussi être extrêmement similaires à celles d'espèces éloignées des genres *Philodendron* et *Rubus* qui partagent le même habitat (Gilbert, 1982). Ainsi, les espèces de passiflores tirent parfois leur nom en fonction des genres avec lesquels elles partagent des ressemblances morphologiques, tel que *Passiflora laurifolia* (pour le genre *Laurus*), *P. morifolia* (*Morus*) ou *P. vitifolia* (*Vitis*) (Killip, 1938). Sur le terrain il est possible d'observer que les passiflores d'une même localité ont tendance à avoir des morphologies très différentes, et que des variations inter-individuelles et intra-individuelles existent puisque la forme des feuilles peut varier selon le stade développemental (Gilbert, 1982). Les femelles choisissent préférentiellement des passiflores non endommagées avec leurs bourgeons et jeunes tissus intact (Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996a). Chez les passiflores en bonne santé, des variations et nuances de couleurs, souvent blanche ou vert pâle, contrôlées génétiquement peuvent s'exprimer (Fig. 8) (Braglia *et al.*, 2014). Ces variations de couleurs donne l'apparence d'une infection ou d'une attaque par des herbivores (Reeves, 2011; Lev-Yadun, 2018). Chez certaines plantes comme *Caladium steudneriifolium* (Araceae), il a été montré que ce phénotype bigarré entraîne une diminution

de l'oviposition des papillons de nuit associés à cette plante (Soltau *et al.*, 2009). Les bigarrures de certaines variétés de *P. trifasciata* ne rebutent pas les femelles *H. erato* à pondre (observation personnelle). Bien que de nombreuses espèces de passiflores puissent exhiber un phénotype bigarré, aucune étude n'a testé si cela influence ou diminue le comportement de ponte des femelles Heliconiini. Il a été également proposé que les points de colorations noirs des fleurs de certaines passiflores, puissent évoquer des fourmis, principales prédatrices des chenilles Heliconiini (Fig. 8) (Lev-Yadun, 2009). Bien que les papillons ne pondent pas sur les fleurs et que les chenilles ne les consomment pas, la présence supposée de fourmis décourage les femelles à pondre (Labeyrie *et al.*, 2001).

Les œufs et jeunes chenilles sont vulnérables et la plupart des chenilles d'Heliconiini sont agressives et cannibales (Benson *et al.*, 1975). Les femelles choisissent une plante hôte dépourvue de toute concurrence, améliorant la survie de sa progéniture. Plus de 30 espèces de passiflores présentent des feuilles, pétioles, stipules ou tendrilles modifiés en structures ovoïdes jaunes ressemblant à des œufs des Heliconiini (Fig. 8) (Brown, 1981; Gilbert, 1982). Ces structures ressemblant aux œufs de congénères, sont efficaces dans la diminution de l'oviposition. Une ablation artificielle de ces faux œufs rend les *P. cyanea* 60% plus attractives et vulnérables vis-à-vis des femelles *H. cydno* (Williams & Gilbert, 1981). Les espèces, comme *H. numata* ou *H. erato*, pondant des œufs solitaires sont susceptibles de se désintéresser des plantes avec de telles structures. En revanche, les espèces dont les chenilles sont grégaires et dont les femelles pondent en groupe comme *H. charithonia* ou *H. doris* pourraient être attirées par les plantes exprimant ces éléments jaunes (Benson *et al.*, 1975).

L'efficacité des femelles Heliconiini à sélectionner une plante hôte fait probablement partie des pressions de sélection qui pourrait expliquer l'émergence de tant de diversité morphologique chez les passiflores (Gilbert, 1975, 1982, 1991). Les Heliconiini adultes ont une très bonne vision, de grands yeux avec plus de familles de pigments que les autres papillons et peuvent voir un large spectre lumineux ; des ultraviolets au rouge (440 – 640 nm) (Briscoe & Chittka, 2001; Briscoe *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010). Bien que la capacité de voir dans un spectre lumineux étendu semble avoir été sélectionnée en réponse à la communication interspécifique, il ne peut être exclu que cela puisse entrer en jeu lors de l'identification des plantes hôtes (Briscoe *et al.*, 2010; Bybee *et al.*, 2012). Ces papillons peuvent non seulement

apprendre et mémoriser les morphologies des feuilles de leurs plantes hôtes, mais également se souvenir de leur localisation et les revisiter (Ehrlich & Gilbert, 1973; Mallet *et al.*, 1987; Dell'Aglio *et al.*, 2016).

Les femelles Heliconiini survolent donc la végétation pour trouver la meilleure plante hôte mais les indices visuels seuls ne suffisent pas à déclencher l'oviposition (Brown, 1981; Gilbert, 1982; Dell'Aglio *et al.*, 2016). Une fois une plante candidate trouvée, les femelles inspectent les feuilles avec leurs antennes, trompe, et leur première paire de pattes avant (chez les Nymphalidae la première paire de pattes est atrophiée et n'a pas de fonction locomotrice) où sont exprimés des chémorécepteurs pour identifier et évaluer la qualité de la plante (Benson *et al.*, 1975; Silva *et al.*, 2018). Chez les insectes les chémorécepteurs sont l'ensemble des récepteurs olfactifs (détection des molécules odorantes), des récepteurs ionotropiques (détection des molécules odorantes et gustatives) et des récepteurs gustatifs (détection des molécules gustatives et du dioxyde de carbone CO₂) (Slifer, 1970; Rimal & Lee, 2018). A ce jour, 73 gènes candidats de récepteurs gustatifs, dont 21 spécifiques au genre *Heliconius* ont été révélés grâce au séquençage du génome d'*H. melpomene*, mettant ainsi en lumière la prépondérance de ce sens (The Heliconius Genome Consortium *et al.*, 2012; Briscoe *et al.*, 2013). De plus, les femelles expriment une plus grande diversité et abondance de ces récepteurs sur leurs pattes avant par rapport aux mâles (Briscoe *et al.*, 2013).

Adaptations post-oviposition des Heliconiini aux défenses physiques des passiflores

Les feuilles de certaines espèces de passiflores sont couvertes de petites excroissances épidermiques appelées trichomes. Les trichomes sont de tailles variables et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires, glandulaire ou non (Payne, 1978). Les trichomes glandulaires ont des glandes pouvant synthétiser, stocker voire sécréter des métabolites secondaires (Tissier, 2012). Ce type de trichomes est peu fréquent chez les passiflores et n'a à ce jour été décrit que chez 4 espèces : *P. clathrata*, *P. foetida*, *P. lepidota* et *P. villosa* (Dhawan *et al.*, 2004). La nature des sécrétions de ces trichomes glandulaires reste encore à explorer. *P. foetida* a des trichomes glandulaires au niveau de ses bractées très ramifiées qui englobent et protègent les fleurs puis fruits. Cette passiflore est la seule connue pour produire des résines (Durkee *et al.*, 1984).

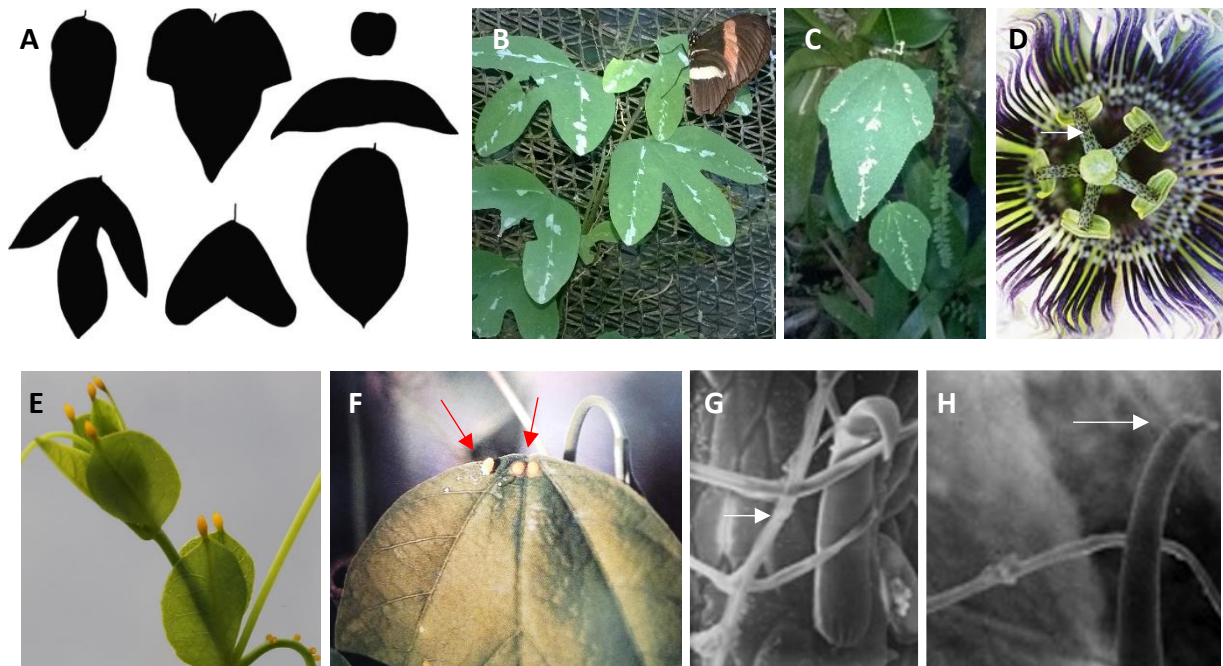


Figure 8 : Défenses morphologiques des passiflores à dépasser par les Heliconiini. A) Diversité des formes des feuilles, de gauche à droite et de haut en bas *P. auriculata*, *P. menispermifolia*, *P. tryphostemmatoides*, *P. coriacea*, *P. vitifolia*, *P. biflora*, *P. ambigua* (Jiggins, 2016). B) Phénotype bigarré et variation de couleur sur les feuilles de *P. trifasciata* (et *H. melpomene amaryllis*) et C) autre variété de *P. trifasciata* (Ombeline Sculfort). D) Anthères de *Passiflora* sp. tachetés de noir, pouvant évoquer des fourmis pour les papillons (Lev-Yadun, 2016). E) Structures jaunes et ovoïdes ressemblant aux œufs des Heliconiini (Maurizio Vecchia), F) comparaison entre un œuf jaune d'*Heliconius* (à gauche) placé artificiellement à côté des nectaires extra floraux (à droite) de la même couleur à la base d'une feuille de passiflore (Lawrence Gilbert). G) Photos en microscopie électronique des trichomes de *P. lobata*, enveloppés de soie produite par *Heliconius charithonia*, et H) bout de trichome grignoté par *H. charithonia* (Cardoso, 2008).

Les trichomes glandulaires de *P. foetida* excrètent des substances collantes composées en partie de résines, sucres et enzymes protéolytiques qui neutralisent et digèrent les insectes (Radhamani *et al.*, 1995; Rosa & Dornelas, 2012). Les trichomes non glandulaires sont apparus plusieurs fois chez les passiflores, au sein des sous-genres *Astrophea*, *Decaloba* et *Passiflora* (MacDougal, 1994; Wosch *et al.*, 2015). Les espèces de passiflores ayant des trichomes à la fois extrêmement acérés et crochus sont peu nombreuses : *P. adenopoda*, *P. lobata* et *P. warmingii* (Gilbert, 1971; MacDougal, 1994). En laboratoires, toutes les jeunes larves d'*Heliconius erato* et *H. melpomene* transférées sur *P. adenopoda* ne survivent pas aux trichomes pointus. Les larves meurent transpercées ou de faim car elles ne peuvent pas se déplacer sur ces feuilles (Gilbert, 1971). Pourtant, les chenilles de *Dione moneta* et d'*H. charithonia* s'alimentent sur ce type de passiflore (Benson *et al.*, 1975). Les chenilles d'*H. charithonia* recouvrent les trichomes de *P. adenopoda* de soie et mangent également leur extrémité pointue (Fig. 8) (Cardoso, 2008).

Les œufs et jeunes chenilles d'Heliconiini sont soumis à une forte prédation notamment des fourmis. Les *Heliconius* ont tendance à coloniser les passiflores lorsque les fourmis sont absentes (Labeyrie *et al.*, 2001). La très grande majorité des passiflores expriment des nectaires extra floraux ; des glandes sécrétant un nectar très sucré qui attire les insectes et principalement les fourmis, mais aussi des parasitoïdes d'Heliconiini (Bentley, 1977; Turner, 1981; Smiley, 1986). La présence des fourmis augmente drastiquement la mortalité des larves, surtout lors des deux premiers stades lorsque les larves sont encore très petites (Smiley, 1985). Cette forte pression de sélection a fait émerger des comportements particuliers aussi bien chez les adultes que les chenilles. Les femelles inspectent avec attention les plantes pour évaluer la menace des fourmis. Certaines pondent sur les feuilles sénescents ou à l'extrémité des vrilles où les fourmis patrouillent peu, ou pondent même sur les plantes adjacentes d'autres espèces pour protéger leurs œufs (Benson *et al.*, 1975; Young & Young, 1975). La plupart des chenilles s'alimentent en étant sous les feuilles, ce qui les rend moins visibles pour les oiseaux ou les parasitoïdes (Jiggins, 2016). Les chenilles de *Dryas iulia* et *Philaethria dido* découpent une bandelette de feuille et s'isolent au bout afin de se reposer loin des fourmis patrouilleuses (Benson *et al.*, 1975; Mega & de Araújo, 2008). La fréquence de ce comportement diminue à partir du troisième stade larvaire chez *D. iulia* lorsque les chenilles sont plus grosses et donc moins vulnérables (Mega & de Araújo, 2008). Les chenilles de la

majorité des espèces d'Heliconiini (*H. erato*, *H. numata*, *H. hecale*...) sont solitaires, agressives avec de longs piquants en guise de défenses physiques, d'autres espèces (*Dione juno*, *H. sara*, *H. doris*...) aux piquants plus courts sont grégaires et se protègent les unes les autres (Benson *et al.*, 1975; Turner, 1981).

Selon les espèces, les chenilles d'Heliconiini peuvent réaliser leur développement sur un panel plus ou moins étendu d'espèces de passiflores. Une espèce peut avoir plusieurs plantes hôtes acceptables pour l'oviposition mais avec des variations de survie et/ou développement des larves (Benson, 1978). Certaines espèces généralistes ont des dizaines de plantes hôtes acceptables, tel *Agraulis vanillae* : 50 espèces, *Heliconius numata* : 30 espèces. Au contraire, les espèces spécialistes ont un nombre très restreint de plantes hôtes, les chenilles *H. telesiphe* se nourrissent exclusivement de *P. telesiphe* et *H. hewistonii* de *P. pittieri* (Knapp & Mallet, 1998; Robinson *et al.*, 2010). L'adaptation des papillons à une plante hôte ne résulte pas seulement des profils chimiques des plantes. Il existe une très forte compétition interspécifique mais également intraspécifiques pour l'accès aux sites de ponte sur les passiflores. En effet les femelles Heliconiini intègrent diverses variables dans le choix d'un site de ponte tel que la chimie de la passiflore mais aussi la présence ou l'absence de congénères. La compétition augmente si les plantes hôtes se font rares ou si des œufs ou larves d'autres Heliconiini sont déjà présents (Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996b). Au contraire, la compétition entre *Heliconius* diminue lorsque l'abondance des passiflores augmente (Benson, 1978; Gilbert, 1980). En termes de plantes hôtes, les Heliconiini occupent une niche unique. La spécialisation pour les espèces de passiflore mais aussi la répartition des ressources ; sur un même pied de passiflore certaines espèces d'Heliconiini utilisent les feuilles matures alors que d'autres consomment les jeunes pousses (Millan *et al.*, 2013), ce qui réduit la compétition entre espèces et individus.

Défenses chimiques des passiflores ; production des médiateurs d'une guerre silencieuse

Les passiflores synthétisent pléthore de métabolites secondaires : des molécules de petit poids moléculaire en générale et qui n'assurent pas les fonctions vitales de la plante. Parmi les familles chimiques synthétisées il y a notamment : des alcaloïdes β -carbolines (Cavin & Bradley, 1988), des flavonoïdes (Echeverri *et al.*, 1991), des saponines (Reginatto *et al.*, 2004), des composés phénoliques (Bennett & Wallsgrave, 1994) et des glucosides cyanogènes qui seront décrits plus en détail (Olafsdottir, Andersen, *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 1998). Bien que ces molécules aient des propriétés anti-herbivores, les chenilles Heliconiini consomment bien souvent les passiflores indépendamment de leur teneur en défense chimique, indice qu'elles peuvent gérer ces métabolites et/ou leurs dérivés (Smiley & Wisdom, 1985).

Les saponines ne sont pas très répandues chez les passiflores et sont décrites dans quelques espèces ; *P. alata*, *P. edulis* et *P. quadrangularis* (Yoshikawa *et al.*, 2000; Reginatto *et al.*, 2001, 2004). La plus abondante, semble être la quadranguloside d'abord isolée chez *P. quadrangularis*, puis *P. alata*. Cette molécule pourrait être efficace contre la prédation des Heliconiini puisque une étude montre que *Dione juno* ne survit pas à la consommation de *P. alata* et qu'*H. erato* et *H. charithonia* refusent de s'alimenter sur *P. quadrangularis* (Smiley, 1982; Boiça Júnior *et al.*, 2008). Ces résultats sont à nuancer puisque *P. alata* et *P. quadrangularis* synthétisent d'autres molécules de défenses et sont au contraire répertoriées comme une plante hôte de *D. juno* et *H. charithonia* respectivement (Jiggins, 2016).

Il est probable que la plupart des flavonoïdes n'aient pas d'effet sur les Heliconiini. Jusqu'à présent seule l'ermanine, extrait et purifié des sécrétions résineuses de *P. foetida*, puis appliqué sur *P. quadrangularis* et *P. molissima* est responsable d'une baisse de la prédation par *Dione juno* (Echeverri *et al.*, 1991).

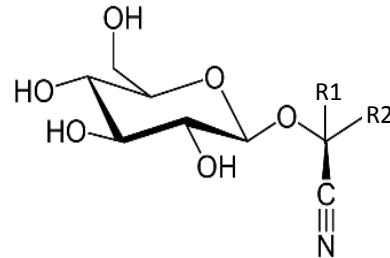
Les tanins, acide caféique et acide chlorogénique sont des composés phénoliques métabolisés à partir d'acides aminés aromatiques et ayant des propriétés anti-herbivores (Barbehenn *et al.*, 2003). Ils sont décrits chez plusieurs espèces de passiflores (Smiley & Wisdom, 1985; Saravanan *et al.*, 2014). Les tanins –polyphénols hydroxylés– forment des liaisons hydrogènes avec les enzymes digestives ce qui réduit l'absorption des nutriments, mais contrairement aux premières théories formulées, ceci s'observe à forte concentration et chez des mammifères

et non chez les insectes (Karowe, 1989; McSweeney *et al.*, 2001). Le pH basique du tube digestif des insectes inhibe la formation de complexe tanin-protéines et le pH a tendance à être plus élevé chez les insectes consommateurs de plantes riches en tanins (Berenbaum, 1980; Barbehenn & Constabel, 2011). Les effets délétères des tanins sont plutôt dus à leur oxydation et la formation d'espèces réactives de l'oxygène responsables d'un stress oxydatif (Halliwell & Gutteridge, 2015)

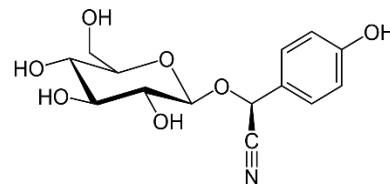
Chez les passiflores, les alcaloïdes β -carbolines dérivant de l'acide aminé tryptophane sont les plus communs. Une étude sur 91 espèces de passiflores a révélé que plus de la moitié expriment ces alcaloïdes β -carbolines (Abourashed *et al.*, 2003). L'harmalol, harmaline, harman et l'harmane ont des propriétés anti-herbivores contre certaines chenilles de papillons (Cavin & Rodriguez, 1988; Rizwan-ul-Haq *et al.*, 2009). Elevées sur *P. biflora* ou *P. quadrangularis*, les chenilles Heliconiini ingèrent les alcaloïdes β -carbolines qui sont soit rapidement excrétés dans les fèces, soit séquestrés jusqu'au stade adulte, et potentiellement transmis aux descendants puisque ces molécules sont également détectées dans les œufs (Cavin & Bradley, 1988). Les papillons des tribus sœurs Heliconiini et Acraeini peuvent séquestrer l'harmane et l'harmane (Cavin & Bradley, 1988). Il n'y a pas d'autre étude sur l'interaction alcaloïdes β -carbolines – Heliconiini et des recherches plus poussées sont nécessaires afin de mieux la comprendre. Les alcaloïdes β -carbolines ne sont pas les seuls phyto-composants séquestrés au stade larvaires par les Heliconiini qui stockent également des glucosides cyanogènes à partir des passiflores (Engler *et al.*, 2000; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019).

Boîte 1 : Qu'est-ce qu'un glucoside cyanogène ?

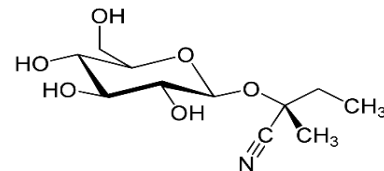
Ce sont des cyanhydrines glucosilés ou α -hydroxynitriles-*O*- β -glycoside (Conn, 1980; Yamane *et al.*, 2010). Deux chaînes radicalaires variables (R1 et R2), un glucose et un groupe cyanure sont disposés autour d'un carbone asymétrique central (ci-contre). Ils sont classés en trois classes suivant l'acide aminé dont ils sont dérivés, (Morant *et al.*, 2008) :



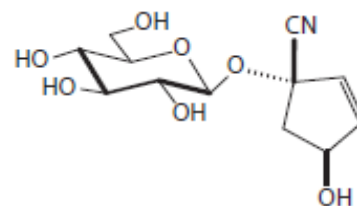
Aromatique : dérive des acides aminés aromatiques L-phénylalanine ou L-tyrosine. A partir d'extrait d'amande amère, l'amygdaline fut le premier glucoside cyanogène décrit en 1830 (Robiquet & Boutron-Charlard, 1830).



Aliphatique : métabolisé à partir de la L-valine, L-leucine ou L-isoleucine. La linamarine et lotaustraline sont parmi les plus connus.



Cyclopenténoïque : synthétisés à partir de la L-2-cyclopentenyl-glycine, un acide aminé non protéique.



La recherche scientifique sur les interactions Heliconiini – passiflores a un rôle prépondérant dans la compréhension de la coévolution entre les insectes et leurs plante hôtes mais aussi dans le rôle des métabolites secondaires impliqués dans la défense chimiques de ces plantes hôtes. Au cours de l'évolution est apparue la capacité de séquestration des glucosides cyanogènes (boîte 1) cyclopenténoïques de passiflores par les larves d'Heliconiini. Jusqu'à

présent, cinq de ces métabolites ont été reportés chez les Heliconiini ; les stéréoisomères tétraphylline B et épivolkenine, la tétraphylline A, le gynocardine et dihydrogynocardine (Fig. 9) (Engler *et al.*, 2000; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Les chenilles contournent ainsi les défenses chimiques des passiflores, et stockent les glucosides cyanogènes jusqu'à l'état adulte.

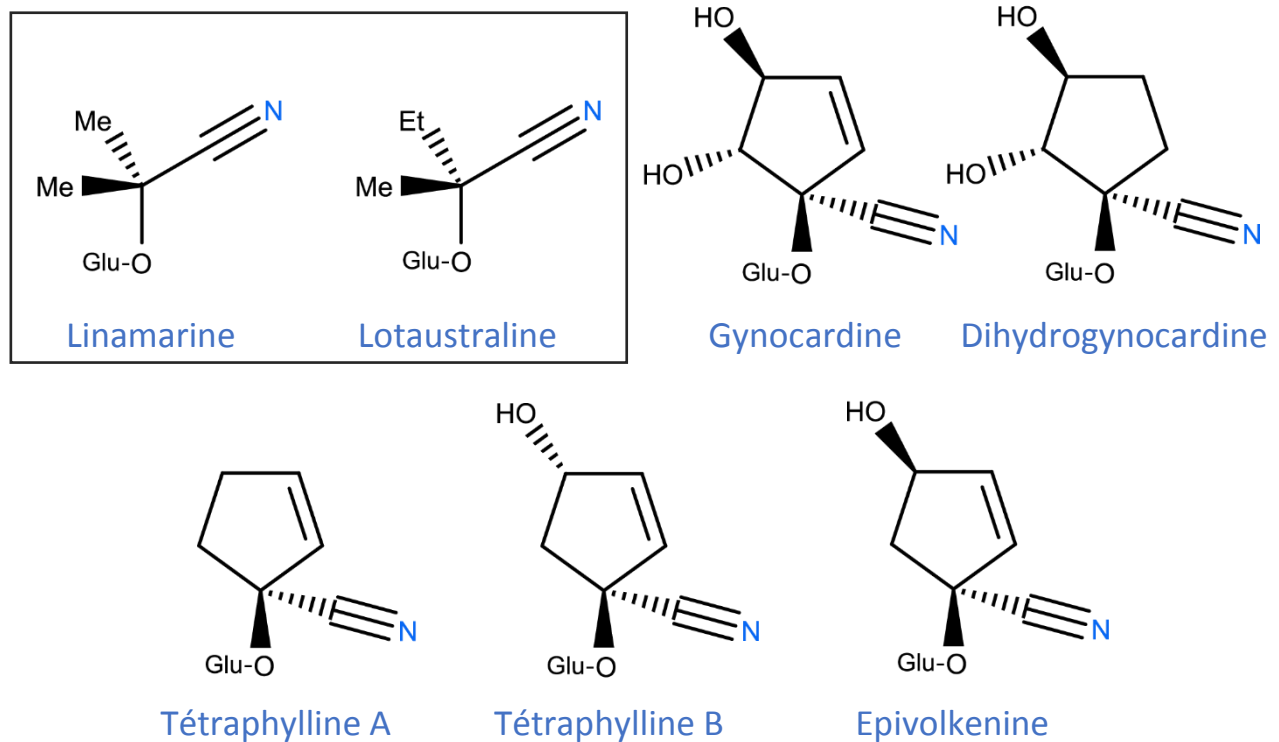


Figure 9 : En encadré sont représentés les glucosides cyanogènes aliphatiques synthétisés par les Heliconiini et certaines passiflores. Les cinq glucosides cyanogènes cyclopenténoïques sont synthétisés par les passiflores et séquestrés par les Heliconiini.

En plus de la séquestration, les Heliconiini synthétisent *de novo* les glucosides cyanogènes aliphatiques linamarine et lotaustraline, respectivement à partir des acides aminés L-valine et L-leucine (Nahrstedt & Davis, 1985). Les rares espèces de passiflores qui produisent la linamarine et la lotaustraline, le font en très petites quantités, et ne sont pas reconnues comme plantes hôtes majeures des Heliconiini, ce qui laissait à penser que les papillons ne peuvent qu'exclusivement synthétiser ces glucosides cyanogènes aliphatiques (Jaroszewski *et al.*, 2002; Zagrobelny *et al.*, 2008). Pourtant au moins cinq espèces de passiflores produisent ces molécules ; *P. adenopoda*, *P. amoena*, *P. morifolia*, *P. pendens* et *P. subpeltata* (Spencer *et al.*, 1986; Olafsdottir, Andersen, *et al.*, 1989; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Hormis *P. amoena* et *P. pendens*, ces espèces de passiflores sont répertoriées comme plantes hôtes d'au

moins huit espèces Heliconiini des genres *Dione*, *Dryadula*, *Dryas*, *Eueides* et *Heliconius* (Jiggins, 2016). Une étude récente a démontré que des adultes peuvent également assimiler la linamarine et la lotaustraline à partir de solution déposées sur les feuilles (de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019). Il est donc important de considérer que des glucosides cyanogènes aliphatiques de passiflores peuvent potentiellement être séquestrés par les chenilles.

Cette biosynthèse endogène est démontrée à la fois chez les chenilles et les adultes des genres *Agraulis*, *Dryas* et *Heliconius*, par incorporation d'acides aminés précurseurs radiomarqués (Nahrstedt & Davis, 1985; Davis & Nahrstedt, 1987). Les adultes *Heliconius* trouvent dans le pollen des fleurs une source d'acides aminés qui peuvent être investis dans la synthèse de la linamarine et lotaustraline. En laboratoire, que les individus bénéficient d'une alimentation supplémentée en acide aminé ou non, ils synthétisent toujours ces glucosides cyanogènes (Nahrstedt & Davis, 1985). En comparant la teneur en glucosides cyanogènes chez des adultes du genre *Heliconius* ayant accès ou non à du pollen ; une étude tend à montrer que l'apport de pollen stimule la synthèse (Nahrstedt & Davis, 1985) alors qu'une autre suggère que non (Cardoso & Gilbert, 2013). La concentration totale en glucosides cyanogènes paraît assez constante chez les Heliconiini à l'exception des *Heliconius* elle augmente au cours du temps (Nahrstedt & Davis, 1985; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Les espèces d'*Heliconius* consommatrices de pollen sont plus riches en glucosides cyanogènes par rapport aux espèces des autres genres d'Heliconiini (Nahrstedt & Davis, 1985; Cardoso & Gilbert, 2013). Cette différence s'observe même en considérant des individus *Heliconius* fraîchement émergés donc n'ayant pas encore eu accès à du pollen (Cardoso & Gilbert, 2013). Cardoso et Gilbert (2013) suggèrent que i) chez les espèces non *Heliconius*, les chenilles investissent leur énergie dans l'acquisition de défenses chimiques et de réserves énergétiques qui seront utilisées par les adultes pour la reproduction, ii) les chenilles *Heliconius* peuvent séquestrer et majoritairement investir leurs acides aminés dans la synthèse de défenses chimiques, s'affranchissant ainsi du coût énergétique de la reproduction qui ne repose sur les adultes (ce coût étant allégé par la consommation de pollen Dunlap-Pianka *et al.*, 1977). Cependant, une étude précédente montre que chez *H. charithonia* il existe une corrélation positive entre la taille des femelles au stade adulte et leur taux d'oviposition (nombre d'œufs pondus par jour) (Dunlap-Pianka, 1979). Comme la taille adulte dépend de la qualité et quantité de l'alimentation des chenilles, le succès reproducteur des individus est en partie corrélé au stade

larvaire. Chez les femelles *H. charithonia* privées de pollen, le nombre d'œufs pondus décroît rapidement et les femelles ne pondent plus du tout au bout d'un mois, alors que celles ayant accès au pollen pondent autant d'œufs par jour tout au long de leur vie (Dunlap-Pianka *et al.*, 1977). Lors de l'accouplement, le mâle transmet à la femelle des glucosides cyanogènes, des protéines et des nutriments en plus de sa semence (Cardoso & Gilbert, 2006). Les femelles allouent des glucosides cyanogènes dans leurs œufs, ainsi les Heliconiini possèdent des défenses chimiques tout au long de leur cycle de vie (Nahrstedt & Davis, 1983). Les œufs sont parfois le stade le plus défendus comme montré chez *A. vanillae* et *H. charithonia* (Nahrstedt & Davis, 1983, 1985), mais pas chez *H. melpomene* (de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019). Néanmoins, les études mesurant la concentration des glucosides cyanogènes dans les œufs ont été réalisées avec différentes espèces de papillons, de plantes hôtes et de méthodologies. Il n'y a pas d'étude permettant d'estimer la proportion de glucosides cyanogènes investie par les femelles dans leurs œufs, ni d'étude comparant cet investissement entre espèces ou entre individus.

La concentration totale de glucosides cyanogène apparaît comme un trait très plastique au sein d'un individu, dont le rapport entre glucosides cyanogènes synthétisés et séquestrés semblent négativement corrélé et dépendre du niveau de spécialisation des espèces d'Heliconiini (Engler & Gilbert, 2007). Il est supposé que les espèces spécialistes (qui ont très peu d'espèce de plante hôte acceptable) ont de fortes concentrations totales de glucosides cyanogènes (Arias, Meichanetzoglou, *et al.*, 2016) car leurs métabolismes adaptés à leur plante hôte leur permettent d'efficacement en séquestrer les glucosides cyanogènes, comme démontré chez *H. sara* (Engler *et al.*, 2000; Jiggins, 2016). En revanche, il est supposé que les espèces plus généralistes (pouvant s'alimenter sur un grand nombre d'espèce de plante hôte) dépendent moins des plantes hôtes et plus de leur capacité de synthèses pour obtenir leurs glucosides cyanogènes. Cette catégorisation ne semble pas si nette, en effet chez *H. erato* une espèce plutôt généraliste, il existe une corrélation positive entre la teneur en glucosides cyanogènes de l'espèce de passiflore consommée et de celle des papillons (Hay-Roe & Nation, 2007). En revanche, le taux de développement et la survie des larves est indépendant de la teneur en glucosides cyanogènes de la plante (Smiley & Wisdom, 1985). Une hypothèse avancée est que la capacité de synthèse des glucosides cyanogènes par les papillons (Heliconiini et Zygaenidae) soit apparue avant celle de leur séquestration. Les espèces de

papillons possédant déjà la machinerie enzymatique pour gérer les glucosides cyanogènes et leurs métabolites auraient eu un avantage sélectif pour coloniser de nouvelles espèces de plantes hôtes cyanogènes (Zagrobelyny *et al.*, 2004, 2008). Le degré de spécialisation, la production de glucosides cyanogènes par la plante hôte, ainsi que les capacités de séquestration et synthèse endogène de chaque individu sont susceptibles d'engendrer d'énormes variations en termes de défense chimique entre les espèces d'Heliconiini mais également au sein des espèces.

Convergence évolutive entre herbivores et plantes dans l'acquisition des glucosides cyanogènes en tant que défense chimique

Les glucosides cyanogènes produits par les plantes constituent des défenses chimiques efficaces contre les organismes incapables d'empêcher la cyanogénèse ou d'en gérer les produits. Les glucosides cyanogènes ne sont pas restreint aux plantes, cependant parmi les animaux ils n'ont été répertoriés que chez les arthropodes (Arthropoda), en particulier les myriapodes (Myriapoda), les arachnides (Chelicerata), et chez les insectes coléoptères (Coleoptera) et papillons (Lepidoptera) (Fig. 10) (Bond, 1961; Davis & Nahrstedt, 1982; Brückner *et al.*, 2017). Les arthropodes peuvent séquestrer les métabolites secondaires de leur plante nourricière y compris les glucosides cyanogènes. Alors que la majorité, arachnides, myriapodes et coléoptères ne présentent que des glucosides cyanogènes aromatiques, les papillons possèdent eux des glucosides cyanogènes aliphatiques et cyclopentenoïques (Zagrobelyny *et al.*, 2004; de Castro, Zagrobelyny, *et al.*, 2019). Certaines punaises (Hemiptera) peuvent séquestrer des cyanolipides à partir des plantes de la famille des Sapindaceae, mais aucun glucoside cyanogène n'a été reporté à ce jour chez ces insectes (Aldrich *et al.*, 1990). Alors que certains myriapodes et papillons peuvent produire des glucosides cyanogènes endogènes, la capacité d'à la fois séquestrer et produire ces molécules semble restreinte aux papillons (Zagrobelyny, de Castro, *et al.*, 2018). Les zygènes (Zygaenidae) et Heliconiini sont des exemples majeurs de papillons combinant des colorations vives et aposématiques avec des défenses chimiques (Davis & Nahrstedt, 1982; Zagrobelyny, Bak, Thorn Ekstrøm, *et al.*, 2007; Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2014). Même s'il manque des données pour de nombreux taxons animaux et végétaux, la distribution éparse des glucosides cyanogènes suggère que leur capacité de biosynthèse a évolué plusieurs fois indépendamment (Jensen *et al.*, 2011; Zagrobelyny, de Castro, *et al.*, 2018).

Certaines espèces de mollusques ou d'insectes, comme le papillon *Scodoptera littoralis* ou le criquet *Schistocerca gregaria*, évitent de s'alimenter sur des plantes cyanogènes (Cooper-Driver & Swain, 1976; Schwarz *et al.*, 1996). D'autres espèces sont indifférentes aux glucosides cyanogènes qui n'influent ni sur leur alimentation ni sur leur comportement reproducteur. C'est le cas du charançon *Sitona lepidus* (Coleoptera) qui s'alimente aussi bien sur les phénotypes cyanogéniques et non cyanogéniques du trèfle *Trifolium repens* dont il se nourrit exclusivement des racines à l'état larvaire (Mowat & Clawson, 1996). Si pour certaines espèces d'insectes les glucosides cyanogènes sont des molécules répulsives, pour d'autres ce sont des phagostimulants. En laboratoire, de faibles doses de cyanure stimulent l'alimentation des chenilles de *Spodoptera eridania* (Brattsten *et al.*, 1983). Le bon déroulement de la croissance et du développement des larves de la zygène de la filipendule dépendent fortement de la présence de glucosides cyanogènes dans leurs plantes hôtes du genre *Lotus*, et en particulier *Lotus corniculatus* (Fabaceae) (Zagrobelny, Bak, Thorn Ekstrøm, *et al.*, 2007). Ces expériences révèlent l'étroite interaction et dépendance de certaines espèces hautement spécialisées à leur plante hôte.

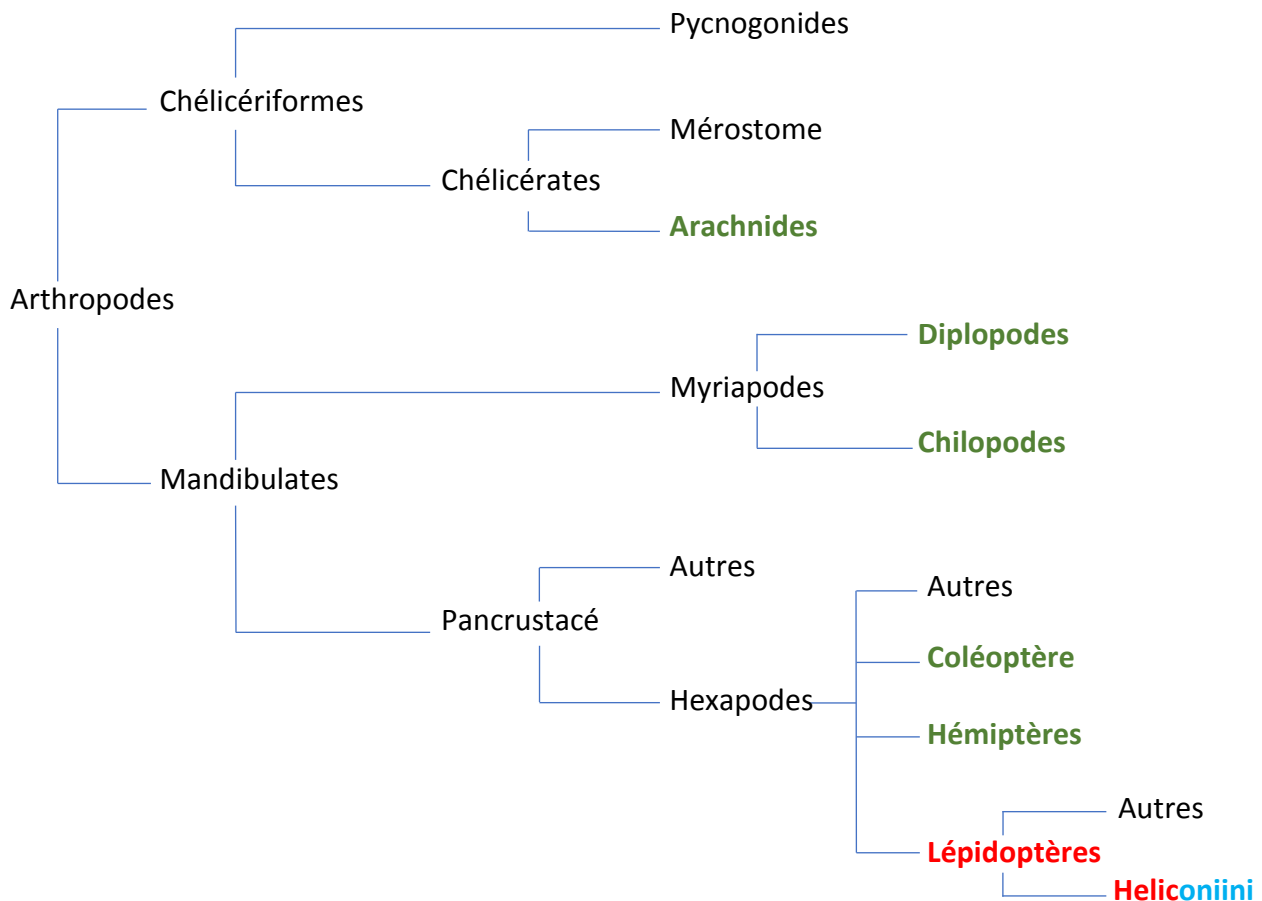


Figure 10 : Phylogénie très simplifiée des animaux cyanogènes, qui sont restreints aux arthropodes. Le code couleurs des taxons correspond indiquent la présence de glucosides cyanogènes aromatiques (vert), aliphatiques (rouge) et cyclopenténoïques (bleu). Les Heliconiini sont les seuls à présenter des composés cyclopenténoïques et aliphatiques.

Les glucosides cyanogènes sont des phyto-composés cosmopolites et anciens

Plus de 75 glucosides cyanogènes différents ont été catalogués au sein de 130 familles de plantes dans plus de 2650 espèces parmi les filicophytes, les gymnospermes et les angiospermes (Araceae, Asteraceae, Compositae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Leguminosae, Linaceae, Passifloraceae, Poaceae, Rosaceae...) (Robinson, 1930; Nahrstedt *et al.*, 1990; Bolarinwa *et al.*, 2016). Cette large distribution parmi les plantes trachéophytes suggère que la capacité de produire de tel composé a été sélectionné il y a au moins 300 millions d'années (Zagrobelny *et al.*, 2004; Bak *et al.*, 2006). Les passiflores peuvent produire une trentaine de glucosides cyanogènes différents des trois classes structurales : aliphatique,

aromatique et cyclopenténoïque (Spencer & Seigler, 1987; Jaroszewski *et al.*, 2002; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Une hypothèse est que les pressions de prédation exercées par les herbivores ont favorisé la diversification des glucosides cyanogènes chez les passiflores (Spencer, 1988). Dans la littérature, il apparaît que les glucosides cyanogènes aliphatiques comme la linamarine et la lotaustraline sont les plus répandus (Zagrobelny, de Castro, *et al.*, 2018). Cette vision peut être biaisée car beaucoup d'études se concentrent sur ces deux composés qui sont très bien caractérisés, dont l'extraction et quantification sont relativement faciles. Linamarine et lotaustraline sont souvent concomitantes car une même enzyme permet d'achever la biosynthèse des deux (Hahlbrock & Conn, 1971; Nahrstedt & Davis, 1983). Au contraire, les glucosides cyanogènes cyclopenténoïques sont restreints à peu quelques familles de plantes proches incluant Achariceae, Malesherbiaceae, Passifloraceae, Salicaceae, Turneraceae et Violaceae, capables de métaboliser le précurseur L-2-cyclopentenyl-glycine (Bjarnholt & Møller, 2008; Zagrobelny, de Castro, *et al.*, 2018).

Les glucosides cyanogènes sont des métabolites secondaires multifonctions

Depuis environ deux siècles les recherches scientifiques ont considérablement amélioré les connaissances sur les métabolites secondaires. Autant chez les plantes que chez les animaux, les glucosides cyanogènes sont impliqués dans différentes voies métaboliques et ne sont plus considérés comme des molécules exclusivement défensives. Les produits de l'hydrolyse du mandelonitrile et prunasine (des glucosides cyanogènes aromatiques) entrent en jeu dans la communication intraspécifique des diplopodes (Myriapoda) (Shear, 2015). Chez les Heliconiini et les Zygaenidae, le mâle transfère à la femelle des glucosides cyanogènes par le biais de son spermatophore en guise de « cadeau nuptial » lors de l'accouplement (Zagrobelny *et al.*, 2014). Des recherches très approfondies sur le papillon zygène de la filipendule, *Zygena filipendulae* (Zygaenidae), ont montré que le cyanure d'hydrogène, l'acétone et le 2-butanone, qui sont les composés volatiles respectivement issus de la dégradation de la linamarine et lotaustraline, interviennent dans la composition des bouquets phéromonaux des mâles et des femelles (Zagrobelny *et al.*, 2015). Les glucosides cyanogènes sont aussi un critère de sélection dans le choix d'un partenaire sexuel, les femelles *Z. filipendulae* préférant les mâles avec de fortes teneurs (Zagrobelny, Bak, Olsen, *et al.*, 2007). La production de métabolites secondaires est énergétiquement coûteuse. Ainsi, la quantité d'émission de ces composés volatiles est potentiellement un signal honnête de la teneur en glucosides cyanogènes des individus. Au-

delà de la défense chimique, les glucosides cyanogènes servent également de molécule de stockage et de transport d'azote et sucre aussi bien chez les plantes que les zygènes (Selmar *et al.*, 1988; Sánchez-Pérez *et al.*, 2008; Zagrobelny & Møller, 2011). Par exemple lors du développement des graines de l'arbre à caoutchouc *Hevea brasiliensis*, la linamarine et lotaustraline sont catabolisées en composés non cyanogènes sans libération de cyanure d'hydrogène hautement toxique (HCN) (Lieberei *et al.*, 1985). Le mandelonitrile un glucoside cyanogène aromatique est métabolisé en acide salicylique chez le pêcher *Prunus persica* (Diaz-Vivancos *et al.*, 2017). Les voies de synthèse des métabolites primaires et secondaires –dont des glucosides cyanogènes– s'entremêlent et sont partagées. Il a été montré que cette innovation évolutive permet de réduire les coûts énergétiques de production de métabolites (Neilson *et al.*, 2013).

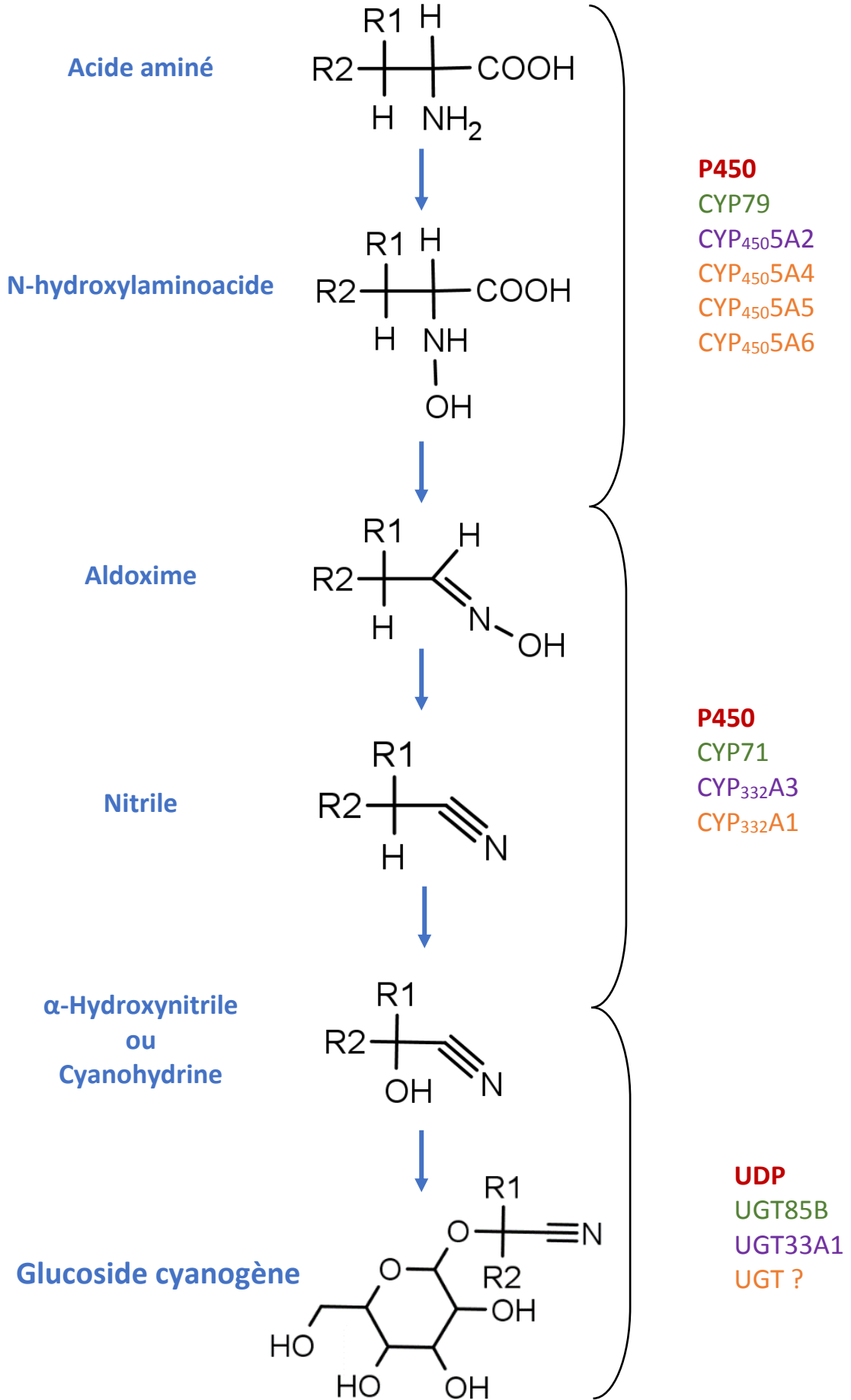
Le niveau de production des glucosides cyanogènes est instable et varie au cours du temps, selon l'ontogénèse et la phénologie comme cela a été démontré chez les passiflores (Hay-Roe & Nation, 2007; Gleadow & Møller, 2014). Le métabolisme des glucosides cyanogènes est en fait un trait plastique influencé par les conditions biotiques et abiotiques auxquels fait face chaque plante. Chez le trèfle blanc *Trifolium repens*, la teneur en linamarine est plus forte le matin qu'en fin de journée, et la quantité de prunasine du toyon de Californie *Heteromeles arbutifolia* est plus importante au printemps qu'en automne (Dement & Mooney, 1974; Conn, 1978). Chez les rosacées et les espèces des mangroves du genre *Pangium* (Achariaceae), la quantité totale de glucoside cyanogène diminue progressivement dans les feuilles matures et sont éliminés lors de la sénescence des feuilles (Robinson, 1930). Si les cassaves *Manihot sp.*, font face à de fortes sécheresses, la concentration de linamarine et lotaustraline augmentent dans les tubercules (McKey *et al.*, 2010). Souvent, la présence de glucosides cyanogènes est renforcée dans les graines et les jeunes tissus fragiles comme les méristèmes (Frehner *et al.*, 1990; Forslund *et al.*, 2004; Hay-Roe & Nation, 2007). Les tissus sensibles reproducteurs et de croissance sont exposés et vulnérables aux attaques des herbivores, une allocation des glucosides cyanogènes dans de tels tissus sensibles pourrait être une conséquence de la sélection naturelle filtrant les individus les mieux défendus.

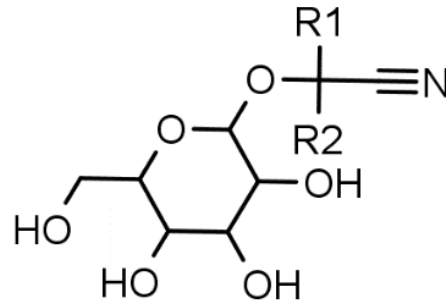
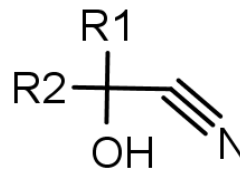
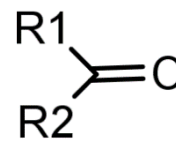
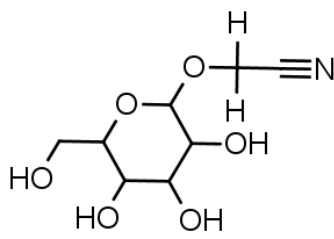
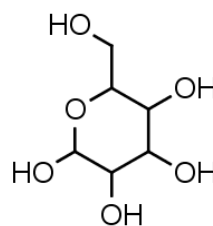
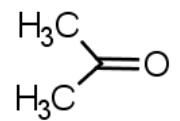
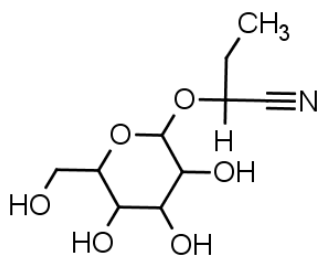
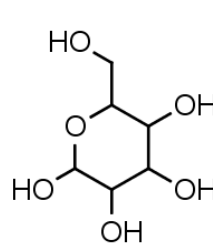
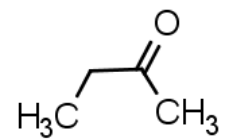
Convergence évolutive entre les plantes et les insectes des voies métaboliques des glucosides cyanogènes

Biosynthèse des glucosides cyanogènes

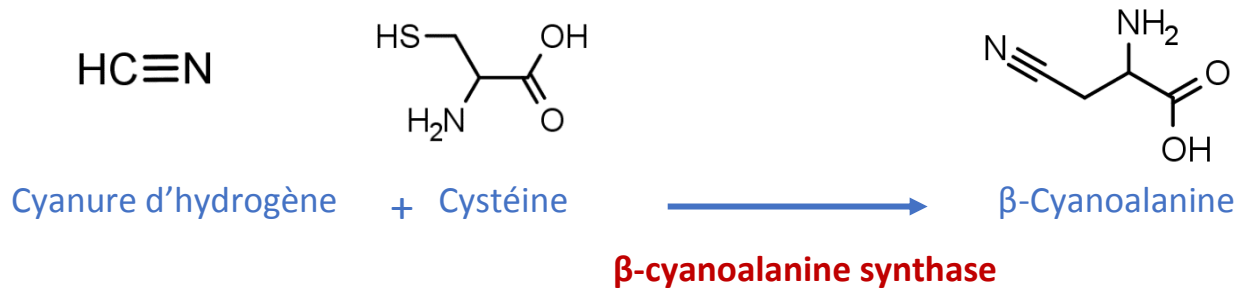
Les voies de biosynthèse des glucosides cyanogènes aliphatiques ont d'abord été bien étudiée chez les plantes tel que le millet à balai (*Sorghum bicolor*, Poaceae) (Kahn *et al.*, 1997; Bak *et al.*, 1998; Thorsøe *et al.*, 2005). Les intermédiaires en jeu sont les mêmes chez les plantes et les papillons (Fig. 11A) (Bak *et al.*, 2006; Zagrobelyny *et al.*, 2008). Chez les Heliconiini et les zygènes ces voies métaboliques sont supposées orthologues (Chauhan *et al.*, 2013). Les premières étapes, de l'acide aminé à la formation d'une cyanohydrine (ou α -hydroxynitrile) sont catalysées par des enzymes de la famille des P₄₅₀ (Bak *et al.*, 2006). Les gènes identifiés dans cette conversion sont les cytochromes CYP4505A2 et CYP332A3 chez les zygènes et CYP79 et CYP71 chez les plantes (Bak *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2011). La cyanohydrine formée est stabilisée par l'ajout d'un sucre, ce qui forme le glucoside cyanogène final. Cette réaction est catalysée par une enzyme de la classe des UDP-glucuronosyltransferase (UDP-Glucose dépendant) ; l'UGT85B chez les plantes et UGT33A1 chez les zygènes. Grâce au séquençage et à l'analyse du génome d'*Heliconius melpomene*, des gènes candidats impliqués dans cette voie de biosynthèse ont été identifiés (The Heliconius Genome Consortium *et al.*, 2012; Chauhan *et al.*, 2013). Trois cytochromes très proches, de 85 à 88% de similarité de séquence codante, sont susceptibles de catalyser les premières étapes de conversion de l'acide aminé en aldoxime : les CYP4505A4, CYP4505A5 et CYP4505A6. Les réactions de passage de l'aldoxime à la cyanohydrine sont catalysées par le CYP332A1. En revanche aucun gène candidat UDP-G n'a pu être identifié (Zagrobelyny, Jensen, *et al.*, 2018).

A



B**Glucoside cyanogène****β-glucosidase****α-Hydroxynitrile
ou
Cyanohydrine****α-hydroxynitrilase****HC≡N****Cyanure d'hydrogène****Aldéhyde ou cétone****C****Linamarine****Glucose**+ **HC≡N** +**Cyanure d'hydrogène****Acétone****Lotaustraline****Glucose**+ **HC≡N** +**Cyanure d'hydrogène****2-Butanone**

D1



D2



Figure 11 : Métabolisme des glucosides cyanogènes. A) Anabolisme des glucosides cyanogènes. Le nom des molécules est écrit en bleu à gauche. Le nom des enzymes impliquées est noté à droite. En rouge : nom de la famille d'enzyme, en vert : nom de l'enzyme de plante du genre *Lotus*, en violet : nom de l'enzyme de la zygène de la filipendule, en orange : nom de l'enzyme chez *Heliconius melpomene*. B) La cyanogénèse, catabolisme des glucosides cyanogènes. Le nom des enzymes est noté en rouge à droite. C) Produits de dégradation des glucosides cyanogènes linamarine et lotaustraline. D1) Mécanismes de détoxification du cyanure d'hydrogène chez les plantes et insectes et D2) chez plantes, insectes et autres animaux. D'après Zagrobelny et al. (2004), Jensen et al. (2011), Chauhan et al. (2013).

La cyanogénèse : catabolisme des glucosides cyanogènes et libération de produits toxiques

Les glucosides cyanogènes sont chimiquement stables et inertes sans toxicité particulière (Bolarinwa et al., 2016). Comme d'autres classes chimiques : les glucosides benzoxazinoïdes, avenacosides et glucosinolates, ce sont des phytoanticipines, des métabolites secondaires bioactivés sous l'action d'enzyme β -glucosidase (Morant et al., 2008). Le catabolisme des glucosides cyanogènes appelé cyanogénèse a été décrit pour la première fois en 1803 et ne requiert que deux enzymes (Conn, 1978). Une première enzyme β -glucosidase convertie le glucoside cyanogène en cyanohydrine via une hydrolyse du glucose en rompant la liaison osidique. En milieu acide, la cyanohydrine est ensuite clivée par une seconde enzyme α -

hydroxynitrilase ou spontanément à des pH > 6, en cyanure d'hydrogène HCN (acide prussique) et cétone ou aldéhyde (ce qui dépend de l'acide aminé précurseur) (Fig. 11B) (Robinson, 1930; Poulton, 1990; Pentzold *et al.*, 2015). Chez la zygène du trèfle *Z. trifolii*, l' α -hydroxynitrile lyase a été isolée à partir de son hémolymphe (Müller & Nahrstedt, 1990). Plusieurs β -glucosidases caractérisées chez les plantes et les insectes ont un pH optimum aux alentours de 5-6 (Zagrobelny *et al.*, 2004; Morant *et al.*, 2008; Ketudat Cairns & Esen, 2010). La seule β -glucosidase à avoir été caractérisée chez les insectes est codée par le gène ZfBGD2 chez la zygène de la filipendule *Zygena filipendulae* (Zygaenidae), un papillon de nuit vivant le jour (Pentzold *et al.*, 2017). Les β -glucosidases insectes n'ont pas livré leurs secrets mais il est établi qu'elles sont très spécifiques des β -glucosides (Nahrstedt, 1979). Les *Heliconius* produisent des β -glucosidases qui inhibent, du moins temporairement, les β -glucosidases des passiflores évitant ainsi le déclenchement de la cyanogénèse et le relargage de métabolites toxiques (Spencer, 1988). Deux voies d'inhibition ont été étudiées, i) lorsque les larves de papillons détruisent les tissus des passiflores, les β -glucosidases *Heliconius* se fixent au complexe de la plante glucoside cyanogène/ β -glucosidases. Ce complexe d'un substrat et de deux enzymes est inactif et précipite. ii) Les β -glucosidases *Heliconius* hydrolysent et neutralisent les β -glucosidases de la plante hôte. Ces deux réactions ont été observées *in vitro* et semble également se produire *in vivo* (Spencer, 1988). Chez la passiflore *P. edulis* et le papayer *Carica papaya*, deux plantes cyanogènes, les β -glucosidases sont inhibées par la présence de tanins (Goldstein & Spencer, 1985). Si les β -glucosidases des *Heliconius* peuvent inhiber celles des passiflores, il n'y a pas encore d'étude sur le potentiel rôle des tanins dans la neutralisation des β -glucosidases des *Heliconius*. La spécificité et le pouvoir d'inhibition des enzymes d'*Heliconiini* et passiflores suggèrent un processus adaptatif chez les *Heliconiini*.

L'accumulation des défenses chimiques et l'expression des enzymes de dégradation β -glucosidases sont régulées au cours du développement (Forslund *et al.*, 2004; Morant *et al.*, 2008). Le cyanure d'hydrogène, bloque la respiration cellulaire en se fixant sur les cytochromes oxydases terminaux de la chaîne de respiration mitochondriale. Ces liaisons mettent fin à la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) donc la production d'énergie cellulaire, et empêche l'utilisation du dioxyde d'oxygène, entraînant la mort de la cellule et de l'organisme entier à trop fortes doses (Conn, 1978; Nelson, 2006; Contam *et al.*, 2019). Chez les plantes les substances cyanogènes sont majoritairement des glucosides cyanogènes mais

chez la famille des Sapindaceae (Angiosperma) ce sont des lipides cyanogènes (Conn, 1980). La cyanogénèse s'observe aussi chez l'acarier *Oribatula tibialis* (Arachnida), mais le précurseur de l'HCN n'est pas un glucoside cyanogène mais de l'hexanoate mandelonitrile, un ester aromatique cyanogène (Brückner *et al.*, 2017). Chez les champignons (*Clitocybe*, *Marasmius*, *Pholiota*...) et bactéries cyanogènes (*Pseudomonas*, cyanobactéries, protéobactéries), le cyanure d'hydrogène est synthétisé à partir de l'acide aminé glycine, sans formation d'un métabolite intermédiaire tel qu'un glucoside ou un lipide cyanogène (Knowles, 1976; Bunch & Knowles, 1982; Askeland & Morrison, 1983). Certaines bactéries du microbiote intestinal (des mammifères par exemple) peuvent dégrader la linamarine et l'amygdaline et ainsi produire du cyanure d'hydrogène (Newton *et al.*, 1981).

Compartmentation des protagonistes de la bombe cyanure

La cyanogénèse ne peut se déclencher que lorsque l'enzyme β -glucosidase et son substrat le glucoside cyanogène sont en contact (Conn, 1978). L'enzyme et son substrat sont physiquement séparés dans des tissus ou des compartiments cellulaires différents, ce qui prévient une dégradation anticipée des glucosides cyanogènes et une auto-intoxication (Swain *et al.*, 1992; Poulton & Li, 1994). Il est assez classique que les défenses chimiques soient glucosilées car cela les rend inactives et renforce leur stabilité et solubilité si elles sont stockées dans la vacuole par exemple (Morant *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2013). En effet, chez les plantes à fleurs (Angiosperma), les réserves de phytoanticipines comme les glucosides cyanogènes sont accumulées dans la vacuole (Saunders *et al.*, 1977; Oba *et al.*, 1981; Gruhnert *et al.*, 1994). Chez les eudicotylédones, dont font parties les Passifloraceae, les β -glucosidases sont glucosilées et réparties dans l'apoplasme ou le cytoplasme (Kakes, 1985; Frehner & Conn, 1987; Poulton & Li, 1994). Chez les plantes monocotylédones les β -glucosidases sont stockées non glucosilées dans les chloroplastes (Thayer & Conn, 1981; Nisius, 1988). Ainsi, c'est une altération physique, comme une attaque d'herbivores qui va rompre les tissus et mettre en contact l'enzyme et le substrat ce qui déclenche la cyanogénèse (Conn, 1978; Poulton & Li, 1994; McKey *et al.*, 2010). Ainsi, la libération des produits de dégradation des glucosides cyanogènes sont perçus comme étant les véritables molécules défensives au lieu des glucosides cyanogènes intacts (Nahrstedt, 1989; London-Shafir *et al.*, 2003). Ce système bipartite et compartimenté permet de fournir une réponse défensive immédiate et efficace contre les herbivores (Morant *et al.* 2008).

Détoxication des produits de la cyanogénèse

Les insectes peuvent éliminer par les fèces les glucosides cyanogènes intacts ou métaboliser les produits de la cyanogénèse (Fig. 11D) (Pentzold *et al.*, 2015). Chez les papillons et l'acarien ravageur de cultures *Tetranychus urticae*, le cyanure d'hydrogène est principalement pris en charge par une β -cyanoalanine synthase (Fig. 11D1), alors que chez d'autres animaux le cyanure est détoxifié par une rhodanase (thiosulfate : cyanure sulfurtransférases) (Fig. 11D2) (Bordo, 2002; Wybouw *et al.*, 2014). La β -cyanoalanine synthase catalyse la conversion d'une cystéine et de cyanure d'hydrogène HCN en β -cyanoalanine et H₂S (Witthohn & Naumann, 1987a). Chez les plantes et les insectes la β -cyanoalanine synthase est en partie située dans les mitochondries, organelle sensible au cyanure d'hydrogène qui altère sa chaîne respiratoire (Meyers & Ahmad, 1991). Les Heliconiini et Zygaenidae semblent exclusivement utiliser la voie de la β -cyanoalanine synthase pour détoxifier le cyanure d'hydrogène car aucune rhodanase candidate n'a été identifiée à ce jour (Witthohn & Naumann, 1987a). Chez les Heliconiini, la répartition de la β -cyanoalanine synthase n'est pas connue mais chez les larves de zygènes elle est active au niveau du des corps gras, des tissus digestifs et de l'inter-tégument (Nahrstedt, 1979). Les β -cyanoalanines ainsi formées s'accumulent dans l'hémolymphe à hauteur de 75%, le reste dans le tégument (Nahrstedt, 1979; Witthohn & Naumann, 1987a). De même la β -cyanoalanine synthase n'est active que durant les stades larvaires chez *Heliconius melpomene*. Pour ces papillons, les larves font face aux glucosides cyanogènes de leurs plantes hôtes qu'elles ingèrent puis détoxifient (Witthohn & Naumann, 1987a). *H. sara* séquestre en grande quantité de l'épivolkenine, un glucoside cyanogène cyclopenténoïque à partir des passiflores. Par un mécanisme enzymatique unique, le groupe nitrile (-CN) de l'épivolkenine est substitué par un groupe thiol (-SH) (Engler *et al.*, 2000). La molécule résultante non cyanogène est nommée sarauriculatine, du nom de la plante hôte d'*H. sara*, *P. auriculata*.

Les défenses chimiques soumises à la pression de sélection exercée par les prédateurs

Une sélection par les prédateurs agissant dès le stade chenille ?

Un certain nombre de métabolites défensifs et notamment des glucosides cyanogènes sont séquestrés à partir des passiflores, suggérant que les défenses chimiques des chenilles seraient potentiellement une conséquence de leur adaptation aux défenses des plantes. Cependant, ces glucosides cyanogènes pourraient également jouer un rôle anti-prédateur dès le stade chenille, si bien que ceux-ci pourraient exercer une pression de sélection sur les variations de glucosides cyanogènes au stade chenille. Au cours des derniers stades larvaires, les chenilles d'Heliconiini développent des défenses physiques tels que des piquants et accumulent des composés répulsifs pour les prédateurs tels que les oiseaux, les fourmis et les hyménoptères parasitoïdes. Leurs couleurs contrastées (Fig. 12) sont supposées avoir évolué en réponse aux pressions de prédation, et constituer un signal visuel de non comestibilité pour les prédateurs potentielles (Wallace, 1867). Les larves d'*H. charithonia*, *H. melpomene* et *Dryas iulia* émettent des pyrazines (2-Methoxy-3-alkylpyrazines), des molécules volatiles qui alertent les prédateurs d'un potentiel danger (Guilford *et al.*, 1987; Moore *et al.*, 1990). Chez les oiseaux, l'aversion pour les proies est plus forte si la pyrazine est associée à un signal coloré contrasté (Rowe & Guilford, 1996; Lindström, Rowe, *et al.*, 2001; Siddall & Marples, 2011), comme celui des chenilles ou des adultes des Heliconiini.



Figure 12 : Variabilité morphologique interspécifique des chenilles Heliconiini. De gauche à droite et de haut en bas : *Heliconius cydno*, *H. charithonia*, *H. hecale*, *H. erato*, *Eueides aliphera*, *Philaethria dido*, *H. doris*, *Agraulis vanillae*, *Dryas iulia*. D'après Jiggins (2016).

Les larves de zygènes (Zygaenidae) émettent du cyanure d'hydrogène volatile (HCN) issue de la cyanogénèse qui contribue à leur défense contre leurs prédateurs (Witthohn & Naumann, 1987b; Zagrobelny, Bak, Olsen, *et al.*, 2007). Aux vues des similarités des voies métaboliques des glucosides cyanogènes entre Heliconiini et Zygaenidae, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un tel phénomène peut se produire également chez les larves Heliconiini. Bien que la potentielle émission de HCN n'ait jamais été étudiée chez les Heliconiini, cette hypothèse mérite d'être considérée et approfondie. Lorsqu'un prédateur rompt les piquants des larves d'Heliconiini, cela libère des gouttes d'hémolymphe (observation personnelle). La composition exacte est inconnue mais des analyses démontrent la présence de linamarine et lotaustraline dans l'hémolymphe d'*H. melpomene* (Nahrstedt & Davis, 1983; de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019). De même, les larves de la zygène du trèfle *Z. trifolii* sécrètent de la linamarine et lotaustraline dans des gouttelettes répulsives pour les oiseaux (*Sturnus vulgaris*) et les lézards (*Anolis carolinensis*) (Franzl & Naumann, 1985). Ces gouttelettes sont également chargées en eau, protéines, β -cyano-L-alanine et sucres qui rendent les sécrétions tellement visqueuses et collantes qu'elles peuvent engluer les mandibules des fourmis et pattes d'araignées (Franzl & Naumann, 1985; Pentzold *et al.*, 2016). Les défenses chimiques sont également importantes au stade chrysalide, où les papillons immobiles sont plus vulnérables. Les chenilles du monarque *Danaus pexippus* (Danainae) nourries sur l'asclépiade *Asclepias curassavica* (Apocynaceae) riche en cardénolides sont moins attaquées par la guêpe parasitoïde *Pteromalus puparum* (Pteromalidae) au stade chrysalide, par rapport aux chrysalides dont les chenilles ayant consommé *A. incarnata*, moins riche en cardénolides (Stenoien *et al.*, 2019). Le rôle de la prédation aux stades chenille et chrysalide sur l'évolution des défenses chimiques chez les Heliconiini reste encore largement inconnu, mais pourrait potentiellement expliquer les variations de niveaux de glucosides cyanogènes entre espèces dont les chenilles vivent de manière solitaires ou grégaires (Arias, Meichanetzoglou, *et al.*, 2016).

Un rôle anti-prédateur majeur au stade adulte

Les oiseaux, prédateurs prépondérants des Heliconiini adultes (Chai, 1986a; Langham, 2004; Finkbeiner *et al.*, 2012), ainsi que les lézards délaissent immédiatement les Heliconiini après les avoir capturés et souvent indemnes (Boyden, 1976; Chai, 1986a; Pinheiro & Campos, 2019). Ce rejet rapide par les prédateurs suggère la présence de molécules de défenses ayant

un pouvoir répulsif important. Chez les Heliconiini adultes, des glucosides cyanogènes sont détectés dans l'hémolymphe mais aussi dans les ailes (Hay-Roe & Nation, 2007). Le rejet des Heliconiini par les oiseaux pourrait ainsi être une conséquence des produits de dégradation des glucosides cyanogènes qui les rendent impropres à la consommation. Suite à une attaque déclenchant la cyanogénèse, la linamarine est clivée en cyanure d'hydrogène et acétone. Le cyanure de sodium (utilisé pour mimer le cyanure d'hydrogène HCN), repousse les poussins du poulet domestique (*Gallus gallus domesticus*), un modèle prédateur courant pour les expériences de comportement (Cardoso, 2019). En revanche, si l'acétone ne repousse pas les poussins il augmente le temps d'ingestion. Même si les glucosides cyanogènes sont inertes et intactes (Bolarinwa *et al.*, 2016), ils sont perçus comme ayant un goût amer par les oiseaux (et aussi par les primates dont les humains) à cause de leur interaction avec les récepteurs gustatifs de la famille Tas2r détectant l'amertume (Dong *et al.*, 2009; Imai *et al.*, 2012; Wang & Zhao, 2015). Cependant, il n'y a pas de preuve directe que les Heliconiini sont rejetés sur la base de leur goût amer puisque la linamarine intacte ne suscite aucun rejet de la part des poussins (Cardoso, 2019).

Il n'est pas exclu que des effets synergétiques entre les glucosides cyanogènes ou avec d'autres molécules déclenchent une aversion plus prononcée chez les prédateurs. En effet les β -carbolines alcaloïdes sont aussi réputés amers (Nishida, 2002) et l'odeur caractéristique de certaines espèces d'Heliconiini pourrait intervenir dans la répulsion des prédateurs (Crane, 1955) même s'il n'existe pas encore de preuve formelle. En effet, les bouquets phéromonaux d'*H. melpomene*, *H. atthis*, *H. timareta*, *H. cydno* contiennent plusieurs pyrazines (Moore *et al.*, 1990; Schulz *et al.*, 2008; Darragh *et al.*, 2019), des molécules très odorantes et souvent associées à un signal d'alerte par les prédateurs (Guilford *et al.*, 1987). Chez les papillons en général, les métabolites secondaires de défenses peuvent aussi être impliqués dans les voies métaboliques phéromonales. La tribu des Ithomiini, des papillons mimétiques des Heliconiini au stade adulte, est un excellent exemple d'espèces séquestrant des alcaloïdes pyrrolizidiniques qui sont à la fois des composés défensifs et précurseurs de phéromones sexuelles (Schulz, 1992; Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996). Cependant chez les Heliconiini, il n'y a pas de lien établi entre les phéromones et la teneur en glucosides cyanogènes.

Peu d'oiseaux sont connus pour s'attaquer aux Heliconiini et les observations d'événements de prédatons sont rares (Pinheiro & Cintra, 2017). Les oiseaux prédateurs d'Heliconiini font partis de la famille des jacamars (Galbulidae) et particulièrement du genre *Galbula*, ainsi que de la famille des Tyrannidae dont les genres *Myiodynastes* et *Hirundinea* (Pinheiro, 2003; Pinheiro & Cintra, 2017). De par leur vol assez lent et nonchalant caractéristique les Heliconiini sont réputés faciles à capturer et les oiseaux naïfs les relâchent aussitôt, alors que les oiseaux expérimentés sont réticents à les attaquer (Chai, 1986a; Pinheiro & Campos, 2019). Les Heliconiini combinent des couleurs vives très contrastées sur les deux faces de leurs ailes et des défenses chimiques non perceptibles visuellement par les prédateurs. Certains individus sont tout de même consommés par les oiseaux, ce qui peut être expliqué par leur niveau de satiété et la variabilité des défenses chimiques des papillons qui en font des proies plus ou moins acceptables (Chai, 1986a). Les prédateurs affamés sans source de nourriture alternative sont moins discriminants. Ainsi, le criquet puant *Zonocerus variegatus* (Pyrgomorphidae) rejette d'ordinaire le manioc *Manihot esculente* (Euphorbiaceae) qui lui est toxique et fatal. En cas de pénurie d'autres sources de nourriture, le criquet s'alimente sur le manioc en ce qui entraîne une perte progressivement de leur poids s'ils ne consomment plus que cette plante (Bernays *et al.*, 1977). S'alimenter sur des plantes chimiquement défendues a un coût très fort pour les insectes ne disposant pas de la machinerie enzymatique nécessaire pour gérer les métabolites secondaires de défenses de la plante. Comprendre l'évolution des défenses chimiques chez les Heliconiini requiert donc de documenter non seulement les variations des concentrations en défenses chimiques entre individus ou entre espèces, mais également les variations dans la nature des composés chimiques qui peuvent avoir des effets différents en termes de (1) goût, avec des effets répulsifs immédiats, et de (2) toxicité, avec des effets néfastes sur les prédateurs à plus long terme.

Evolution de la coloration chez les espèces mimétiques possédant des défenses chimiques

L'évolution des défenses chimiques chez les Heliconiini, comme chez d'autres espèces non-comestibles semble étroitement liée à l'évolution de colorations vives, bien repérables visuellement par les prédateurs. Ces papillons sont ainsi qualifiés d'aposématiques, car ils présentent à la fois des molécules de défenses et des patrons de colorations vifs et contrastés perçu comme un signal d'avertissement par les prédateurs potentiels (Joron, 2009). Les prédateurs sont en mesure d'associer le patron de coloration des individus avec leur mauvais goût (Poulton, 1890; Alcock, 1970a; Goodale & Sneddon, 1977). En se basant sur leurs expériences gustatives désagréables, les oiseaux apprennent à éviter les individus arborant le même patron de coloration. Les patrons de couleurs vives, facilement mémorisables, sont ainsi fréquemment observés chez les espèces présentant des défenses chimiques. Parfois l'intensité du patron de coloration d'un individu constitue un « signal honnête » et reflète le niveau de défenses chimiques, comme c'est le cas chez les coccinelles *Harmonia axyridis* (Bezzarides *et al.*, 2007; María Arenas *et al.*, 2015) ou les grenouilles *Dendrobates pumilio* (Maan & Cummings, 2012). La théorie du signal honnête n'est pas toujours vérifiée, en particulier chez les papillons de la tribu des Ithomiini (Danainae : Nymphalidae). Bien que tous soient aposématiques et mimétiques, certaines espèces moins détectables par les prédateurs car ayant les ailes transparentes (Arias *et al.*, 2019) sont autant voire plus chimiquement défendues que les espèces aux ailes colorées et opaques (McClure *et al.*, 2019).

Cercle mimétique : regroupement d'espèces d'Heliconiini ayant localement le même patron de coloration

Les prédateurs apprennent à associer un patron de coloration aux défenses chimiques et peuvent ensuite généraliser leur aversion à d'autres patrons similaires. Cette généralisation du patron de coloration des papillon à éviter est d'autant plus renforcée que l'expérience initiale est désagréable (Ham *et al.*, 2006). Le type de molécules de défense et leurs concentrations sont donc potentiellement des éléments clefs de l'apprentissage du patron de coloration et de sa généralisation par les prédateurs. Plusieurs études en milieu naturel indiquent que les oiseaux exercent une forte pression de sélection sur les papillons (Benson, 1972; Chai, 1986a; Mallet & Barton, 1989; Pinheiro & Campos, 2019) et par conséquent sur

l'évolution de la coloration et des défenses chimiques en filtrant les individus les mieux défendus et ceux dont le patron de coloration est déjà connu. L'apprentissage des prédateurs génère une sélection nombre-dépendante qui favorise les papillons arborant le patron de coloration le plus abondant au sein de la communauté locale de papillons chimiquement défendus (Chouteau *et al.*, 2016). Localement, cette sélection favorise la convergence entre les différentes espèces de papillons chimiquement défendus vers un même patron de coloration des ailes, formant ainsi un cercle mimétique (Fig. 13). On parle alors de mimétisme Müllerien (Müller, 1879a) comme d'une interaction interspécifique positive, la coexistence entre espèces co-mimes diminuant le risque individuel de prédation. Plus un cercle mimétique est abondant, plus le risque de prédation est dilué entre tous les papillons des différentes espèces co-mimes (Müller, 1879a; Joron & Mallet, 1998a). Un cercle mimétique a une aire de distribution plus ou moins étendue, et les aires de plusieurs cercles mimétiques peuvent éventuellement se chevaucher (Mallet & Gilbert, 1995). Les communautés de prédateurs varient entre différentes localités mais aussi entre les micro-habitats d'une même localité (sous-bois – canopée par exemple, Fig. 14) (Elias *et al.*, 2009; Willmott *et al.*, 2017). Ainsi, différents cercles mimétiques peuvent coexister au sein d'une localité.

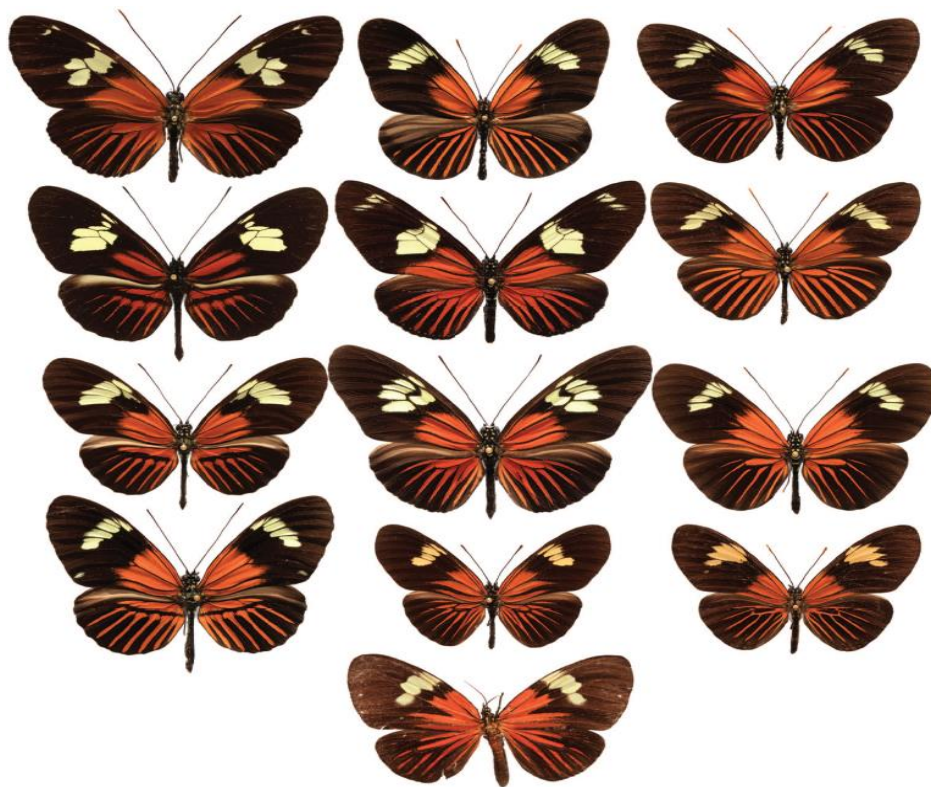


Figure 13 : Le cercle mimétique « Dennis ray ». Ces espèces co-mimes d'Heliconiini vivent au Pérou et en Equateur mais ne sont pas présentes toutes en même temps au sein d'une localité.

De gauche à droite et de haut en bas : *H. burneyi huebneri*, *H. aoede auca*, *H. xanthocles zamora*, *H. timareta timareta*, *H. doris doris*, *H. demeter ucayalensis*, *H. melpomene malleti*, *H. egeria homogena*, *H. erato emma*, *H. elevatus pseudocupidineus*, *Eueides heliconioides eanes*, *E. tales calathus* et *Chetone phyleis*, (Arctiidae : pericopinae) un péricopine mimétique. D'après Jiggins (2016).



Figure 14 : Les communautés de prédateurs peuvent varier au sein même d'une localité, le long d'un gradient altitudinal par exemple. Sous la pression de sélection des différentes espèces de prédateurs (symbolisées ici par un seul oiseau), les patrons de coloration des papillons ne convergent pas forcément, ce qui entraîne la formation de différents cercles mimétiques par micro-habitat. Schéma d'après Elias & Joron (2015).

Diversification phénotypique au sein des espèces mimétiques

Les patrons de coloration varient fréquemment au sein des nombreuses espèces d'Heliconiini, définissant ainsi des races géographiques ou sous-espèce (Braby *et al.*, 2012). Par exemple l'espèce *H. melpomene* est décrite comme possédant 29 sous-espèces réparties dans différentes localités en Amérique Centrale et du Sud (Jiggins, 2016). Les individus d'une même espèce peuvent ainsi appartenir à des cercles mimétiques différents, selon leur patron de coloration et distribution géographique. Bien que phylogénétiquement distants au sein du genre, les patrons de coloration des sous-espèces d'*H. erato* et *H. melpomene* sont très similaires au sein d'une même région géographiques et varient conjointement entre localités (Fig. 15). La convergence entre espèces vers un patron de coloration commun dépend ainsi de leurs histoires biogéographiques respectives, mais aussi de leurs niveaux de défenses

chimiques et de leur abondance relative. En effet, la sélection fréquence dépendante positive exercée par les prédateurs tend à favoriser le patron le plus abondant et cette sélection est modulée par le niveau de défenses chimiques ; un signal associé à une défense forte peut ainsi être plus rapidement appris, qu'un signal associé à des défenses plus faibles. Ainsi l'évolution des patrons de coloration mimétiques est fortement influencée par les variations de défenses chimiques. Inversement la sélection exercée par les prédateurs sur les défenses chimiques des papillons mimétiques dépend fortement de l'abondance locale des co-mimes et de l'effet de leurs défenses respectives sur les prédateurs.

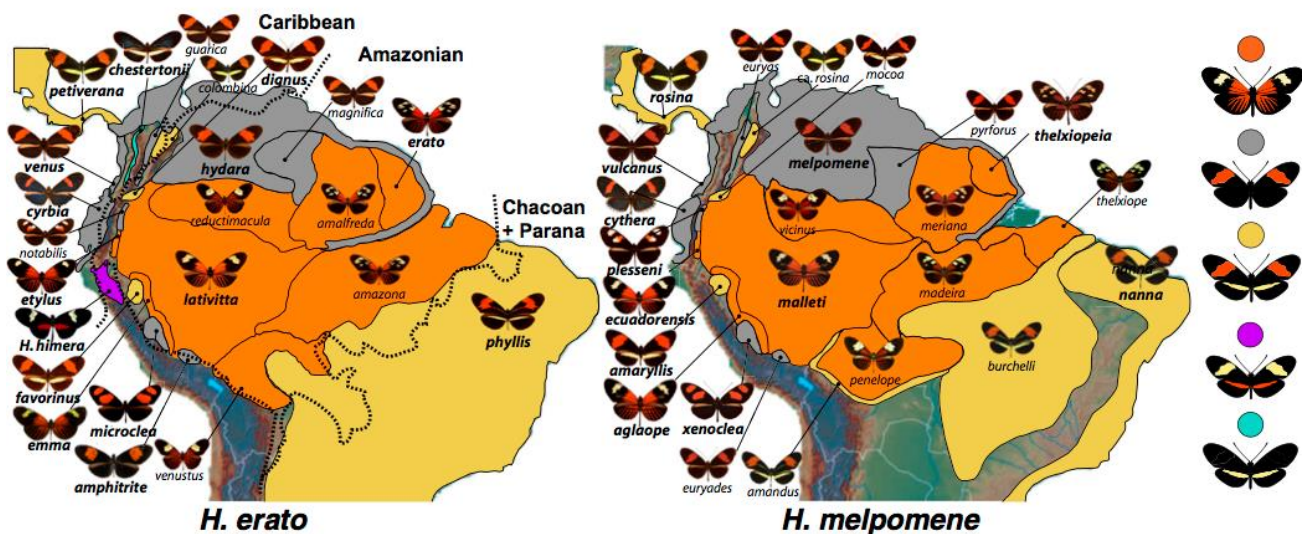


Figure 15 : Convergence évolutive entre les sous-espèces mimétiques d'*H. erato* (gauche) et *H. melpomene* (droite). Chaque espèce présente différents patrons de coloration selon les localités, formant ainsi des « sous-espèces ». Les régions où vivent des sous-espèces différentes mais ayant la même couleur sont représentées de la même couleur sur la carte (en fonction des catégories grossières établies tout à droite). Les lignes en pointillées délimitent les principaux biotopes. Schéma d'après Hines et al. (2011).

Variations des défenses chimiques entre et au sein des cercles mimétiques

Il existe des différences importantes dans les concentrations en glucosides cyanogènes des Heliconiini appartenant à différents cercles mimétiques suggérant des pressions de sélection ou une origine évolutive différente (Arias, Meichanetzoglou, et al., 2016). Néanmoins, les espèces co-mimes d'un même cercle mimétique n'ont pas le même niveau de défenses moyen, par exemple dans le cercle mimétique à motif « bleu », les individus de l'espèce *H. sara* contiennent généralement plus de glucosides cyanogènes que leur co-mimes de l'espèce *H. doris* (Arias, Meichanetzoglou, et al., 2016). Les variations de défenses entre espèces de

papillons, mais aussi au sein d'un cercle mimétique sont susceptibles d'influer la perception et l'apprentissage des prédateurs. Il existe peu de littérature sur le comportement des prédateurs en lien direct avec les défenses chimiques des Heliconiini. Chouteau *et al.* (2019) ont étudié le nombre d'essais nécessaires à des poussins (*Gallus gallus domesticus*) pour apprendre à éviter la nourriture mixée avec une espèce donnée d'Heliconiini. Ces données comportementales montrent que les oiseaux apprennent à rejeter les Heliconiini très vite et qu'il n'existe *a priori* pas de corrélation entre la vitesse d'apprentissage et la concentration totale en glucosides cyanogènes mesurées par Arias *et al.* (2016). Les différentes espèces de papillons testées par Chouteau *et al.* (2019), montrent que le seuil de concentration totale en glucosides cyanogènes provoquant le rejet des prédateurs est faible. Si les prédateurs naturels des Heliconiini se comportent comme les poussins, la pression de prédation ne promouvrait pas forcément l'évolution d'une augmentation des défenses chimiques. Les fortes concentrations en glucosides cyanogènes observées chez de nombreuses espèces d'*Heliconius*, pourraient ainsi être plus fortement liées à leur histoire évolutive et à leur adaptation à différentes plantes hôtes. Afin de tester formellement les forces évolutives impliquées dans les variations de composés chimiques chez les Heliconiini, une approche comparative basée sur la phylogénie est donc nécessaire (Chapitre II).

Des interactions mimétiques entre espèces présentant différents types de défenses

Les individus d'espèces différentes arborent un patron de colorations au sein d'un cercle mimétique mais pas forcément les mêmes composés chimiques de défenses, pouvant déclencher des réponses des prédateurs différentes. Ainsi les vice-rois (*Limenitis archippus* : Nymphalidae) séquestrent des glucosides phénoliques et leurs dérivés (Prudic *et al.*, 2007) alors que leurs co-mimes les papillons reines (*Danaus gilippus* : Nymphalidae) engrangent des glycosides cardiotoniques à partir de leur plante hôte (Ritland, 1991). Le péricopine *Chetone phyleis* (Artiidae : pericopinae) (Fig. 13) mimétique d'Heliconiini du cercle « Dennis ray » est chimiquement défendu grâce à des alcaloïdes pyrrolizidiniques (Hartmann, 1999). Les Ithomiini (Danainae : Nymphalidae), séquestrent également des alcaloïdes pyrrolizidiniques (Trigo, Brown, Henriques, *et al.*, 1996) et sont des co-mimes d'*Heliconius*. Cette tribu est une importante radiation d'espèces de papillons, et regroupe 396 espèces (Chazot, Willmott, *et al.*, 2019). Les Ithomiini dominent les communautés de papillons en termes de nombre d'espèce et leur modèle de coloration sont perçus comme des modèles de convergence

évolutive pour les autres espèces dont les Heliconiini. Un exemple majeur du mimétisme Müllerien et de convergence évolutive pour la coloration, sont les interactions entre le genre *Melinea* (Ithomiini) et l'espèce *H. numata* (Fig. 16) (Brown & Benson, 1974; Beccaloni, 1997). Ces paires de mimes remarquables attestent que des espèces de familles éloignées peuvent converger vers une coloration commune bien qu'exprimant des défenses chimiques de nature différente. Les cercles mimétiques impliquant des espèces protégées par différentes classes de métabolites secondaires, seraient mieux défendues car la diversité de leurs goûts et leurs effets déclenchés chez les prédateurs, stimule l'apprentissage (Skelhorn & Rowe, 2005).

Au sein d'un cercle mimétique, les individus non défendus sont qualifiés de mimes Batésien et tandis que ceux qui sont faiblement défendus par rapport aux autres sont appelé mimes quasi-Batésien (Brower *et al.*, 1967; Bates, 1981; Ritland, 1994). L'impact de ces individus faiblement défendus sur l'apprentissage des prédateurs est assez discuté et peut influencer l'évolution des patrons de coloration. Si l'abondance des mimes Batésien est trop importante, ils sont qualifiés de « parasites » car ils peuvent affaiblir la protection associée au patron de coloration partagé avec des individus mieux défendus (Speed, 1993; Speed *et al.*, 2000; Rowland *et al.*, 2010). D'autres études théoriques suggèrent un effet inverse, proposant que la présence de mimes quasi-Batésien peut toujours être une interaction mutualiste dans la mesure où l'ensemble des individus du cercle mimétique continue à partager les coûts de mortalité durant l'apprentissage des prédateurs (Lindström *et al.*, 2006; Ihalainen *et al.*, 2007; Rowland *et al.*, 2007). Dans la nature, il n'y a pas de catégorie stricte entre Batésien, quasi-Batésien ou Müllerien mais un continuum de variations des niveaux de défenses chimiques. Les individus d'une même espèce, ont une certaine variabilité de défenses chimiques. La teneur en défense chimique du papillon vice-roi (*Limenitis archippus*), varie ainsi selon l'abondance de l'espèce co-mime, la reine (*Danaus gilippus*) (Prudic *et al.*, 2019). Plus l'abondance des papillons reine est faible, plus les défenses chimiques des papillons vice-roi augmentent, suggérant que l'évolution vers l'aposématisme dans cette espèce pourrait partir d'un état ancestral de mime Batésien (Prudic *et al.*, 2019). L'abondance d'un cercle mimétique pourrait ainsi jouer sur l'évolution des défenses chimiques. En effet, pour un patron de coloration très abondant, les pressions de sélection pour l'acquisition de défenses chimiques pourraient être relâchées. Au contraire ces pressions seraient fortes au sein des cercles mimétiques peu abondant avec des patrons de coloration plus rares, où le risque de prédation

par individu augmente. Arias *et al.* (2016) ont mesuré des concentrations totales de glucosides cyanogènes plus fortes chez *H. sara* et *H. doris* du cercle mimétique « bleu » peu abondant, par rapport à *H. erato* et *H. melpomene* du cercle mimétique « postman » très abondant, mais cette observation n'était pas statistiquement significative. L'évolution des défenses chimiques dépend donc fortement du type de signal et de sa mémorisation par les prédateurs, comme suggéré par la théorie des signaux honnêtes, mais aussi des interactions mimétiques avec d'autres espèces plus ou moins défendues.

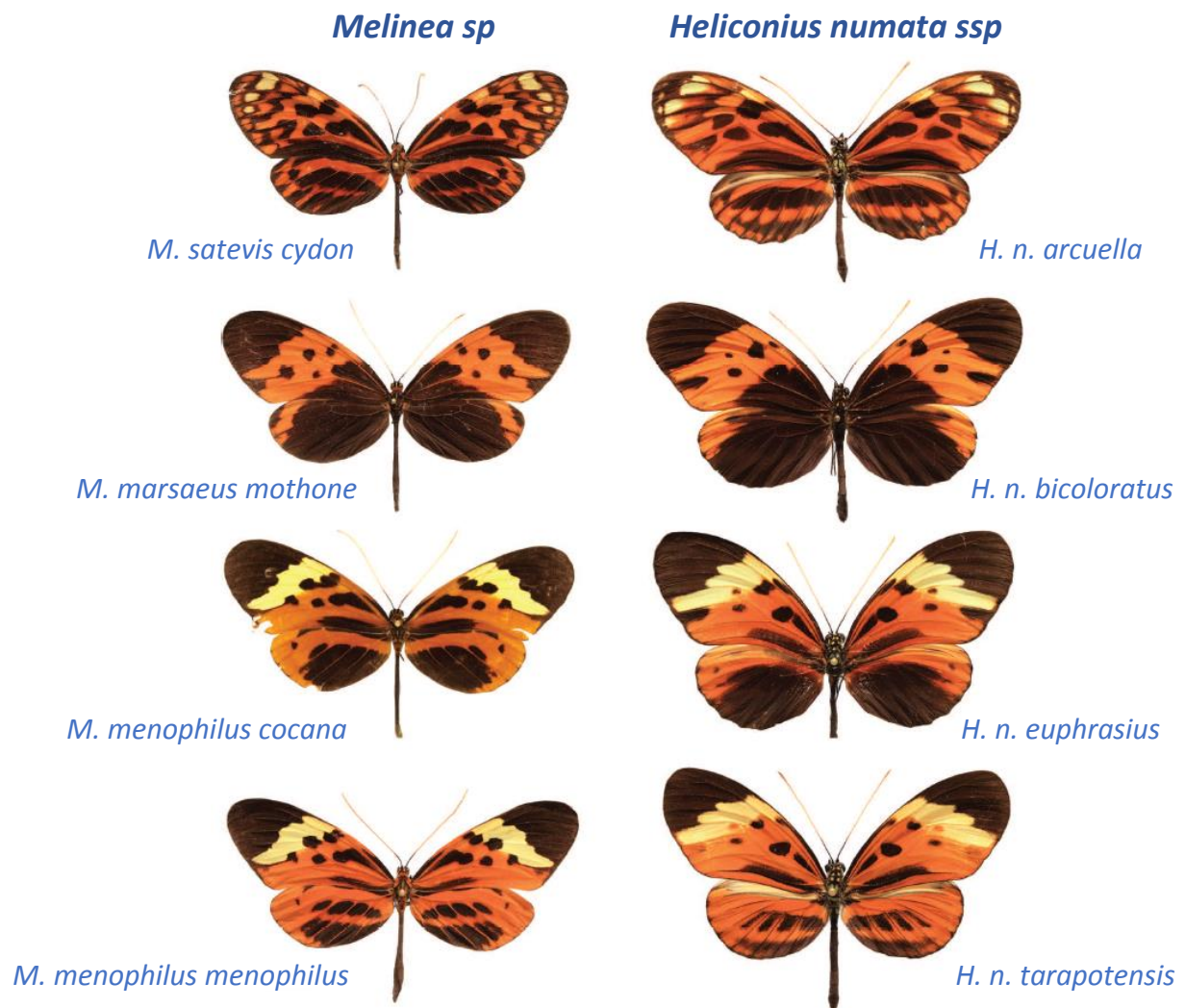




Figure 16 : Mimétisme Müllérien entre le genre *Melinea* (Ithomiini, colonne de gauche) et l'espèce localement polymorphique *H. numata* (colonne de droite). D'après Jiggins (2016).

L'objectif général de ce travail de thèse est donc d'étudier l'évolution des défenses chimiques dans un clade de papillons mimétiques bien étudié afin d'identifier les forces évolutives impliquées.

PROBLEMATIQUE

Chapitre I : Comment le mimétisme influence-t-il l'évolution des signaux aposématifs et de leurs défenses chimiques associées ?

L'évolution de l'aposématisme est assez débattue et étudiée aussi bien empiriquement que théoriquement. En particulier le lien entre la force du signal coloré et des défenses chimiques est controversé. L'origine métabolique commune ou indépendante de la pigmentation et des molécules de défense semble un facteur important dans la compréhension de l'évolution de l'aposématisme. L'intensité des patrons de coloration peut évoluer indépendamment de la quantité des défenses chimiques ou y être corrélée positivement et ainsi constituer un « signal honnête » reflétant le niveau de défense chimiques des individus. Je m'intéresse ici à l'influence du mimétisme dans l'évolution de l'aposématisme, en considérant que l'origine des défenses chimiques pourrait être liée à la spécialisation aux plantes hôtes, comme cela pourrait être le cas chez les Heliconiini. Cette spécialisation sur un spectre réduit de plantes hôtes pourrait avoir un très fort effet sur l'abondance des populations et donc des signaux mimétiques (Fig. 17). Afin de comprendre les boucles de rétroaction entre mimétisme, aposématisme et spécialisation sur les plantes hôtes, j'ai construit un modèle théorique, permettant d'explorer deux questions principales :

-  En considérant ou non des interactions mimétiques, comment évolue le patron de coloration d'une population de papillon ?
-  Comment le degré de spécialisation à la plante hôte influence-t-il l'évolution des défenses chimiques d'une population de papillon mimétique ?

Chapitre II : Evolution des défenses chimiques basée sur l'analyse d'Heliconiini sauvages

Chez les Heliconiini, les individus d'une même espèce peuvent appartenir à des cercles mimétiques différents (Fig. 17), permettant de départager l'effet d'une origine phylogénétique commune d'une part, de la sélection naturelle liée au mimétisme d'autre part, sur l'évolution des composés chimiques. J'ai testé plusieurs hypothèses de sélection pouvant être impliquées dans l'évolution des défenses chimiques, comme le degré de spécialisation et l'appartenance à différents cercles mimétiques. Les données existantes sur les glucosides cyanogènes des Heliconiini sont basées sur des animaux d'élevage ou se limite à la

concentration totale de glucosides cyanogènes. Des analyses chimiques sur des papillons sauvages permettent de capturer la variation des défenses chimiques réelles au sein des cercles mimétiques et d'explorer des effets géographiques locaux liés à la présence d'espèces co-mimes différentes ou de variations dans la disponibilité en plante hôte.

- 🦋 En déterminant les concentrations en différents glucosides cyanogènes d'un grand échantillon de papillons sauvage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), j'ai documenté les variations intra et interspécifiques des profils chimiques au sein des communautés mimétiques naturelles.
- 🦋 Grâce à la phylogénie bien étudiée des Heliconiini (Kozak *et al.*, 2015), j'ai ensuite pu questionner l'influence des relations phylogénétiques et de facteurs écologiques (interaction mimétique, spécialisation à la plante hôte et micro-habitat) sur l'évolution des défenses chimiques.



Chapitre III : Variations environnementales et génétiques impliquées dans les profils chimiques observés chez les Heliconiini

Les chenilles d'Heliconiini exercent une pression de prédation sur les passiflores, détournent et séquestrent les défenses chimiques de la plante (Fig. 17). En fonction des capacités de séquestration des individus, l'interaction avec la plante hôte est un paramètre fondamental contrôlant la diversité des glucosides cyanogènes des papillons Heliconiini au stade chenille. Le profil chimique pourrait ainsi être fortement lié au type de plante hôte consommée par la chenille, et pourrait même changer au cours de la vie de l'individu, due à l'accumulation des glucosides cyanogènes séquestrés ou à une synthèse promue par la sélection naturelle.

- 🦋 En réalisant des élevages de papillons de cinq espèces d'Heliconiini, j'ai étudié les changements de profils chimiques au cours des différents stades du cycle de vie.
- 🦋 En me focalisant sur l'espèce *H. numata* qui semble capable de réaliser à la fois de la séquestration à partir de la plante hôte et de la synthèse de glucosides cyanogènes, j'ai testé l'influence de l'espèce de plante hôte consommée par les chenilles sur le profil chimique des papillons. Ainsi, j'ai élevé des individus issus des mêmes lignées maternelles sur différentes espèces de passiflores et distinguer les effets maternels des effets liés à la plante hôte.

Chapitre IV : Apport de la chimie des produits naturels dans la découverte de la diversité et de la localisation des glucosides cyanogènes des Heliconiini

Les Heliconiini synthétisent de façon endogène et séquestrent des glucosides cyanogènes à partir des passiflores consommées au stade larvaire (Fig. 17). Peu de glucosides cyanogènes ont été répertoriés chez ces papillons alors que les passiflores en produisent une petite trentaine. Ainsi, la diversité de ces composés est potentiellement sous-estimée chez les Heliconiini. La localisation des glucosides cyanogènes en fonction de leur origine métabolique, synthétisée ou séquestrée, pourrait permettre de préciser leur voie d'acquisition. Dans ce chapitre exploratoire sont résumées les techniques d'analyse chimique appliquées pour la première fois sur les profils chimiques des Heliconiini et leurs apports respectifs.

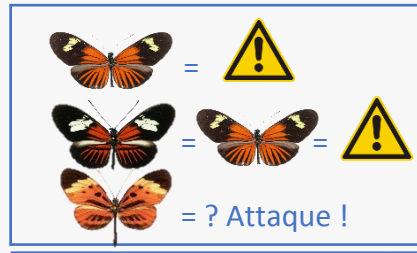
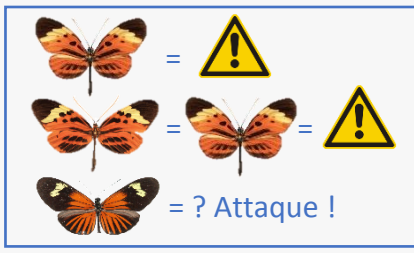
-  A l'aide d'une approche de réseau moléculaire, j'ai cherché à estimer la diversité des glucosides cyanogènes chez les Heliconiini et à découvrir de nouveaux composés de cette même famille.
-  En utilisant la technique d'imagerie en spectrométrie de masse appliquée aux Heliconiini, j'ai tenté de déterminer la localisation des différents glucosides cyanogènes au sein du corps des papillons.

Chapitre V : Quelles sont les défenses chimiques des papillons mimétiques des Heliconiini ? Diversité des alcaloïdes pyrrolizidiniques des Ithomiini

Au sein d'un cercles mimétiques des individus d'espèces différentes arborent un même patron de colorations mais pas forcément les mêmes composés chimiques de défenses, pouvant déclencher des réponses des prédateurs différentes. La diversité des molécules de défenses associées à un patron de coloration donné renforce l'apprentissage des prédateurs (Halpin *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2019). Les Ithomiini sont les papillons aposématiqués et mimétiques d'Heliconiini. Contrairement aux Heliconiini, ces papillons présentes des alcaloïdes pyrrolizidiniques très diversifiés et acquis différemment au cours du développement. L'objectif des recherches menées dans ce chapitre est de mieux comprendre comment ces défenses chimiques sont distribuées au sein des Ithomiini (Fig. 17).

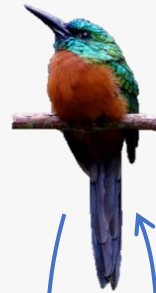
- 🦋 Quels alcaloïdes pyrrolizidiniques et dérivés peuvent être séquestrés par les Ithomiini ?
- 🦋 Quelles sont les variations qualitatives des alcaloïdes pyrrolizidiniques entre les espèces d'Ithomiini ?
- 🦋 Est-il possible de mettre en évidence de nouvelles molécules séquestrées par les Ithomiini ?

CHAP. I



Micro-habitat 1

Micro-habitat 2



Prédation -

Impact CGs -

Prédation -

Impact CGs -

CHAP. V



Cercle mimétique



+

Sous espèces

CHAP. II



Cercle mimétique



+

CHAP. IV



CHAP. III

Synthèse CGs

Séquestration CGs +

Séquestration CGs +



Herbivorie -

Choix plante hôte

Compétition entre papillons pour la plante hôte

Variations de micro habitats et plantes hôtes

Figure 17, ci-contre : Schéma récapitulatif des interactions entre les pressions de sélection s'exerçant sur les défenses chimiques des Heliconiini, ici les glucosides cyanogènes (CGs). Les prédateurs diffèrent suivant les localités (micro-habitats 1 et 2) et leurs apprentissages conditionnent le patron de coloration localement sélectionné. Un prédateur naïf associe le patron de coloration d'un papillon aux effets de ses défenses chimiques. Le prédateur évite ensuite d'attaquer d'autres papillons arborant le même patron de coloration. En revanche le prédateur attaque les papillons ayant un patron de coloration inconnu. Les cercles mimétiques sont plus ou moins abondants et les profils chimiques variables intra et interspécifiquement. Au sein d'un cercle mimétique, des espèces de différentes tribus, Heliconiini et Ithomiini peuvent partager un même patron de coloration. La compétition entre Heliconiini et l'adaptation aux plantes hôtes influencent le profil chimique des glucosides cyanogènes séquestrés.

$$\Delta Nm = \frac{-pm(1 + dm) * Nm}{1 + (l * dm * Nm)} + g * Nm \left[1 - \frac{(Nwt + Nm)}{K * \left(\frac{1}{1+u} \right)} \right]$$

Chapitre I

*Evolution of conspicuousness in
defended species involved in
Müllerian mimicry*

$$\Delta Nwt = \frac{-pwt(1+dwt)*Nwt}{1+(l*dwt*Nwt)} + g * Nwt \left[1 - \frac{(Nwt+Nm)}{K * \left(\frac{1}{1+u} \right)} \right]$$

Article type: *Research article*

Evolution of conspicuousness in defended species involved in Müllerian mimicry

OMBELINE SCULFORT^{1,2}, THOMAS G. AUBIER^{3,4}, LUDOVIC MAISONNEUVE¹, MARIANNE ELIAS¹,
VIOLAINE LLAURENS¹

¹ Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne-Université, EPHE, Université des Antilles, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France

² Molécules de Communication et Adaptations des Micro-organismes (MCAM), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, 63 rue Buffon, 75005 Paris, France

³ Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, Université de Montpellier, Université Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France

⁴ Department of Evolutionary Biology and Environmental Studies, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland

Corresponding author: Ombeline Sculfort, ombelinesculfort@hotmail.fr

Keywords: aposematism, honest signal, mimetic community, species abundance, theory, toxins, unpalatability

Abstract

The evolution of a surprising diversity of conspicuous colourations observed in chemically-defended prey species is a puzzling question. Unpalatable compound acquisition and predator avoidance behaviour have been shown to affect the evolutionary processes underlying such warning signal diversity. Predators learn to associate warning colour pattern with unpalatability, and this results in a decrease in predation risk for individuals displaying a locally abundant warning pattern. This positive number-dependent selection generated by predator causes evolutionary convergence across defended prey species toward a common warning colour pattern (Müllerian mimicry). Müllerian mimicry has a strong effect on the local diversity of warning patterns in tight connection with the local abundance of mimetic species. Moreover, because chemical defences often stem from diet, the levels of defences frequently depend on resource specialisation, therefore impacting species abundance and the evolution of aposematic colour patterns.

To investigate the evolution of the aposematism, we built a single-species model where conspicuousness and unpalatability can evolve, assuming that the warning signals are mimetic within the local species community or not. We assumed that (1) predation risk depends on both the number of individuals sharing a given warning signal within the studied species and the local abundance of co-mimetic species and (2) the level of unpalatability depends on resource specialisation, such that specialists suffer from higher competition for resource than generalists.

We introduced mutations changing conspicuousness, therefore affecting both detectability and memorability of the pattern, and compare the evolutionary fate of mutants either recognized as similar or as different from the ancestral signal. We specifically highlighted that mildly conspicuous colour patterns can persist in defended species, in particular when favoured by Müllerian mimicry, explaining for instance the evolution of partially transparent colour patterns in some chemically-defended butterflies. We then explore the evolution of unpalatability in conspicuous population and show that the evolution of decreased levels of unpalatability can be promoted when unpalatability stems from host-plant specialisation limiting abundance. Altogether, our theoretical approach highlights complex interplays between resource specialisation, mimicry and predator behaviour on the evolution of aposematic signals and associated defences.

INTRODUCTION

The evolution of warning colour patterns in chemically-defended species (*i. e.* aposematism) has received considerable attention (Ruxton, 2019). Aposematism evolution relies on the interplay of three main factors namely; levels of defence, warning colour patterns, and abundance. A major evolutionary force is the pressure exerted by predators. Predators can learn to associate a warning colour pattern with unpalatability (Alcock, 1970a, 1970b; Goodale & Sneddon, 1977). By remembering their negative experience, predators subsequently avoid any individual displaying the learnt warning colour pattern. Predator's learning generates number-dependent selection favouring the most abundant warning pattern (Chouteau *et al.*, 2016). Although higher conspicuous entails higher detectability, it has been shown that when detected, conspicuous colour patterns are less attacked than cryptic colour patterns (often displayed by profitable prey) because of innate aversion of predators (Sillén-Tullberg, 1985; Lindström, Alatalo, *et al.*, 2001). Conspicuous colour patterns might also trigger more rapid avoidance-learning due to higher memorability (Roper & Redston, 1987; Ham *et al.*, 2006; Siddall & Marples, 2008).

The origins of unpalatability in defended prey are still largely unknown in many defended species, but in aposematic butterflies, one of the best-known examples of aposematism, unpalatable compounds are frequently synthesized and/or sequestered from their diet (Edgar, 1983; Engler & Gilbert, 2007; Zagrobelny *et al.*, 2014; de Castro *et al.*, 2017). Sequestering unpalatable compounds leads to variations in the level of defences both within species relying on the same diet, and among species relying on drastically different resources (Engler & Gilbert, 2007; Hay-Roe & Nation, 2007). Specialisation on a given source containing toxins might enhance unpalatable compound sequestering capacity. For instance, specialist butterfly species *Heliconius sara* and *H. sapho* that sequester toxins from their host-plant *Passiflora auriculata* and *P. pittieri*, respectively, were shown to contain drastically smaller amounts of toxins when reared on other *Passiflora* host-plants, highlighting their increased sequestration capacities linked to host-plant specialisation (Engler & Gilbert, 2007). Nevertheless, compared to generalist species, specialist species have a reduced resource range of host-plant, which may limit their abundance. By influencing jointly unpalatability and abundance, specialisation on unpalatable resources may play a complex role in the evolution of warning colour patterns.

Unpalatability level can impact the evolution of warning colour patterns and *vice versa*. In particular, theoretical models showed that such coevolution should lead to negative or positive correlations between levels of defence and warning colour pattern conspicuousness. Some models predict a positive correlation between conspicuousness and unpalatability (Speed & Ruxton, 2005a; Broom *et al.*, 2006, 2008) because warning colour patterns can act as “honest” signals of unpalatability, whereby only well-defended individuals display conspicuous colour pattern associated with elevated attack risk or other fitness costs. Other models predict instead a negative correlation, when defences induce immediate predator deterrence even in the absence of costly conspicuousness (Leimar *et al.*, 1986; Speed & Ruxton, 2005a). Depending on the availability of unpalatable compound resources and level of competition, positive and negative correlations between signal conspicuousness and unpalatability can also be expected (Speed & Ruxton, 2007; Blount *et al.*, 2009), so that the directions of such correlation within and across species might differ (Speed, Ruxton, *et al.*, 2010). In empirical studies, positive correlations between conspicuousness and chemical defences have been detected across populations of the Asian ladybird *Harmonia axyridis* (Bezzerrides *et al.*, 2007; María Arenas *et al.*, 2015), the poison frog *Dendrobates pumilio* (Maan & Cummings, 2012) and the paper wasp *Polistes dominula* (Vidal-Cordero *et al.*, 2012) as well as across species of Dendrobatidae frogs (Summers & Clough, 2001; Santos & Cannatella, 2011), ladybirds (María Arenas *et al.*, 2015) and Opisthobranchia (marine gastropods) (Cortesi & Cheney, 2010). However empirical investigations across species have also revealed negative correlation between conspicuousness and unpalatability, across poison frog *Epipedobates* species (Darst & Cummings, 2006), Nudibranch (marine gastropods) species (Winters *et al.*, 2018) and burnet moth (Briolat *et al.*, 2019).

In many cases, warning patterns are shared across defended species living in sympatry (Mallet & Gilbert, 1995): because of the positive number-dependent selection acting on colour patterns, evolutionary convergence of warning colour pattern among species within the same locality is favoured, a phenomenon described as Müllerian mimicry (Müller, 1879b; Guilford, 1988; Sherratt, 2008; Joron, 2009). Mimetic interactions with other defended species can influence the evolution of warning patterns and unpalatability. The evolution of mimetic colouration is predicted to be largely promoted in mildly or undefended species living in sympatry with strongly defended ‘model’ species (i.e. Batesian mimicry, Bates 1862). The

evolution of unpalatability in cryptic species is generally expected to precede the evolution of mimetic colouration (Turner, 1984) but recent results suggest that defence levels could evolve in mimetic species. Defence levels in *Limenitis archippus* 'viceroys' butterfly indeed tend to increase when the co-mimetic species *Danaus gilippus* is less abundant (Prudic *et al.*, 2019). In this case, the observed variations of unpalatability are independent from variations in host-plant unpalatable compounds, suggesting direct selection on unpalatability, linked to the decreased abundance of the defended co-mimetic species. Conspicuousness may also evolve in response to variations in unpalatability displayed by co-mimics: Franks *et al.*'s (2009) model shows that the evolution of aposematic signals can be promoted in a defended species, if the abundance of a palatable, parasitic mimetic species (*i. e.* Batesian mimics) is high. Different mimetic patterns may vary in their conspicuousness, as for instance in the neotropical butterfly tribe Ithomiini, whereby some species exhibit brightly coloured wing patterns while others harbour transparent wings patterns (Beccaloni, 1997; Arias *et al.*, 2019). The evolution of new colour patterns with a different level of conspicuousness is not straightforward, as individuals with new colour patterns may suffer from reduced fitness. Fitness reduction can be incurred by potential metabolic cost of pigmentation (Hill, 1996; McGraw *et al.*, 2005) and possible increased attack rates stemming from higher detectability for more conspicuous patterns or from higher resemblance to profitable prey for more cryptic patterns (Arias. *et.* 2019). In addition, the initially low abundance of new patterns limits number-dependent advantages linked to predation avoidance learning (Greenwood *et al.*, 1989; Lindstrom *et al.*, 2001). However, when the local community contains multiple mimetic species, including species with different colour patterns as often observed in aposematic butterfly communities (*e. g.*, Willmott *et al.* 2017), the emergence of new patterns within a species can be facilitated if it resembles a warning pattern already displayed by other defended species. In the seminal paper of Charlesworth and Charlesworth (1975), the evolution of conspicuous colouration in undefended species is only enabled by resemblance to a defended species. Therefore, mimetic interactions between species need to be taken into account together with the level of unpalatability when investigating the evolution of conspicuousness in defended species. Here, we used a theoretical approach to investigate the evolution of conspicuousness and unpalatability as heritable traits, in a population of a defended species involved in Müllerian mimicry. In particular, we investigated whether the presence of a diverse community of

mimetic prey species can facilitate the evolution of new colour pattern, even in the absence of direct deterrence provided by either more conspicuous colour pattern (*i. e.* innate aversion against conspicuousness) or unpalatability. Our model involved one species composed by wild-type and mutant individuals. We considered that mutant warning colour patterns that differ in conspicuousness from the wild-type colour pattern can either (i) be recognized as the same signal as the ancestral pattern or (ii) be considered as a new warning signal, distinguished by predators from the ancestral pattern. In the latter case, ancestral and emergent patterns could then match local mimicry rings (community of individuals living in sympatry and sharing the same warning pattern) of various abundances, and therefore benefit from enhanced protection. We assumed that conspicuousness enhances detectability by predators and signal memorability, thus influences predator's learning process in associating a given warning colour pattern with unpalatability. Finally, because unpalatability is linked to resource specialisation in some prey species (*e. g.*, butterflies), we assumed that an increase in unpalatability stems from specialisation towards a limited type of resources, thereby restricting population size. This hypothesis contrasts with classical assumption assuming a physiological cost of unpalatability that might limit investment in costly pigments. We also assumed no direct effect of enhanced unpalatability on predator deterrence, so that the effect of unpalatability only impacts individual protection because of predator learning. Our results show how mimetic interactions and resource specialisation may contribute to the evolution of the high diversity of aposematic colourations and associated unpalatabilities.

MATERIAL AND METHODS

General model

Using ordinary differential equations, we model a single population of chemically-defended species, initially composed of a number of wild-type individuals N_{wt} . Wild-type individuals have a fixed unpalatability u_{wt} and display a warning colour pattern with a level of conspicuousness c_{wt} and a basal predation rate p_{wt} , which depends on the abundance of co-mimetic species (Tab. 1). We introduce a small number of mutant individuals N_m harbouring either the same or a different warning colour pattern as the wild-types. Mutant individuals may have different conspicuousness c_m , basal predation rate p_m or unpalatability u_m as compared to wild-type (Tab. 1). We then track the evolution of the number of wild-types and mutants through time.

Parameter	Range explored	Description
$N_{wt}(t), N_m(t)$	-	Number of individuals sharing wild-type or mutant warning colour pattern at time t
u_{wt}, u_m	[0;1]	Unpalatability associated with wild-type or mutant warning colour pattern
c_{wt}, c_m	[0;1]	Conspicuousness of wild-type or mutant warning colour pattern
p_{wt}, p_m	[0;1]	Basal predation rate exerted on wild-type or mutant warning colour pattern, depending on the abundance of their respective mimetic communities.
α	[0;1]	Effect of unpalatability on resource specialisation
β	[0;1]	Effect of conspicuousness on detectability
K	1000	Global carrying capacity
r	2	Growth rate

Table 1: Summary of parameters used in the model, with their biological meaning and explored range values.

The evolution of these numbers of wild-types and mutants through time follows the general equations [1] and [2], respectively:

$$\frac{dN_{wt}(t)}{dt} = \frac{dR_{wt}(t)}{dt} + \frac{dP_{wt}(t)}{dt} \quad [1],$$

$$\text{and } \frac{dN_m(t)}{dt} = \frac{dR_m(t)}{dt} + \frac{dP_m(t)}{dt} \quad [2],$$

including a reproduction term given by $\frac{dR_{wt}(t)}{dt}$; $\frac{dR_m(t)}{dt}$ and a predation term given by $\frac{dP_{wt}(t)}{dt}$; $\frac{dP_m(t)}{dt}$ described below.

Reproduction and resource specialisation

Wild-types and mutants belong to the same species. As such, they have equal growth rate (r), compete for same resources and have the same carrying capacity (K) (Tab. 1).

We consider no physiological cost associated with unpalatability u , but we assume that increased unpalatability (u_{wt} and u_m for wild-type and mutant respectively) stems from higher resource specialisation, so that unpalatability affects the range of available resources and thus modulates the carrying capacity (see equation [3] and [4]). We implement a parameter α to specifically investigate the effect of resource dependence on unpalatability acquisition in the species: when $\alpha = 0$, level of unpalatability is independent from resource and unpalatability has no effect on carrying capacity; the higher α , the stronger the dependence between unpalatability and resource specialisation and therefore the impact on carrying capacity. Changes in numbers of wild-type and mutant individuals due to reproduction (R_{wt} and R_m respectively) are thus described as follows:

$$\frac{dR_{wt}(t)}{dt} = r * N_{wt}(t) \left[1 - \frac{N_{wt}(t) + N_m(t)}{K \left(\frac{1}{1 + u_{wt} * \alpha} \right)} \right] \quad [3],$$

$$\frac{dR_m(t)}{dt} = r * N_m(t) \left[1 - \frac{N_{wt}(t) + N_m(t)}{K \left(\frac{1}{1 + u_m * \alpha} \right)} \right] \quad [4].$$

Predation and mimicry

We assume that the predation risk decreases as the number of individuals sharing the same warning colour pattern in the population increases, as classically assumed in models of Müllerian mimicry (Joron & Iwasa, 2005). In case of mimicry with other species, the basal level of predation applied to the wild-type and the mutant (p_{wt} and p_m respectively) depend on the

abundances of their respective co-mimetic species. Predation risk faced by wild-type and mutant individuals then depends on their warning colour pattern conspicuousness c , the signal abundance and their unpalatability u .

Conspicuousness has two opposite effects on predator's behaviour, detectability and memorability. Detectability is described as the direct effect of conspicuousness on predation rate, assuming more conspicuous warning colour patterns are more likely to be detected and attacked. Cryptic individuals ($c = 0$) have the lowest level of detectability by predators (but even those individuals are detectable to some extent). Memorability is then described as an indirect effect on the number-dependent advantage associated with mimetic signals: we assume that more conspicuous signals might be easier for predators to remember and therefore enhance protection brought by mimicry, as in previous models of (Sherratt, 2002; Broom *et al.*, 2006). We introduce a parameter β that modulates the effects of conspicuousness on detectability compared to memorability. Specifically, for a given memorability effect, low values of β incur a low detectability, while high values incur a high detectability. By investigating the effect of parameter β , we investigate the relative effect of conspicuousness on the balance between detectability and memorability.

First, we investigate the evolution of conspicuousness assuming that variations in conspicuousness are generalized by predators, so that wild-type and mutant individuals share the same warning signal ('single signal hypothesis' hereafter), (equations [5] and [6]). We thus assume that warning colour patterns exhibited by wild-type or mutant individuals belong to the same mimicry ring (and therefore face the same basal predation rate, $p_{wt} = p_m$) and benefit from the same number-dependent advantage, but that they can differ in their conspicuousness level. Under the single signal hypothesis, changes in numbers of wild-type and mutant individuals due to predation (P_{wt} and P_m respectively) are thus described as follows:

$$\frac{dP_{wt}(t)}{dt} = \frac{-p_{wt}(1+\beta*c_{wt})N_{wt}(t)}{1+(u_{wt}*c_{wt}*N_{wt}(t)+u_m*c_m*N_m(t))} \quad [5],$$

$$\frac{dP_m(t)}{dt} = \frac{-p_m(1+\beta*c_m)N_m(t)}{1+(u_{wt}*c_{wt}*N_{wt}(t)+u_m*c_m*N_m(t))} \quad [6].$$

Alternatively, variations in conspicuousness can result in warning signal recognized as different by predators and thus do not share the cost of predator's learning process ('two-signal hypothesis' hereafter) (equations [7] and [8]). Other mimetic species in the community are not explicitly modelled, but we assume that differences of abundances between mimicry rings result in different basal predation rates p_{wt} and p_m . Under the two-signals hypothesis, changes in numbers of wild-type and mutant individuals due to predation (P_{wt} and P_m respectively) are thus described as follows:

$$\frac{dP_{wt}(t)}{dt} = \frac{-p_{wt}(1+\beta*c_{wt})N_{wt}(t)}{1+(u_{wt}*c_{wt}*N_{wt}(t))} \quad [7],$$

$$\frac{dP_m(t)}{dt} = \frac{-p_m(1+\beta*c_m)N_m(t)}{1+(u_m*c_m*N_m(t))} \quad [8].$$

Testing the evolution of conspicuousness and unpalatability using simulations

We investigate the evolution of conspicuousness and unpalatability by running numerical simulations in Python ("Python Release Python 3.6.5," 2018). We do not investigate co-evolution pattern between conspicuousness and unpalatability, as always one out the two is fixed and the other varies. We first model a population of wild-type individuals and let them reach equilibrium, (*i. e.*, a stable population size). Then, we introduce mutant individuals in proportion of 0.01% of the wild-type. We assess whether the mutant colour pattern invades the population or not, after 100,000 time steps. We specifically focus on four main questions, investigating the evolution of conspicuousness and unpalatability, implementing the same default values for global carrying capacity $K = 1000$ and growth rate $r = 2$ and exploring a range of values for the other parameters, depending on the addressed question (Tab. 1). Notably, for all four questions investigated, we systematically test the effect of our hypotheses regarding the link between unpalatability and resource specialisation (α) and the detectability/memorability balance (β) on the evolutionary outcomes.

1- Evolution of conspicuousness within the same warning signal (single-signal)

Assuming the same fixed level of unpalatability in wild-type and mutant ($u_{wt} = u_m$), we study the evolution of the level of conspicuousness of a given warning colour pattern, *i.e.* under the single signal hypothesis, and assuming the same basal predation rate ($p_{wt} = p_m = 0.5$). Wild-type and mutant individuals thus have the same warning signal but differ in their conspicuousness ($c_{wt} \neq c_m$).

2- Evolution of conspicuousness among different mimetic warning signals (two-signal)

Assuming again a fixed level of unpalatability ($u_{wt} = u_m$), we explore scenarios where variations in conspicuousness evolution results in a distinct warning signal in mutants (*i. e.* two-signal hypothesis). We consider a mutant whose warning colour pattern is recognized as different from that exhibited by the wild-type, where initially rare mutant colour patterns do not benefit from protection gained by resemblance with numerous wild-type individuals.

We consider that wild-type and mutant belong to two distinct mimicry rings, that can have either similar (*i.e.* $p_{wt} = p_m = 0.5$), or uneven abundances, with more abundant mimicry ring resembling wild-type individuals ($p_{wt} = 0.5$ and $p_m = 0.75$) or mutant individuals ($p_{wt} = 0.5$ and $p_m = 0.25$).

3- Evolution of unpalatability within the same warning signal

Then we investigate the evolution of unpalatability assuming that wild-type and mutant individuals shared the same warning colour pattern (single signal hypothesis), therefore following predation equation [5] and [6] and assuming $p_{wt} = p_m$ and $c_{wt} = c_m$.

In these simulations, we thus assume that wild-type and mutant individuals can differ in their level of unpalatability ($u_{wt} \neq u_m$).

4- Evolution of unpalatability among different mimetic warning signal

Finally, we explore the evolution of unpalatability ($u_{wt} \neq u_m$) assuming that wild-type and mutant individuals display different warning colour patterns (two signals hypothesis), but with similar basal predation rate and level of conspicuousness $p_{wt} = p_m$ and $c_{wt} = c_m$.

RESULTS

1- Decrease in conspicuousness is favoured in populations displaying a single warning signal

We explore the evolution of conspicuousness in a population of individuals sharing the same warning colour pattern (single signal hypothesis). Overall, less conspicuous colour patterns are advantaged in unpalatable populations (Fig. 18A). Predators recognize wild-type and mutant patterns as the same warning signal, so that mutants and wild-types both benefit from the same number-dependent protection, brought by the strength in number. However, less conspicuous individuals also benefit from reduced detection by predators and therefore benefit from a low predation rate. Because the signal is generalized by predators whatever the level of conspicuousness, conspicuousness of warning signal tends to decrease. By modulating the effect of conspicuousness on detectability/memorability (β), we confirmed that the selective advantage of decreased conspicuousness is due to reduced detection by predators, limiting predation (Sup. 1).

For high levels of unpalatability, we observed that less conspicuous mutants are not fixed after 100,000 generations when wild-type individuals are highly conspicuous (Fig. 18B). By increasing the number of generations in our simulations, less conspicuous warning colour patterns still invade the population (Sup. 2), confirming that the selection coefficient associated with less conspicuous mutants is still positive. In that case, predation pressure on wild-type individuals is very low because number-dependent advantage is increased by high unpalatability; consequently, selection favouring less conspicuous colour patterns is weak such that more time is needed to reach fixation.

When unpalatability has no cost, our model suggests that decrease in conspicuousness might be favoured within a single warning colour pattern because more cryptic individuals benefit from both reduced detectability and protection brought by mimicry. (Purttinen & Kaitala, 2006), our study highlights that the effect of conspicuousness on detectability should be precisely characterized to understand the evolution conspicuousness within warning signal.

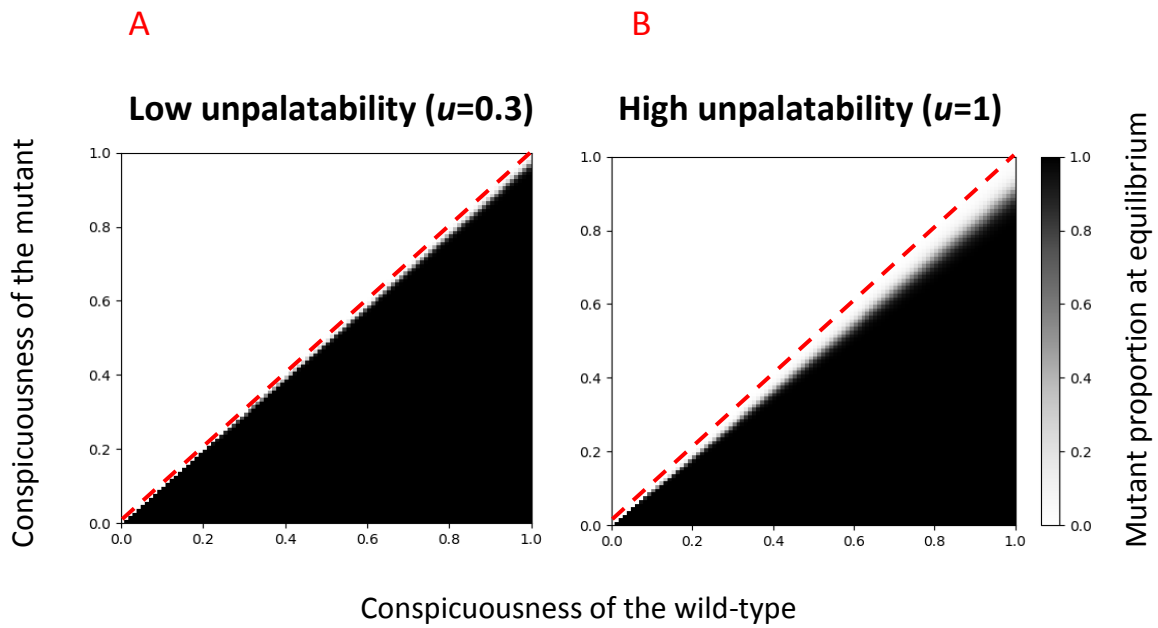


Figure 18: Evolution of conspicuousness within the same mimicry ring; wild-type and mutant have the same warning colour pattern but with a different conspicuousness.

Frequency of mutant and wild-type individuals after 100,000 generations, assuming different levels of conspicuousness c_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and c_m of mutant individuals (y-axis). Colour scale indicates frequency of mutant individuals, with white representing 0% (100% wild-type individuals) and black being 100% (0% wild-type individuals). Red dashed line shows diagonal, where $c_{wt} = c_m$. Here the value of resource specialisation, α , do not influence the invasion pattern. Warning colour pattern are detectable, $\beta = 1$, thus suffer greater predation. Predation functions followed equations [5] and [6], assuming basal predation rates $p_{wt} = p_m = 0.5$. Unpalatable values are fixed within each simulation, A) $u_{wt} = u_m = 0.3$, B) $u_{wt} = u_m = 1$.

2- Mimicry promotes the persistence of mildly conspicuous warning colour pattern

We then investigate invasion probability of mutants harbouring a different colour pattern from that of the wild-type (two-signal hypothesis). In defended population, mutants displaying a new warning signal rarely invade (Fig. 19), even when less conspicuous than the wild-type signal, because wild-type individuals benefit from a stronger number-dependent selection. Nevertheless, more conspicuous signals can invade when wild-type individuals display a very cryptic signal (Fig. 19). Such invasion of a new signal with higher conspicuousness is favoured when the basal predation rate of mutants (p_m) decreases, *i. e.* when the new signal mimics warning patterns displayed by an abundant local community of defended species (Fig. 19). New signals with increased conspicuousness can be favoured by greater memorability; by diminishing the effect of conspicuousness on detectability while maintaining the same level of memorability (low β), we observe an increase in the invasion range of the more conspicuous mutant (Sup. 3). When the effect of conspicuousness on detectability decreases, its positive effect on memorability further facilitates the invasion of an – initially rare – new conspicuous signal.

Our model therefore suggests that a more conspicuous signal matching a local mimetic community can be advantaged in a population of cryptic prey, but mostly fails to invade populations where wild-type individuals already display a mildly to strongly conspicuous signal. This might explain the persistence of signals with mild conspicuousness in Ithomiini butterflies, whereby many species harbour partly transparent mimetic colour patterns (Beccaloni, 1997; Willmott *et al.*, 2017) despite their high levels of chemical defences (Brown, 1984; Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996; Trigo, 2010). Transparency in Ithomiini results in a decrease in detectability by avian predators (Arias *et al.*, 2019). But these mildly conspicuous colour patterns might still be advantaged by their level of conspicuousness (providing both low detectability but sufficient memorability) and the abundance of their mimicry ring.

Mutant mimicry ring abundance as compared to the wild-type one

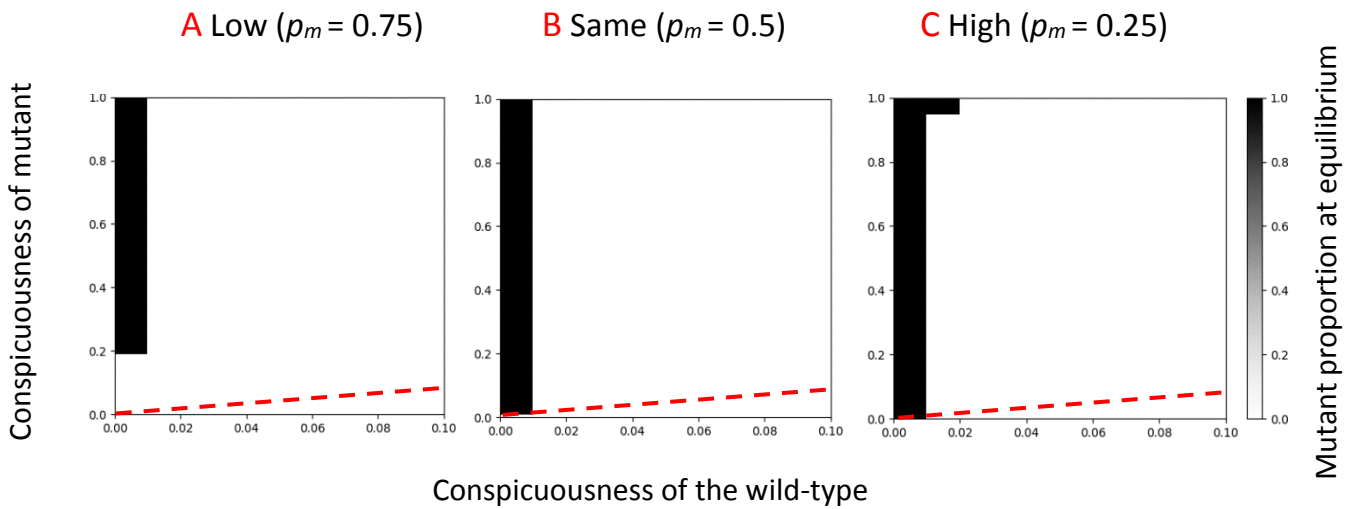


Figure 19: Evolution of conspicuousness among different mimicry rings; wild-type and mutant have a different warning colour pattern under various predation risks.

Frequency of mutant and wild-type individuals after 100,000 generations, assuming different levels of conspicuousness c_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and c_m of mutant individuals (y-axis). The x-axis scale is cropped for visual comfort. Colour scale indicates frequency of mutant individuals, with white representing 0% (100% wild-type individuals) and black being 100% (0% wild-type individuals). Red dashed line shows diagonal where $c_{wt} = c_m$. Parameter modulating resource specialisation $\alpha = 1$ but variations in α , gives similar results on invasion pattern. Here, warning colour pattern is detectable, $\beta = 1$. Unpalatability value is fixed within each simulation, here $u_{wt} = u_m = 1$ (high unpalatability). Predation functions followed equations [7] and [8]. Various basal predation rates modelling mutant morph belonging to A) a rare mimicry ring ($p_{wt} = 0.5$, $p_m = 0.75$), B) a mimicry ring of same abundance as the wild-type morph ($p_{wt} = p_m = 0.5$), and C) an abundant mimicry ring ($p_{wt} = 0.5$, $p_m = 0.25$).

3- Less unpalatable mutants are advantaged in population displaying a single warning signal

We explored the evolution of unpalatability within a population where all individuals display the same warning colour signal (single-signal hypothesis). When unpalatability stems from increased resource specialisation ($\alpha \neq 0$), mutants with lower unpalatability invade the population (Fig. 20A, C) because they share the same warning colour pattern with more unpalatable wild-type, while bearing a lower cost due to resource specialisation. As a consequence, when unpalatability becomes independent from resource specialisation ($\alpha = 0$), mutant with lower unpalatability no longer invade (Fig. 20B, D). Less unpalatable mutants are favoured as soon as unpalatability is linked to resource specialisation, regardless of conspicuousness level (Sup. 4). For instance, in aposematic butterflies, the origin of unpalatability, sequestered and/or synthesized from host-plants, therefore impacts the evolution of the level of chemical defences, stressing the need to consider not only variations in chemical defences within mimicry rings but also the ecological pathway enabling these variations.

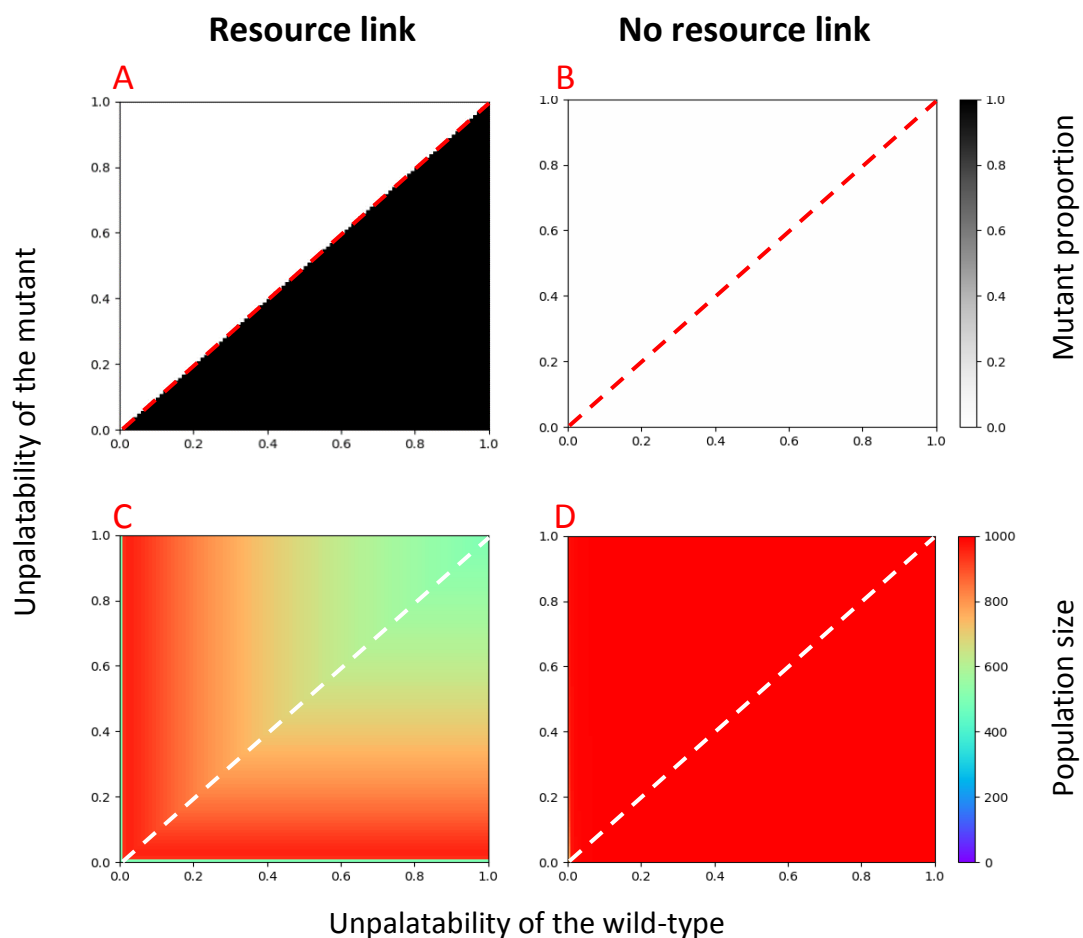


Figure 20: Evolution of unpalatability within the same mimicry ring.

Only resource specialisation controls invasion pattern and population size. Frequency of mutant and wild-type individuals after 100,000 generations, assuming different levels of unpalatability u_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and u_m of mutant individuals (y-axis). Red and white dashed lines show diagonal where $u_{wt} = u_m$. A-B) Mutant proportion at equilibrium. Colour scale indicates proportion of mutant individuals fixed, with white representing 0% (100% wild-type individuals) and black representing 100% (0% wild-type individuals). C-D) Population size at equilibrium. Colour scale indicates number of individuals ($N_{wt}+N_m$), with dark blue representing 0 (extinct population but never reached) and red representing 1000 (saturation of the carrying capacity $K = 1000$, but never observed).

Here the effect of conspicuousness on detectable, β , has no effect. Conspicuousness value is fixed within each simulation, here $c_{wt} = c_m = 1$, and same results are observed for every tested value. Predation functions following equations [5] and [6], assuming basal predation rates $p_{wt} = p_m = 0.5$.

A-C) Individuals rely partly on resources to acquire unpalatable metabolites. Here $\alpha = 1$ but same invasion pattern is observed as long as $\alpha \neq 0$. Individual can sequester and synthesize their unpalatable compounds. B-D) There is no link between unpalatability and resources, $\alpha = 0$. Individual can only synthesize their unpalatable compounds.

4- Müllerian mimicry limits the emergence of new signal associated with reduced defence

Finally, we investigate the evolution of unpalatability when mutants and wild-types display distinct warning signals (two-signal hypothesis) but similar level of conspicuousness. Here we assume that level of unpalatability is positively linked to resource specialisation ($\alpha \neq 0$), so that more unpalatable individuals suffer from increased competition for resource. Mutants with increased unpalatability can invade only in wild-type populations that are fully palatable (Fig. 21A). Otherwise, only mutants with drastically lower level of unpalatability compared to wild-type individuals can invade (Fig. 21A). In that case, individuals displaying a new colour pattern suffer from increased predation risk as compared to wild-type individuals, which benefit from number-dependent advantage. Nevertheless, because high unpalatability results in a reduction in abundance (Fig. 21C), mildly unpalatable mutant individuals can quickly reach a higher abundance and replace highly unpalatable wild-type individuals (Fig. 21A). When relaxing the hypothesis linking unpalatability to resource specialisation (*i. e.* assuming $\alpha = 0$), mutants with decreased unpalatability no longer invade (Fig. 21B), confirming the role of resource specialisation in the evolution of new warning signal associated with decreased unpalatability. This trend is observed whatever the values of conspicuousness (Sup. 5).

Because resource specialisation is likely to reduce abundance, it has a strong impact on the evolution of aposematic signal, enabling for instance signal associated with lower unpalatability to settle in mimetic population with high unpalatability. This might explain why generalist species, such as the mimetic butterfly *Heliconius erato*, can be found in large abundances despite displaying a low level of unpalatable compounds (Arias et al. 2016). This low unpalatability level contrasts with the high unpalatability levels observed in closely related specialist species like *H. sara* (Arias et al., 2016), displaying a different signal and often living in sympatry.

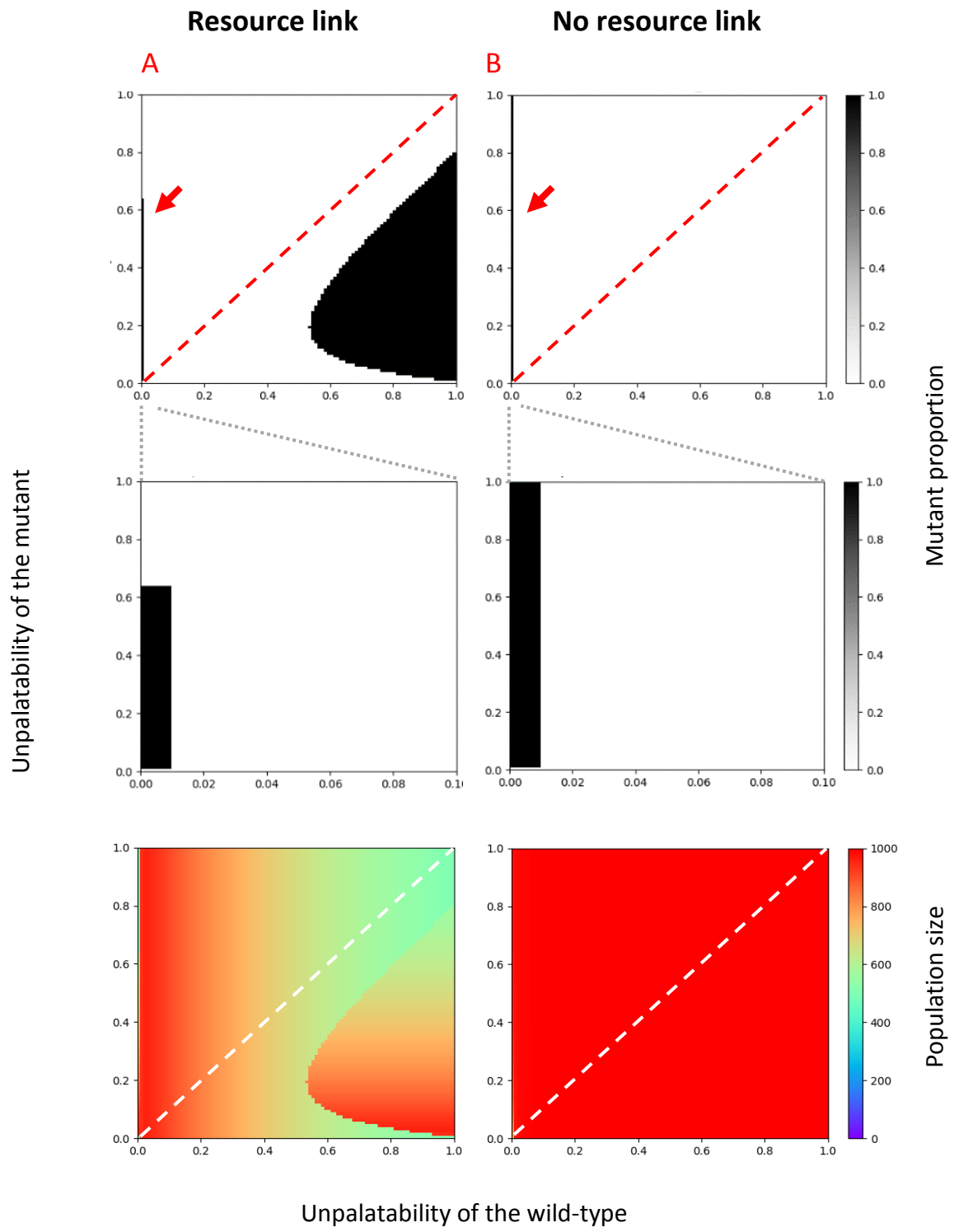


Figure 21: Evolution of unpalatability between individuals displaying a different warning signal. Only resource specialisation controls invasion pattern and population size. Frequency of mutant and wild-type individuals after 100,000 generations, assuming different levels of unpalatability u_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and u_m of mutant individuals (y-axis). Red and white dashed lines show diagonal where $u_{wt} = u_m$.

A-B) Mutant proportion at equilibrium. Colour scale indicates proportion of mutant individuals fixed, with white representing 0% (100% wild-type individuals) and black representing 100% (0% wild-type individuals). Red arrows point out mutant invasion when the wild-type is palatable ($u_{wt} = 0$), and these areas are zoomed for better visualisation.

C-D) Population size at equilibrium. Colour scale indicates number of individuals ($N_{wt} + N_m$), with dark blue representing 0 (extinct population but never reached) and red representing 1000 (saturation of the carrying capacity $K = 1000$, but never observed).

Detectability ($\beta = 0$ or $\beta = 1$) do not influence invasion pattern. Conspicuousness value is fixed within each simulation, here $c_{wt} = c_m = 1$, and similar results are observed for every tested value. Predation functions following equations [7] and [8]. We tested various predation risks modelling mutant morph belonging to a rare mimicry ring ($p_{wt} = 0.5$, $p_m = 0.75$), a mimicry ring of same abundance as the wild-type morph ($p_{wt} = p_m = 0.5$), and an abundant mimicry ring ($p_{wt} = 0.5$, $p_m = 0.25$). Here we present results for $p_{wt} = p_m = 0.5$, as other conditions are similar. Red arrows point out mutant invasion when the wild-type is palatable ($u_{wt} = 0$).

A-C) Individuals rely partly on resource to acquire unpalatable metabolites, $\alpha = 1$. Individual can sequester and synthesize their unpalatable compounds.

B-D) There is no link between unpalatability and resource, $\alpha = 0$. Individual can only synthesize their unpalatable compounds.

DISCUSSION

The evolution of conspicuousness depends on mimetic interactions

Overall, our model highlights that the evolution of increased conspicuousness is unlikely when assuming no direct effect of unpalatability or colour pattern conspicuousness on predator deterrence. In this case, we showed that more conspicuous warning colour patterns cannot evolve unless considering Müllerian mimicry. Within species harbouring a single colour pattern, protection brought by number-dependent selection facilitates the emergence of less conspicuous warning colouration.

By contrast, our theoretical approach highlights that the emergence of more conspicuous warning colour patterns can be favoured by mimetic interactions with local community. In a diverse mimetic environment where the mutant pattern belongs to another mimicry ring in the community, we showed that more conspicuous warning colour patterns can be favoured over cryptic patterns, but not over a mildly conspicuous warning pattern. This suggests that mildly conspicuous signals can still provide efficient protection against predation. This might explain the diversity of levels of conspicuousness of warning colour pattern in closely-related species, such as transparent and opaque patterns in Ithomiini butterflies (Elias *et al.*, 2008; Chazot *et al.*, 2014). Considering mimetic community opens a new angle to explain the evolution of the wide diversity of colour patterns: even if number-dependent selection favours the most abundant signals within population, its effect can be modulated by variation in the conspicuousness of the different signals.

On top of mimicry, some cognitive biases in predators might favour the invasion of more conspicuous warning colour patterns in unpalatable species: innate memorability, direct deterrence, diet conservatism or neophobia have indeed been shown to promote the emergence of new warning patterns (Marples & Kelly, 1999; Marples *et al.*, 2005; Aubier & Sherratt, 2015). Moreover, in our model, conspicuousness variations within a given warning colour pattern do not affect the predator's generalization behaviour. However, when difference of conspicuousness becomes very high, predators may be less likely to generalize, leading to mutant individuals losing protection from the strength in number.

Environmental variations and stochasticity could also favour the settlement of new warning colour patterns in defended species. For instance, some colour pattern might benefit from crypsis in a given habitat by matching the local background but habitat change might then

enhances the evolution of conspicuousness (Merilaita & Tullberg, 2005; Speed & Ruxton, 2005b; Tullberg *et al.*, 2005; Speed, Brockhurst, *et al.*, 2010). Stochastic events, including colonization of new environments, have been predicted to facilitate the emergence of new colour patterns (Joron & Mallet, 1998a; Mallet, 2010), and may allow more conspicuous patterns to arise. Such emergence of conspicuous colour pattern can also be enhanced by gregariousness, which generate an initial number-dependent advantage (Leimar *et al.*, 1986).

The balance between detectability and memorability can modify the emergence of new mimicry pattern

Evolution of warning colour patterns relies on the evolution of conspicuousness: defended prey benefit from aposematism only if predators are able to associate the colour pattern with chemical defences. More specifically, our model highlights that memorability of warning signal has an important influence on predator's behaviour, as it reduces predation probability (Gittleman & Harvey, 1980; Ham *et al.*, 2006). Warning patterns might thus have a different evolutionary fate depending on signal memorability. In the mimicry literature, models exploring the emergence and persistence of multiple mimetic signals (Sherratt *et al.* 2006, Mallet 2010) usually consider that all mimetic signals have the same predation risk, and that the attack rate then depends on local number-dependent selection. Here we highlight that the evolution of mimetic signals in defended species results from complex interactions between signal abundance and unpalatability but also on the detectability/memorability balance of the different mimetic colour patterns.

The evolution of unpalatability is underpinned by resource specialisation.

We showed that selection favours individuals with lower unpalatability level, because of the link between unpalatability and resource specialisation assumed in our model. Within a single warning colour pattern, less unpalatable mutants strictly invade the population because they benefit from the same number-dependent selection as wild-types. By considering a diverse mimetic community, mutants with a colour pattern belonging to a different mimicry ring lose this advantage, which inhibits the invasion of less unpalatable mutants. In our model, as in some prey species such as butterflies, unpalatable metabolites are either synthesized and/or sequestered from specialised resources (*e. g.*, butterfly larval hostplants), and unpalatability is considered as an heritable trait linked to capacities to survive and acquire unpalatable

compounds from defended resources. This assumption has important impact on the evolution of unpalatability within and among mimetic signals. The origin of unpalatability variations in conspicuous prey, their dependence to local resources and the link between resource specialisation and prey carrying capacity thus needs to be empirically investigated to improve our understanding of the evolution of mimetic warning patterns. Furthermore, co-mimetic species sometimes share the same resources (Willmott & Mallet, 2004; Elias *et al.*, 2008; Alexandrou *et al.*, 2011), such that resource competition might be more important within mimicry ring. If level of unpalatability is linked to resource specialisation, the co-evolution between conspicuous mimetic signal and unpalatability would therefore be shaped by both mutualistic and competitive interactions between co-mimetic species.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

VL, ME and OS designed the study, TGA, LM and OS wrote the code, OS ran simulations. OS wrote the manuscript with contributions from all authors. All authors participated in constructive discussions and approved manuscript final version.

COMPETING INTERESTS

We declare no competing interests.

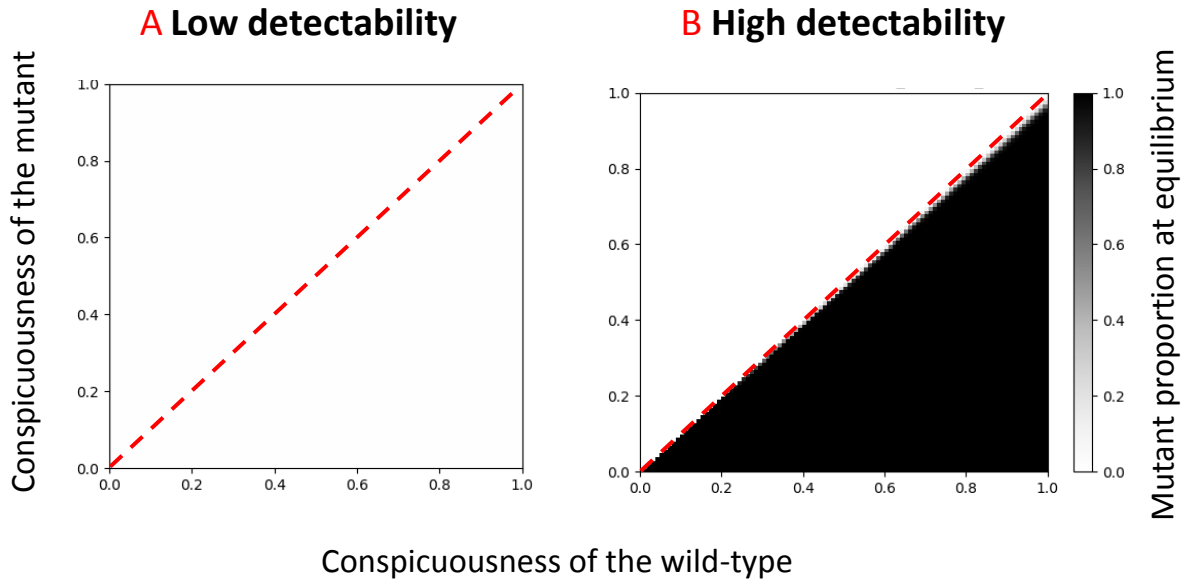
FUNDINGS

This work was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche under the LabEx ANR-10-LABX-0003-BCDiv, in the program "Investissements d'avenir" number ANR-11-IDEX-0004-02, attributed to OS and Paris city council grant *Emergence* to VL.

REFERENCES

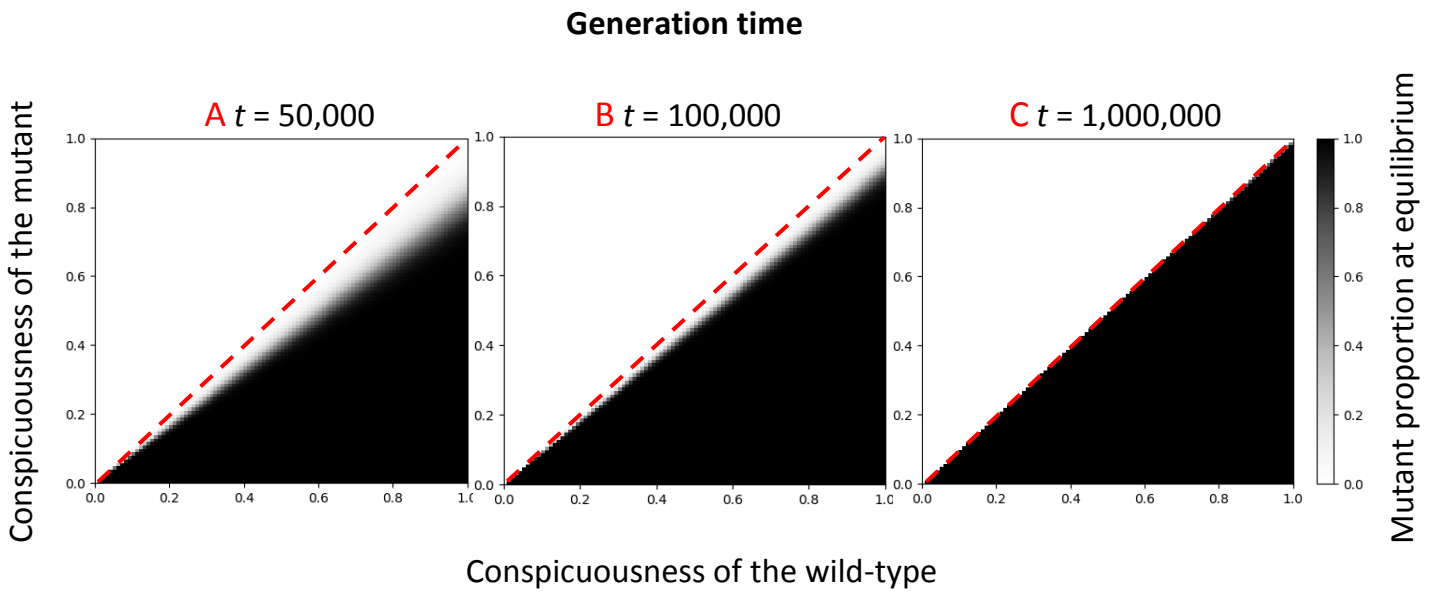
At the end of the present thesis

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Supporting information 1: Effect of detectability of the evolution of conspicuousness within the same warning signal.

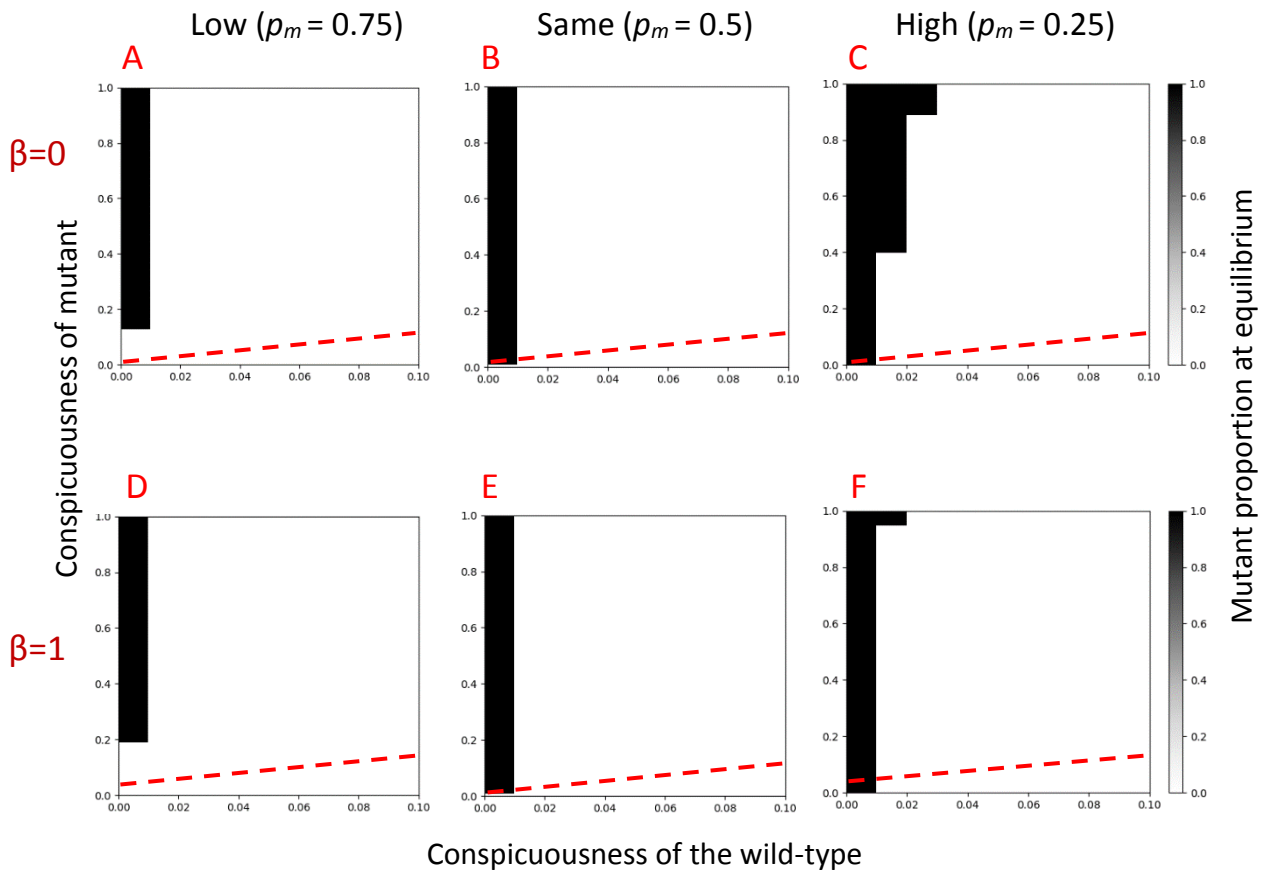
Frequency of mutant and wild-type individuals after 100,000 generations, assuming different levels of conspicuousness c_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and c_m of mutant individuals (y-axis). Colour scale indicates proportion of mutant individuals fixed at equilibrium, with white representing 0% (100% wild-type individuals) and black representing 100% (0% wild-type individuals). Red dashed line shows diagonal where $c_{wt} = c_m$. The parameter α linking unpalatability to resource specialisation has no effect on the evolutionary outcome. Predation functions followed equations [5] and [6], assuming basal predation rates $p_{wt} = p_m = 0.5$ and $u_{wt} = u_m = 0.3$ as an example, but all other unpalatability values give the same results. Invasion pattern for A) non-detectable $\beta = 0$ and B) detectable $\beta = 1$ warning colour pattern.



Supporting information 2: Evolution of conspicuousness within the same mimicry ring depending on generation time.

Frequency of mutant and wild-type individuals, assuming different levels of conspicuousness c_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and c_m of mutant individuals (y-axis). Colour scale indicates proportion of mutant individuals, with white representing 0% (100% wild-type individuals) and black representing 100% (0% wild-type individuals). Red dashed line shows diagonal where $c_{wt} = c_m$. Here α value (degree of resource specialisation) does not impact invasion pattern, and $\beta = 1$ so conspicuous warning colour pattern is detectable. Simulations were run over A) 50,000 B) 100,000 and C) 1,000,000 generations with predation functions followed equations [5] and [6], assuming basal predation rates $p_{wt} = p_m = 0.5$ and $u_{wt} = u_m = 1$ (high unpalatability). Less conspicuous morph is always advantaged. Selection coefficient is weaker for the mutant selection when the wild-type is highly conspicuous (see A top right corner). Thus, it takes more time for the mutant morph to be fixed in the population (see C top right corner).

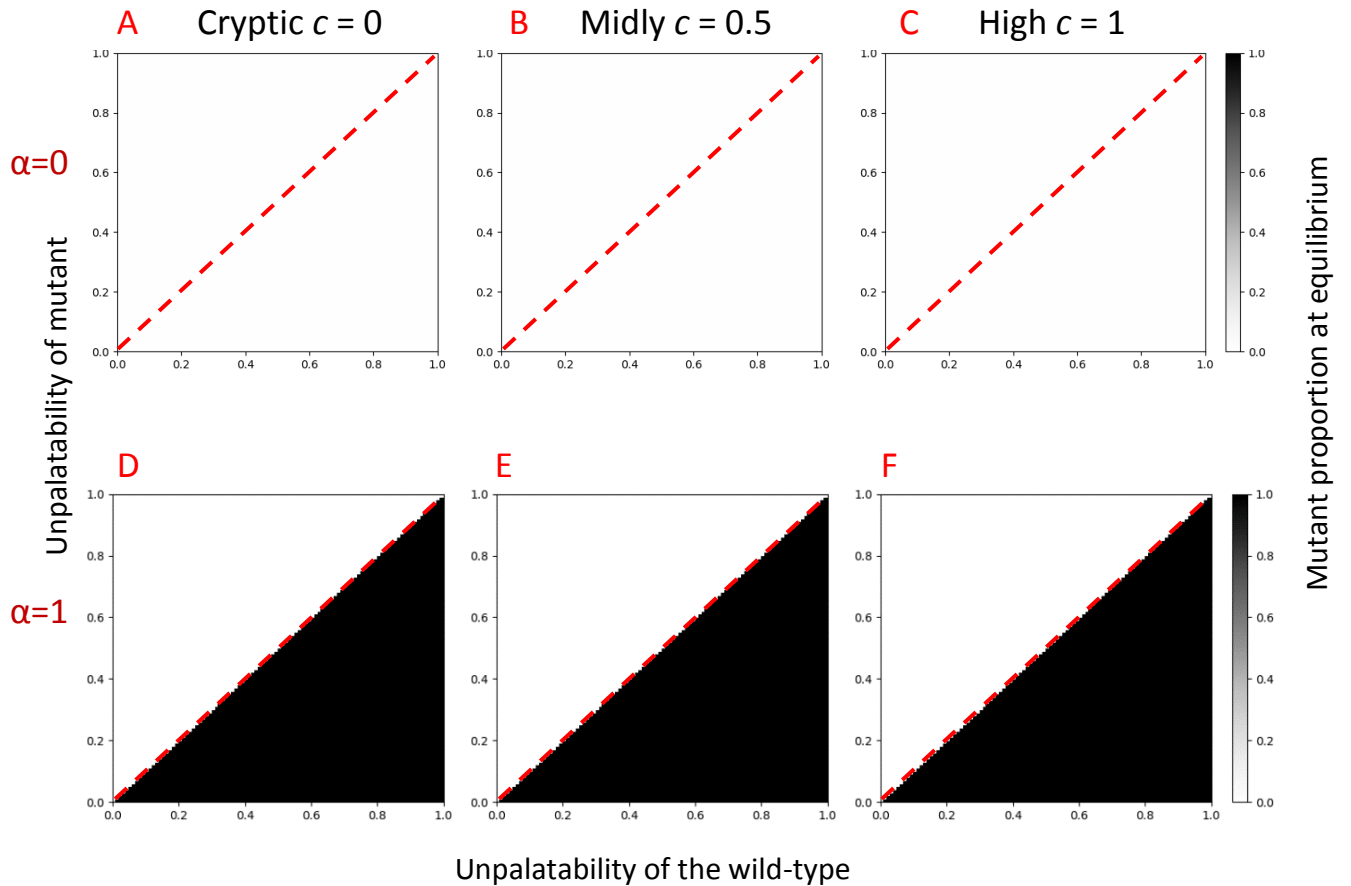
Mutant mimicry ring abundance as compared to the wild-type one



Supporting information 3: Effect of detectability on the evolution of conspicuousness depending on the mimicry abundance in unpalatable populations.

Frequency of mutant and wild-type individuals after 100,000 generations, assuming different levels of conspicuousness c_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and c_m of mutant individuals (y-axis). The x-axis scale is cropped for visual comfort. Colour scale indicates frequency of mutant individuals, with white representing 0% (100% wild-type individuals) and black being 100% (0% wild-type individuals). Red dashed line shows diagonal where $c_{wt} = c_m$. Here, parameter modulating resource specialisation $\alpha = 1$ but variations in α , gives similar results on invasion pattern. Unpalatability value is fixed within each simulation, here $u_{wt} = u_m = 1$ (high unpalatability). Predation functions followed equations [7] and [8]. Various basal predation rates modelling mutant morph belonging to A-D) a rare mimicry ring ($p_{wt} = 0.5$, $p_m = 0.75$), B-E) a mimicry ring of same abundance as the wild-type morph ($p_{wt} = p_m = 0.5$), and C-F) an abundant mimicry ring ($p_{wt} = 0.5$, $p_m = 0.25$). On first row, warning colour pattern has the minimum of detectability, $\beta = 0$, and the maximum on the second row $\beta = 1$.

Conspicuousness of the warning colour pattern

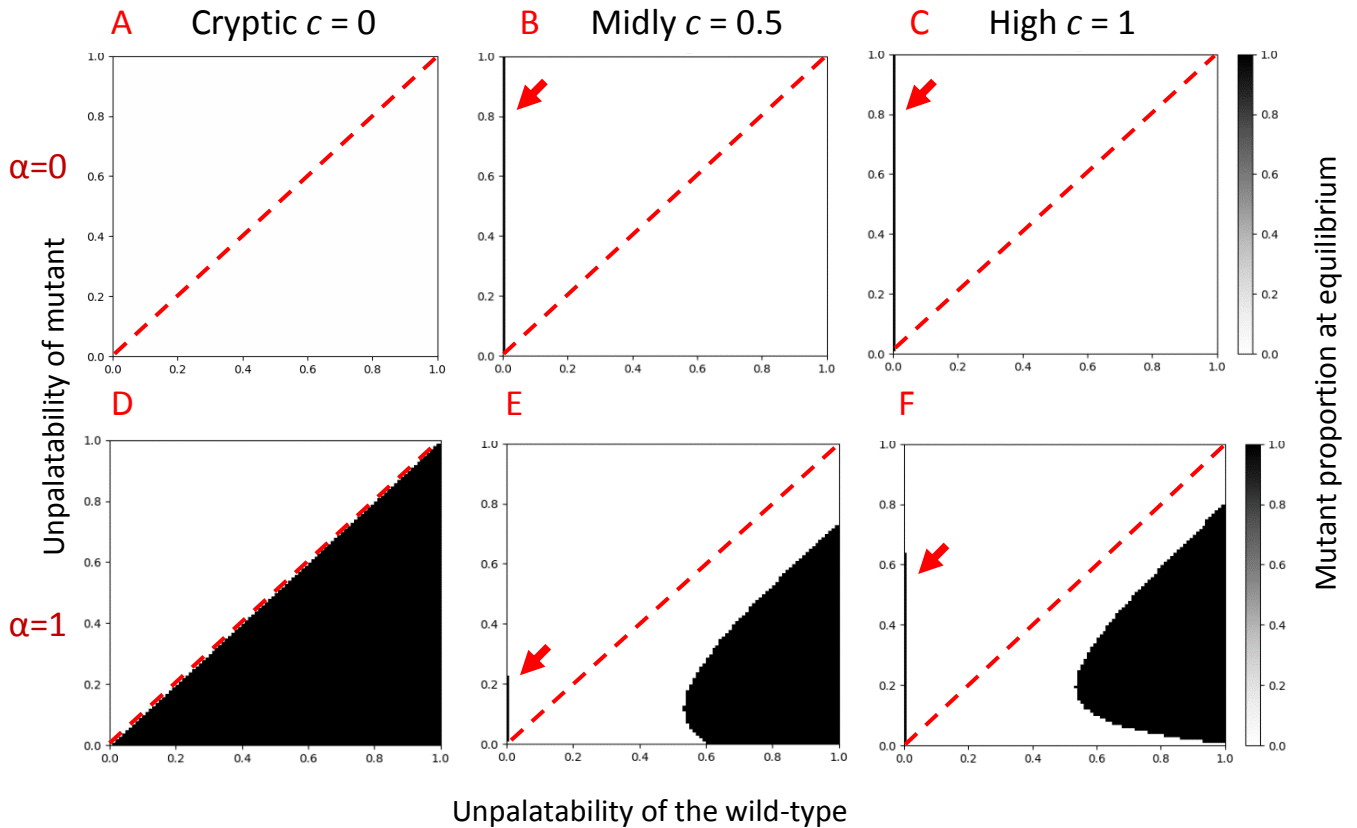


Supporting information 4: Evolution of unpalatability within the same warning colour pattern in populations.

Frequency of mutant and wild-type individuals after 100,000 generations, assuming different levels of unpalatability u_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and u_m of mutant individuals (y-axis). Red dashed line shows diagonal where $u_{wt} = u_m$. Here $\alpha = 1$ but same invasion pattern is observed as long as $\alpha \neq 0$. Warning colour pattern is detectable, $\beta = 1$, but variations of β do not change invasion patterns. Predation functions following equations [5] and [6], assuming basal predation rates $p_{wt} = p_m = 0.5$. Conspicuousness value is fixed within each simulation, A-D) cryptic population $c_{wt} = c_m = 0$, B-E) midly conspicuous population $c_{wt} = c_m = 0.5$ C-F) highly conspicuous population $c_{wt} = c_m = 1$.

First row A-B-C) there is no link between unpalatability and resource, $\alpha = 0$, individual can only synthesize their unpalatable compounds, and second row D-E-F) individuals rely partly on resource to acquire unpalatable metabolites.

Conspicuousness of the warning colour pattern



Supporting information 5: Evolution of unpalatability among population displaying different warning colour.

Wild-type and mutant have different levels of unpalatability u_{wt} of wild-type individuals (x-axis) and u_m of mutant individuals (y-axis). Red dashed line shows diagonal where $u_{wt} = u_m$. Red arrows point out mutant invasion when the wild-type is palatable ($u_{wt} = 0$). Conspicuousness value is fixed within each simulation, A-D) cryptic population $c_{wt} = c_m = 0$, B-E) midly conspicuous population $c_{wt} = c_m = 0.5$ C-F) high conspicuous population $c_{wt} = c_m = 1$. Simulations were run over 100,000 generations, with predation functions following equations [7] and [8]. We present results when wild-type and mutant belong to two different mimicry rings of the same abundance, with basal predation rates $p_{wt} = p_m = 0.5$. First row A-B-C) there is no link between unpalatability and resource, $\alpha = 0$, individual can only synthesize their unpalatable compounds, and second row D-E-F) individuals rely partly on resource to acquire unpalatable metabolites, $\alpha = 1$. Here warning colour patterns are detectable, $\beta = 1$, but variations of β do not change invasion patterns.

Chapitre II

Variation of chemical compounds in wild Heliconiini reveals ecological factors involved in the evolution of chemical defences in mimetic butterflies



Variation of chemical compounds in wild Heliconiini reveals ecological factors involved in the evolution of chemical defences in mimetic butterflies

OMBELINE SCULFORT^{1,2}, ERIKA C. P. DE CASTRO³, KRZYSZTOF M. KOZAK⁴, SØREN BAK⁵, MARIANNE ELIAS¹, BASTIEN NAY^{2,6} AND VIOLAINE LLAURENS¹

¹ Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne-Université, EPHE, Université des Antilles, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France

² Unité Molécules de Communication et Adaptations des Micro-organismes (MCAM), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, 57 rue Cuvier (BP 54), 75005 Paris, France

³ Department of Zoology, Cambridge University. Downing Street, CB3 3EJ, Cambridge, United Kingdom

⁴ Smithsonian Tropical Research Institute, Panamá, República de Panamá

⁵ Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej 40, DK-1871 Frederiksberg, Denmark

⁶ Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, CNRS, ENSTA, Institut Polytechnique de Paris, Route de Saclay, 91128 Palaiseau Cedex, France

Corresponding author: Ombeline Sculfort, ombelinesculfort@hotmail.fr

Keywords: Aposematism, cyanogenic glucosides, LC-MS/MS, Heliconius, Müllerian mimicry, phylogenetic signal.

Abstract

Evolutionary convergence of colour pattern in mimetic species is tightly linked with the evolution of chemical defences. Yet, the evolutionary forces involved in natural variations of chemical defences in aposematic species are still understudied. Herein, we focus on the evolution chemical defences in the butterfly tribe Heliconiini. These neo-tropical butterflies contain large concentrations of cyanogenic glucosides, cyanide-releasing compounds that act as predator deterrent. These compounds are either de novo synthesized or sequestered from their *Passiflora* host-plant, so that their concentrations may depend on host-plant specialization and host-plant availability.

We sampled 375 wild Heliconiini butterflies across Central and South America, covering 43% species of this clade, and quantify individual variations in the different cyanogenic glucosides using LC-MS/MS. We detected new compounds and important variations in chemical defences both within and among species. Based on the most recent and well-resolved phylogeny of Heliconiini, we show that ecological factors such as mimetic interactions and host-plant specialization have a significant effect on chemical profiles, but these effects are largely explained by phylogenetic relationships. Our results therefore suggest that shared ancestries largely contribute to chemical defence variation, pointing out at the interaction between historical and ecological factors in the evolution of Müllerian mimicry.

INTRODUCTION

The evolution of complex phenotypes combining different traits subject to natural selection raises the question of the mechanisms underlying adaptation involving multiple traits. In aposematic species for instance, the defensive traits such as unpalatable compounds, and the warning coloration may evolve asynchronously and can be submitted to contrasted selective pressures. While the evolution of colour patterns and the selective mechanisms involved have received considerable attention (Sherratt, 2008; Le Poul *et al.*, 2014), the evolutionary origin of chemical defence variations is still understudied. The effect of chemical defences on predator avoidance is critical for prey survival (Ihalainen *et al.*, 2007) and therefore central in the evolution of warning colorations (Speed & Ruxton, 2007; Blount *et al.*, 2009). By sampling aposematic prey, predators learn to associate deterrent effect with a given warning colour pattern and subsequently avoid any resembling prey item (Alcock, 1970a, 1970b; Goodale & Sneddon, 1977). The immediate and long-term effect of defensive compounds thus determines the protection gained from aposematism (Skelhorn & Rowe, 2005), and therefore the evolution of colour patterns.

Evolutionary convergence in aposematic signal among co-occurring defended prey species is frequently observed among sympatric aposematic species, because sharing a colour pattern decreases individual predation risk (Müller, 1879a). This results in so-called mimicry rings, composed of multiple species sharing a similar warning colour pattern. Both the defensive compounds and the abundance of individuals sharing a given warning colour pattern determine the predation risk associated with this coloration (Sherratt, 2008). Substantial quantitative variation in chemical defences is observed between mimetic species, as demonstrated for instance in poison frogs (Santos & Cannatella, 2011), marine gastropods opisthobranchs (Cortesi & Cheney, 2010) or insects (Bezzerrides *et al.*, 2007; Arias, Meichanetzoglou, *et al.*, 2016; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Less defended individuals—quasi-Batesian mimics— may act as parasites on better defended individuals by limiting predator avoidance (Speed, 1993; Rowland *et al.*, 2010). The evolution of chemical defences in mimetic species is thus likely to be influenced by the local abundance of the mimicry ring they belong too, as well as variations in unpalatable compound levels across individuals composing the ring.

Nevertheless, other local ecological factors may influence the evolution of chemical defences in mimetic species. In butterflies for instance, deterrent compounds, as well as precursors for their synthesis, can be acquired by caterpillars during feeding on specific host-plants (Nishida, 2002; Jones *et al.*, 2019). Chemical defences may thus vary among species depending on their diet (Engler & Gilbert, 2007). For instance, monarch butterflies (*Danaus plexippus*) sequester cardenolides from milkweeds during the larval stage and are thus unpalatable to birds (Brower *et al.*, 1972). Adaptation to host-plants is thus a key evolutionary factor in the origin and evolution of chemical defences in aposematic butterflies. Nevertheless, because of the strength of predation on adult butterflies, the evolution of chemical defences in mimetic butterflies can result from complex interactions between host-plant adaptation and predation pressure. A recent survey of natural populations of two co-mimetic butterfly species, the viceroy (*Limenitis archippus*) and queen (*Danaus gilippus*), demonstrated that the average concentration of chemical defences increases in the viceroy populations, while decreasing in the co-mimic (Prudic *et al.*, 2019). This effect is independent from variation of compound concentrations in host-plants (Prudic *et al.*, 2019), highlighting that both host-plant adaptation and mimetic interactions may be important selective factors evolved in the evolution of chemical defences in mimetic species.

Here we aim to disentangle the mechanisms involved in the evolution of chemical defences, from neutral divergence to selective pressure of predation and host-plant adaptation. We focus on the butterflies belonging to the neotropical tribe Heliconiini (Nymphalidae: Heliconiinae), where colour pattern evolution and mimetic interactions have been extensively documented (Joron & Mallet, 1998b; Joron & Iwasa, 2005; Merrill *et al.*, 2015). Subspecies of Heliconiini are defined based on variation in colour pattern between geographic locations (Braby *et al.*, 2012). Heliconiini butterflies contain a wide diversity of defensive compounds, especially aliphatic or cyclopentenoid cyanogenic glucosides (CGs) (Fig. 22) (de Castro, Zagobelny, *et al.*, 2019). CGs are supposed to have a bitter and repulsive taste (Nahrstedt & Davis, 1985). Additionally, CGs release toxic cyanide and chemical by-products for birds when put in contact with specific degrading enzymes (Conn, 1980; Cardoso, 2019). Cyanogenic substrate and enzymes or stored in different cell or tissue compartment and are mixed upon tissue disruption under a predator's attack, so that Heliconiini butterflies often survive an attack after being tasted (e.g. by lizard (Boyden, 1976) or avian predators (Boyden, 1976; Chai,

1996; Pinheiro & Campos, 2019)). Therefore, the bitter taste provided by CG and toxic metabolites may act as a chemical defence because of immediate deterrent effect on predator.

Heliconiini caterpillars feed on *Passiflora* plants (Turner, 1967; Engler & Gilbert, 2007; Jiggins, 2016), with substantial behavioural variation in female egg-laying preferences and in larval survival on different *Passiflora* species (Benson *et al.*, 1975; Brown, 1981). Around 30 different CGs have been identified in *Passiflora* (Spencer & Seigler, 1987; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Larvae of most Heliconiini species synthesize CGs *de novo* (Wray *et al.*, 1983), but many sequester CGs from the host-plants (Engler *et al.*, 2000). Both synthesis and sequestration of CGs is only observed in Zygaenidae (burnet moths) and Heliconiini, two clades where aposematic colour patterns have evolved (Zagrobelny, de Castro, *et al.*, 2018). So far, Heliconiini have been reported to sequester five cyclopentenoid CGs from *Passiflora*; the enantiomers tetraphyllin B and epivolkenin, tetraphyllin A, gynocardin and dihydrogynocardin (Fig. 22) (Engler *et al.*, 2000; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Heliconiini butterflies can synthesize aliphatic CGs, linamarin and lotaustralin (Fig. 22) from the amino acids valine and isoleucine, respectively (Nahrstedt & Davis, 1985). Identifying the different CGs may thus allow tracking down their metabolic, although aliphatic linamarin and lotaustralin can also be uptaken by caterpillars, as recently demonstrated in *Heliconius melpomene* (de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019). The balance between sequestration from host-plants and *de novo* synthesis of CGs in different species may be linked to host-plant specialization. CG sequestration might be more important than synthesis in specialist species, as for instance in the specialist species *Heliconius sara* and *H. sapho* containing drastically diminished CG concentrations when reared on other *Passiflora* species than their specific host-plants (Engler & Gilbert, 2007). Evolution of chemical defences in the Heliconiini clade can thus be influenced by the adaptation to host-plants.

The substantial geographic variation in colour patterns and host-plants observed in the Heliconiini clade (Jiggins, 2016) provides a relevant opportunity to investigate the effect of selection pressure on the evolution of chemical defences in mimetic species. Based on the well-resolved phylogeny of Heliconiini (Kozak *et al.*, 2015), we thus explored how phylogenetic history, mimetic interactions and host-plant use drive the evolution of chemical defence in wild butterflies. We studied a large sample of wild Heliconiini from different geographic

locations of South America to assess variation in chemical defences both within and across mimicry rings. This work allows us to assess differences in chemical defences in natural conditions whereby sampled individuals fed on available host-plants and faced their actual predators. Using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) we investigate both quantitative and qualitative variation across individuals.

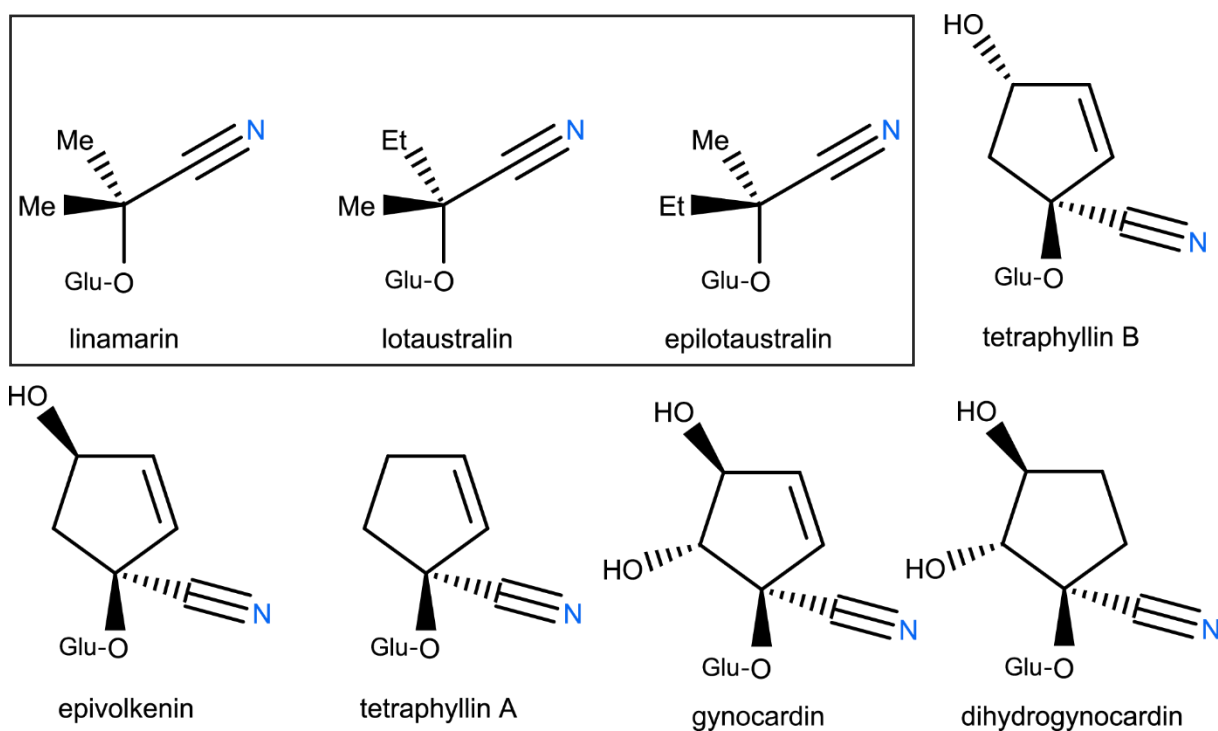


Figure 22: Cyanogenic glucosides identified in *Heliconiini*. Framed molecules are aliphatic CGs synthesized by *Heliconiini*, followed by cyclopentenoid CGs sequestered from *Passiflora* plants. Glucose group is symbolized by “Glu”. For the first time in *Heliconiini*, we report epilotaustralin and an enantiomer of tetraphyllin A (which is not represented here because it was not identified during this study).

MATERIALS AND METHODS

Butterfly collection

Wild butterflies were caught from 2016 to 2018 across Peru ($n = 286$), Panama ($n = 45$), Ecuador ($n = 24$) and Brazil ($n = 20$), using a hand net. We used 375 individuals from 33 species, covering 43% of the Heliconiini tribe (Sup. 6), and 55 subspecies (Sup. 7). Individuals were killed by freezing on the day of capture (approximately -18°C). Wings were cut and preserved dried in an envelope and placed in a silica gel containing box to absorb humidity. Bodies were conserved in a plastic vial containing 100% methanol —HPLC grade suitable for UPLC/UHPLC instruments VWR— and kept in freezer (approximately -18°C).

Cyanogenic glucoside extraction in methanol

For each butterfly specimen, the butterfly body and the methanol medium were transferred in a glass tube. Methanol was evaporated at room temperature until the tissue was fully dried using Savant Automatic Environmental SpeedVac System AES1010 with VaporNet. Body and wings were weighed before being crushed into a fine powder in a glass mortar and pestle using liquid nitrogen. Two mL of HPLC grade 100% methanol were added to the powder before stirring for 1 hour at room temperature. Extracts were centrifugated for 20 minutes at 1600 rpm, filtered using 7 mm diameter glass pipettes and cotton, filtered again with a MultiScreen 0.45 μm hydrophilic, low protein binding plate, and centrifuged five minutes at 3500 rpm. Raw filtrates were diluted 50 times in milliQ water, vortexed and stored in fridge until Liquid chromatography coupled to tandem mass (LC-MS/MS) injections.

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

The protocol used in this study has been previously optimized to identify and quantify cyanogenic glycosides in butterfly methanol filtrates (Briolat *et al.*, 2019; de Castro, Zagobelny, *et al.*, 2019). Analytical LC-MS/MS was performed using an Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies, Germany) hyphenated to a Bruker HCT-Ultra ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). Chromatographic separation was carried out on a Zorbax SB-C18 column (Agilent; 1.8 μm , 2.1x50 mm). Mobile phases A and B were deionized water containing 0.1% (v/v) formic acid and 50 μM NaCl and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid, respectively. The gradient was: 0 - 0.5 min, isocratic 2% B; 0.5 - 7.5 min, linear gradient 2% - 40% B; 7.5 - 8.5 min, linear gradient 40% - 90% B; 8.5 - 11.5 isocratic 90% B; 11.6

- 17 min, isocratic 2% B. Flow rate was set to 0.2 mL/min and increased to 0.3 mL/min between 11.2 to 13.5 min. During the LC step, initially neutral CGs were associated with Na⁺ cations and analysed with MS in the positive electrospray mode. The oven temperature was fixed at 35°C. In addition to the 375 butterfly samples, we ran blank control sample and a reference sample. Blank was methanol gone through the whole protocol extraction, and the reference sample was a mix of every butterfly filtrates. Cyanogenic glycosides were identified by comparison to standard solutions (aliphatic were chemically synthesized at PLEN, Møller *et al.*, 2016, cyclopentenoid were donated by Lawrence Gilbert and Helene Engler, Engler *et al.*, 2000). We made three calibration curves based on three commercial standards: linamarin, lotaustralin/epilotaustralin and amygdalin (commercial, Sigma Aldrich), from 0.1 to 20 ng/μL each. Blanks, standards, calibration curve and reference sample were run first. The reference sample was injected every ten butterfly samples.

Chemical data analyses

Mass spectra were analysed using the software Bruker Compass DataAnalysis 4.3 (x64). We targeted sodium adducts [M+Na⁺] of linamarin [retention time (RT) 2.4 min at *m/z* 270], lotaustralin [RT 5.4 min at *m/z* 284], epilotaustralin [RT 5.5 min at *m/z* 284], tetraphyllin B [RT 1.3 min at *m/z* 310], epivolkenin [RT 2.3 min at *m/z* 310], tetraphyllin A [RT 4.9 min at *m/z* 294], gynocardin [RT 1.4 min at *m/z* 326], dihydrogynocardin [RT 1.4 min at *m/z* 328] and amygdalin [RT 6.4min at *m/z* 480] (Briolat *et al.*, 2019; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). For every targeted compound, the total concentration was estimated based on the Extracted Ion Chromatogram (EIC) peak areas, and on a regression calculated from the standard curve (in ng of CG/mL of butterfly extract). We reported the concentration of each CG in every butterfly in μg of CG/mg of dried butterfly weight.

Statistical and comparative analyses

All statistics were conducted in R 3.4.4 (R: The R Project for Statistical Computing, 2019) and RStudio 1.1.463 (RStudio, 2019). Plots were created with *ggplot2* 3.0.0 package (Wickham *et al.*, 2019).

i) Qualitative and quantitative variation in cyanogenic glucosides

The difference for the CG profile, CG total concentration and each compound concentration between groups (genera, species and subspecies) was tested using MANOVA and ANOVA with associated Tukey Honest Significant Differences (Tukey's HSD) post-hoc tests in the R package *stats* 3.4.2. Heatmap of CG occurrence and concentration was plotted using R packages *ape* 5.1 and *ggtree* 1.10.5 (Paradis, 2011; Yu *et al.*, 2017).

ii) Evolution of cyanogenic glucoside profiles in Heliconiini

We calculated the phylogenetic signal of CG profile, *i. e.*, the extent to which trait values are explained by the phylogeny, or how much closely related species resemble one another in terms of CG profile (Blomberg *et al.*, 2003). We computed the K_{mult} statistic, a multivariate extension of Blomberg's K test for univariate phylogenetic signal (Blomberg *et al.*, 2003; Adams, 2014). A low phylogenetic signal (K_{mult} close to 0) indicates a low influence of the phylogenetic relationships on the tested trait, whereas high value (K_{mult} close to 1) suggests that the trait evolution along the phylogeny is close to Brownian motion. The multivariate phylogenetic signal of quantitative CG variation across species was evaluated using K_{mult} in the *geomorph* 3.0.7 R package. We calculated the phylogenetic signal in the whole Heliconiini tribe, in the largest genus of the radiation: *Heliconius* and more specifically in the pupal-mating and non-pupal-mating clades. In *Heliconius*, phenotypic races of the same species often belong to different mimicry rings. Therefore, we estimated the phylogenetic signal using mean CG concentrations separately at the taxonomic level of species ($n = 33$) and subspecies ($n = 55$). We adapted the Heliconiini phylogenetic tree (Kozak *et al.*, 2015) by pruning species not represented in our sample set. In many cases several subspecies were sampled (for example: *H. hecale felix*, *H. hecale melicerta* and *H. hecale zuleika*). For the subspecies-level analysis we extended the original phylogeny to include relevant subspecies as follows: the terminal branch length was set equal to the decimal of the previous branch, and the common branch equal to the integer part. All subspecies had same total branch length. In the case of more than two subspecies, the topology was arbitrary resolved.

iii) Phylochemospace

We applied the concept of phylomorphospace, describing morphological variation across species in correlation with their phylogenetic relationships (Sidlauskas, 2008). We built a “phylochemospace” describing variation in concentration of multiple compounds with a principal component analysis (PCA), superimposing the phylogenetic relationships among subspecies. The resulting PCA visualises the variation in CGs actually occurring in the 55 subspecies. Packages *FactoMineR* 1.41 (Lê *et al.*, 2008), *missMDA* 1.14 (Josse & Husson, 2016), and *phytools* 0.6-44 (Revell, 2012) were used.

iv) Variation among co-mimetic subspecies and host-plant specialization

We tested for differences between groups: mimicry ring, geographical range and host-plant specialization. We used MANOVA and ANOVA to assess differences in CG profile and CG total concentrations respectively, both at species ($n = 33$) and subspecies ($n = 55$) level. We applied Bonferroni correction as we performed several tests on the same dataset. We used *stats* 3.4.2 for MANOVA and *RVAideMemoire* 0.9-72 package (Hervé, 2019) for associated post-hoc test. ANOVA, associated post-hoc test and Bonferroni correction were computed with *stats* 3.4.2 package as well.

To assess whether the observed statistically significant differences were due to shared ancestry, we computed phylogenetic MANOVA and ANOVA, using *geiger* 2.0.6 (Harmon *et al.*, 2008) and *phytools* 0.6-44 packages (Revell, 2012) respectively. Phylogenetic MANOVA and ANOVA were performed using the modified tree and mean CG concentrations per subspecies (as these phylogenetical tests do not handle multiple value for one subspecies, we used mean concentrations).

We investigated variation in total CG concentration, synthesized CG concentration and sequestered CG concentration between generalist and specialist subspecies. When considering the entire range of a given species across Central and South America it turns out it can have a lot of host-plant species. For instance, *Agraulis vanilla* has 50 reported host-plants and *Heliconius numata* 30 (Kozak, 2016). We conducted our analysis at the subspecies level because locally subspecies actually use much less host-plants. In this studied, generalist are subspecies that feed on more than 5 host-plant species whereas specialist subspecies feed on 5 or less host-plant species. We adjusted this classification based on the literature.

RESULTS

Large variations in the concentration of neo-synthesized and sequestered cyanogenic glucosides in the Heliconiini clade

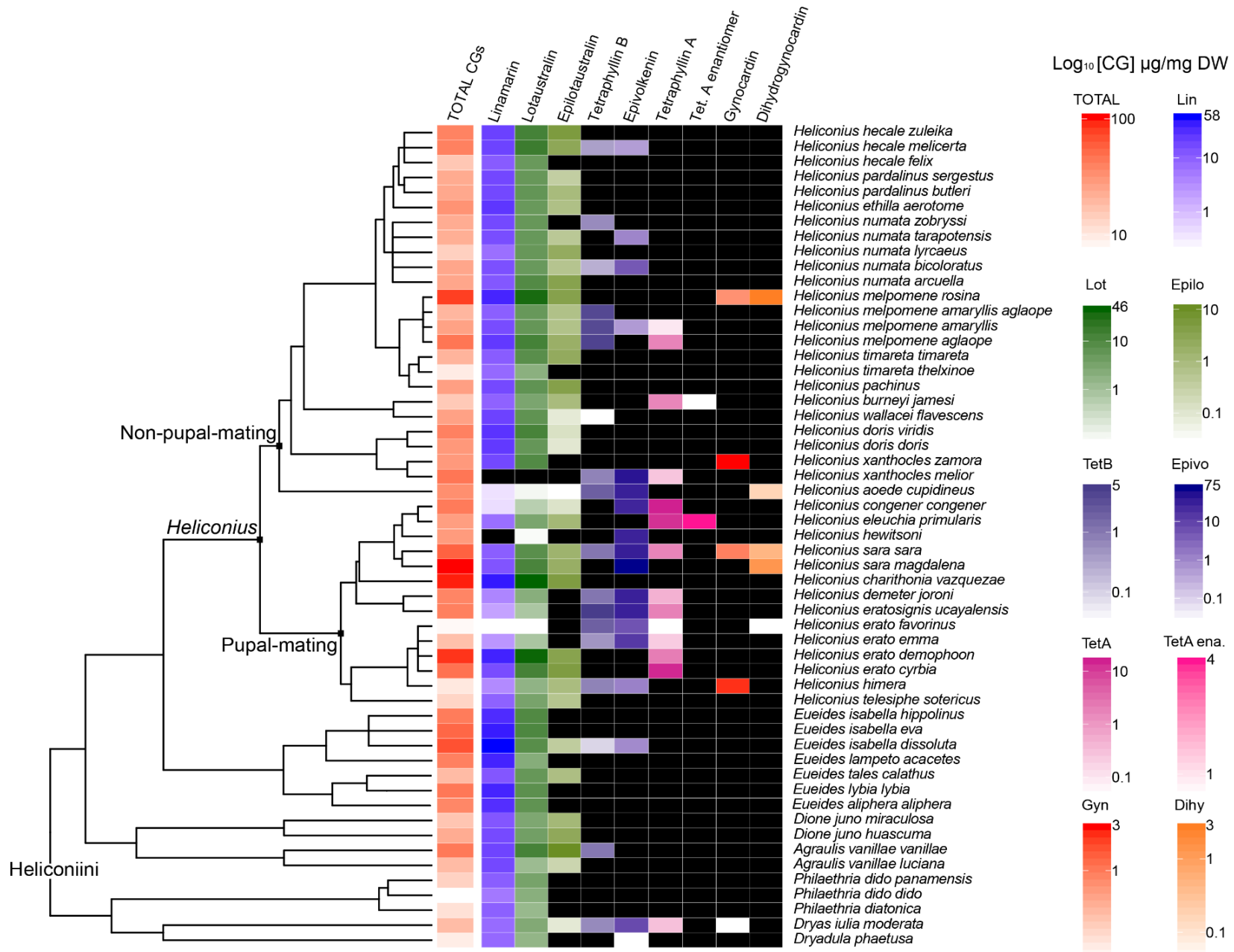
Nine CGs were detected across species, but the identity and number of compounds largely varied between genera and species. Important variations in both the total and each defensive compound concentrations were also detected within species, notably among different subspecies (ANOVA, F_{303}^{49} , 5.60, $p < 0.001$; MANOVA, F_{303}^{49} , 3.51, $p < 0.001$).

Regarding *de novo* synthesized aliphatic CGs, linamarin and lotaustralin were detected in all 55 subspecies, except in *H. xanthocles melior* and *H. hewitsoni* where only lotaustralin traces were observed in one out of the three individuals sampled (Fig. 23). However, the concentration of linamarin was significantly different between species (ANOVA, F_{342}^{32} , 13.77, $p < 0.001$), from the lowest in *H. aoede* (mean [linamarin] = 0.40 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) and *H. congener* (0.45 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) to the highest in *H. charithonia* (45.2 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) and *Eueides isabella* (54.2 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$). *Eueides* had statistically significant higher linamarin concentration compared to other genera (ANOVA, F_{368}^6 , 35.46, $p < 0.001$; Tukey's HSD, $p < 0.001$). Similarly, lotaustralin concentrations differed among species (ANOVA, F_{342}^{32} , 4.324, $p < 0.001$). The concentration was exceedingly high in *H. charithonia* (mean [lotaustralin] = 45.8 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$; Tukey's HSD, $p < 0.001$). In comparison, *H. hecale* had the second highest lotaustralin concentration with 13.7 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$, *i.e.* three times less than *H. charithonia*. Another aliphatic CG with concentration varying strongly among species was epilotaustralin (ANOVA, F_{342}^{32} , 2.618, $p < 0.001$), from 0.03 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ the minimum mean concentration reported in *H. aoede* to 4.91 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ the maximal mean concentration in *H. charithonia*. It has not been previously reported in Heliconiini (de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019), but was detected by us in *Heliconius*, *Eueides*, *Dione*, *Agraulis* and *Dryas* genera. All three putatively-synthesised CGs were found at the highest levels in *H. charithonia*, which also did not contain any sequestered CGs in the two analysed individuals.

Six CGs putatively sequestered from *Passiflora* hostplants were measured: tetraphyllin B was observed in *Agraulis*, *Dryas*, *Eueides* and *Heliconius*, but the concentration, from 0.03 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ in *H. wallacei* to 5.51 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$ in *H. eratosignis*, did not significantly differ between species (ANOVA, F_{342}^{32} , 0.908, $p = 0.614$). However, a diastereoisomer of tetraphyllin B called

epivolkenin was detected in *Heliconius*, *Eueides* and *Dryadula*, varying in concentration across species (ANOVA, F_{342}^{32} , 8.489, $p < 0.001$), with lowest mean in *Dryadula phaetusa* with 0.03 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW and highest in *H. sara* with 38.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW. Tetraphyllin A had a range of 0.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW in *H. xanthocles* to 15.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW in *H. congener* and was observed outside of *Heliconius* for the first time, in *Dryas iulia* (in $n = 3$ out of 38 individuals). This sequestered CG significantly differed in concentration among species (ANOVA, F_{342}^{32} , 1.958, $p = 0.002$). An enantiomer of tetraphyllin A, was detected in all samples of *H. burneyi* (0.77 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) and *H. eleuchia* (4.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) at distinct concentrations (ANOVA, F_{342}^{32} , 117.3, $p < 0.001$). Gynocardin (from 0.09 in *H. melpomene* to 2.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW in *H. himera*) and dihydrogynocardin (from 0.03 in *H. erato* to 0.56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW in *H. sara*) were occasionally observed in some individuals, mostly in *Heliconius* species, but also in two out of 38 individuals of *Dryas iulia* (in $n = 2$ out of 38 individuals). Of the two, only gynocardin varied in concentration (ANOVA, F_{342}^{32} , 1.535, $p = 0.035$). We also searched for the aromatic CGs amygdalin as it has been measured in few analysed *Passiflora* species (Chassagne *et al.*, 1996; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). As the previous work, we did not find aromatic CGs in heliconiine butterflies. Our study on wild butterflies shows that sequestration ability is widely but unequally distributed among the Heliconiini tribe, indeed different species obtain different CGs from their larval host-plant.

Figure 23: Qualitative and quantitative variations for the nine studied cyanogenic glucosides across Heliconiini subspecies. Phylogenetic tree is adapted from (Kozak et al., 2015). The left column represents the total CG mean concentration (n = 375 individuals in 55 subspecies). Following column presents the average of each CG concentration. Concentrations are in μg of CG per mg of dried weigh (body + wings) in a logarithmic scale. A black box signifies either the absence of the CG or insufficient data for measurement. A coloured filled box indicates that the corresponding CG has been reported in at least one individual of the species. Colour gradient is from white corresponding to the minimum reported concentration to the darkest colour corresponding to the maximal reported concentration.



Evolution of cyanogenic glucoside profiles in Heliconiini

Concentration of CGs in Heliconiini species ($n = 33$) displayed a weak but significant phylogenetic signal ($K_{mult} = 0.311$, $p = 0.023$). In *Heliconius*, the largest genus in the Heliconiini radiation, phenotypic races of the same species often belong to different mimicry rings, therefore we estimated the phylogenetic signal separately at the taxonomic level of subspecies ($n = 55$), where the phylogenetic signal of mean CG concentrations was weaker and non-significant ($K_{mult} = 0.084$, $p = 0.055$), probably because of important variation within species.

For the genus *Heliconius* alone ($n = 22$ species), the phylogenetic signal was moderate ($K_{mult} = 0.558$, $p = 0.029$). *Heliconius* genus is divided in two clades: there was a strong phylogenetic signal within the pupal-mating (males perform a characteristic sexual behaviour where they mate with the female as it emerges, $K_{mult} = 0.903$, $p = 0.027$) and non-pupal-mating ($K_{mult} = 0.821$, $p = 0.028$) clades at the species level only ($n = 10$ and $n = 12$ respectively). Species from the pupal-mating clade ($n = 106$ individuals, total mean [CGs] = 38.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) and the non-pupal-mating clade ($n = 165$ individuals, total mean [CGs] = 29.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) had statistically different mean of CG concentrations (ANOVA, F^1_{269} , 6.261, $p = 0.013$), and different profiles (MANOVA, F^1_{269} , 0.304, $p < 0.001$). Phylogenetic signal is lost at the subspecies level in *Heliconius* ($n = 39$ subspecies, $K_{mult} = 0.123$, $p = 0.208$), both in the pupal-mating clade ($n = 14$ subspecies, $K_{mult} = 0.300$, $p = 0.353$) and in the non-pupal-mating clade ($n = 25$ subspecies, $K_{mult} = 0.082$, $p = 0.522$), suggesting that closely related species had similar profiles but that a lot of intraspecific variation exist.

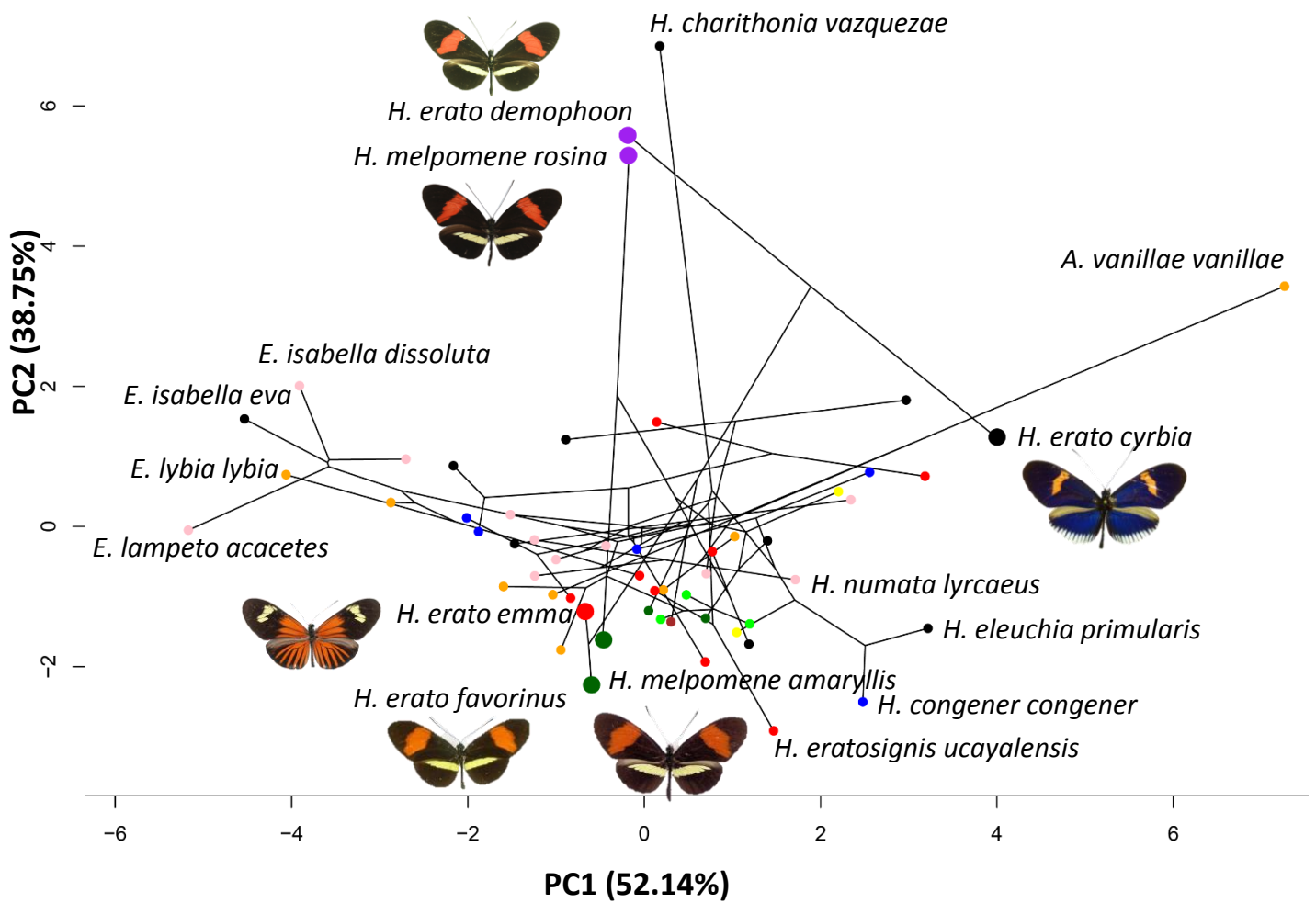
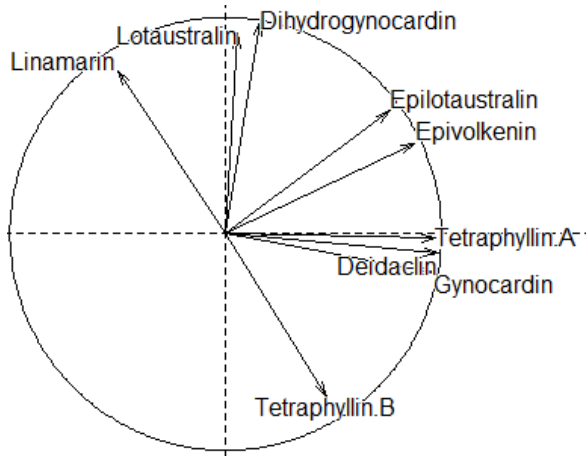
Ecological factors influencing the evolution of cyanogenic glucoside profiles in Heliconiini

Since evolutionary history only partly explains the observed chemical defence variation within Heliconiini, we investigated the effect of ecological factors, such as involvement in different mimicry rings and interaction with host-plants (for details of host-plant specialization and mimicry rings information see Sup. 6 and Sup. 7). The phylochemospace displays the variation in average chemical profile of the different subspecies and does not reveal a strong similarity of taxa belonging to the same mimicry ring (Fig. 24). Within species, we observed that subspecies belonging to distinct mimicry rings also had very distinct chemical profiles, e. g. *H.*

erato favorinus ($n = 31$), *H. erato emma* ($n = 5$), *H. erato demophoon* ($n = 3$) and *H. erato cyrbia* ($n = 1$) (MANOVA, F^3_{36} , 2.240, $p < 0.001$). Nevertheless, the distantly related co-mimics *H. melpomene rosina* ($n = 4$) and *H. erato demophoon* ($n = 3$) appeared close in the phylochemospace, and had statistically similar CG profile (MANOVA, F^1_5 , 0.802, $p = 0.683$). Despite, the proximity of *H. melpomene amaryllis* ($n = 21$) and *H. erato favorinus* ($n = 31$) in the phylochemospace, they had statistically different CG profile (MANOVA, F^1_{50} , 0.760, $p < 0.001$). *H. m. amaryllis* had a higher total CG concentration, (25.9 $\mu\text{g}/\text{DW}$ mg) than *H. e. favorinus* (7.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) (ANOVA, F^1_{50} , 43.84, $p < 0.001$) and contained more *de novo* synthesised compounds linamarin, lotaustralin and epilotaustralin (MANOVA, F^1_{50} , 0.726, $p < 0.001$). No difference was detected for the sequestered CGs (MANOVA, F^1_{50} , 0.164, $p = 0.073$).

According to the mimicry ring they belonged, individuals had both distinct chemical profile and total concentration of CGs (Tab. 2 and Fig. 25). For instance, chemical profiles of *Agraulis vanillae vanillae* ($n = 2$) collected in Panama differed strikingly from those of *A. vanilla luciana* ($n = 4$) collected in Peru (MANOVA, F^1_4 , 0.999, $p = 0.039$). While regular MANOVA on mimicry pattern and host-plant specialization were significant (Tab. 2), phylogenetic MANOVA for the same groups were not (Tab. 2), meaning that differences in CG profile between subspecies for the mimicry pattern and host-plant specialization were caused by phylogenetic relationships.

Regarding total CG content, subspecies relatedness also explained the variation observed between mimicry rings (Tab. 2). Host-plant specialisation effect was not significant at the subspecies level with and without correction for subspecies relatedness (Tab. 2). Nevertheless, individuals from host-plant-specialist subspecies were more chemically defended (mean total [CGs] = 39.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) than generalist (26.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW; Tab. 2, Sup. 8). In accordance with our hypothesis, we found that specialist subspecies sequestered more CGs (19.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) than generalist subspecies (3.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW; ANOVA, F^1_{373} , 53.01, $p < 0.001$). By contrast, both generalist and specialist subspecies produced similar concentrations of CGs (mean synthesized [CGs] in generalist = 22.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW, in specialist = 20.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW, ANOVA, F^1_{373} , 1.313, $p = 0.253$).



Mimicry ring

- Blue
 - Green
 - Postman Panama
 - Postman Reverse
 - Tiger
- Dennis ray
 - Orange
 - Postman Ecuador/Peru
 - Rayed yellow
 - Other

Figure 24: Phylochemospace depicting the relationships between phylogenetic history and the mean CG concentration in Heliconiini subspecies. Visualization in 2 dimensions of the distribution of the variation in CG profiles. Dark line represents the phylogenetic tree modified from Kozak et al., (2015) to plot subspecies used in our analyses (n = 55 subspecies). Dots are mean imputed CG profile per subspecies. Colour indicates the mimicry ring subspecies belong to (Sup. 7). *Heliconius erato* subspecies from distinct mimicry rings also differ in their mean chemical profiles (*H. e. cyrbia* in the “Other” mimicry ring from Ecuador, *H. e. emma* from Dennis-ray ring from Peru, *H. e. favorinus* from Postman ring from Peru and *H. e. demophoon* from Postman ring from Panama). *H. erato* and *H. melpomene* subspecies have increased size dot and are illustrated by a photo.

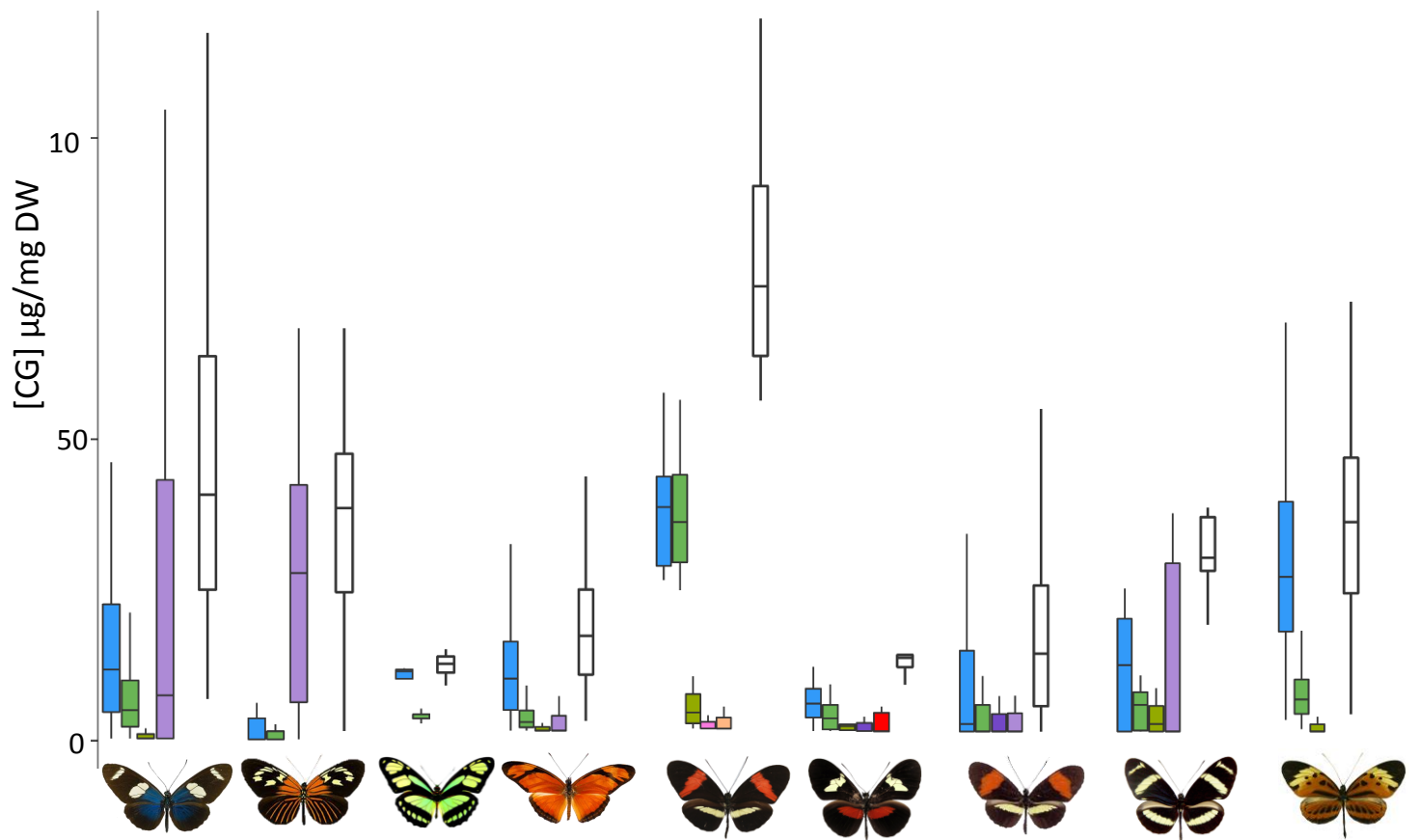
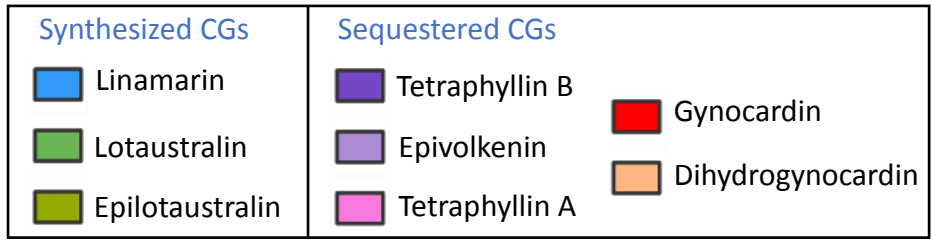


Figure 25: Chemical profile of individuals from the nine studied mimicry rings. CG concentrations are given in $\mu\text{g}/\text{mg DW}$. Mimicry rings from left to right, with illustrations of the colour pattern: blue (6 subspecies, $n = 66$ individuals), Dennis ray (10 subspecies, $n = 39$), green (3 subspecies, $n = 4$), orange (8 subspecies, $n = 73$), postman Panama (2 subspecies, $n = 7$), postman reverse (2 subspecies, $n = 6$), postman Ecuador/Peru (5 subspecies, $n = 57$), rayed yellow (2 subspecies, $n = 7$), tiger (11 subspecies, $n = 78$). White boxplots are total CG concentration.

Profile of CGs	Regular	Phylogenetic
MANOVA on mean per subspecies (n = 55)		
Mimicry ring	$F^9_{36}, 2.736, p < 0.001$	$F^9_{36}, 2.736, p = 0.582$
Host-plant specialization	$F^1_{53}, 0.446, p < 0.001$	$F^1_{53}, 0.446, p = 1.000$
MANOVA on inter-individual variation (n = 375)		
Mimicry ring	$F^{10}_{364}, 1.209, p < 0.001$	-
Host-plant specialization	$F^1_{373}, 0.165, p < 0.001$	-
Total CG concentration	Regular	Phylogenetic
ANOVA on mean per subspecies (n = 55)		
Mimicry ring	$F^9_{36}, 4.75, p < 0.001$	$F, 4.745, p = 0.324$
Host-plant specialization	$F^1_{53}, 0.518, p = 0.950$	$F, 0.517, p = 1.000$
ANOVA on inter-individual variation (n = 375)		
Mimicry ring	$F^{10}_{364}, 12.11, p < 0.001$	-
Host-plant specialization	$F^1_{373}, 18.90, p < 0.001$	-

Table 2: Comparisons of CG profile (MANOVA) and total concentration (ANOVA) between and among mimicry rings and host-plant specialization levels. To compare the effect of mimicry rings and host-plant specialization on CG profiles and total CG concentrations with phylogenetic effect, we performed a MANOVA and ANOVA (respectively) using the mean concentration per subspecies (n = 55 subspecies). Then MANOVA and ANOVA were performed on CG profiles and total CG concentrations using the whole dataset to test for inter-individual variation (n = 375 individuals), without testing the effect of phylogeny.

Members of a mimicry ring are not equally defended

In general, variation in CGs was lower within than between mimicry rings (Tab. 2, Sup. 9). Nevertheless, some co-mimetic subspecies had different profiles of CGs and also different total concentration of CGs, as in the blue (6 subspecies, $n = 66$ individuals, MANOVA F^5_{60} , 0.951, $p = 0.009$; ANOVA F^5_{60} , 3.336, $p = 0.010$), orange (8 subspecies, $n = 73$, MANOVA F^6_{58} , 1.256; $p < 0.001$, ANOVA F^6_{58} , 3.292 $p = 0.007$) postman Ecuador/Peru (5 subspecies, $n = 57$, MANOVA F^4_{52} , 0.849, $p = 0.007$; ANOVA F^4_{52} , 11.540, $p < 0.001$), postman reverse (2 subspecies, $n = 6$, ANOVA F^1_4 , 13.870; $p = 0.020$) and tiger (11 subspecies, $n = 78$, MANOVA F^{10}_{67} , 1.245; $p < 0.001$, ANOVA F^{10}_{67} , 5.321, $p < 0.001$) rings. Thus, co-mimetic subspecies were not necessarily equally defended. However, in the Dennis ray (10 subspecies, $n = 39$, MANOVA F^9_{29} , 3.644, $p < 0.001$; ANOVA F^9_{29} , 1.318, $p = 0.271$) and rayed yellow (2 subspecies, $n = 7$, MANOVA F^1_5 , 0.978, $p = 0.043$; ANOVA F^1_5 , 0.100, $p = 0.765$) mimicry rings, subspecies had different profile of CGs but a similar total concentration. We also report some cases where subspecies had statistically similar profile and total concentration of CGs, within the green (3 subspecies, $n = 4$, MANOVA F^1_2 , 0.885; $p = 0.340$, ANOVA F^1_2 , 0.038, $p = 0.863$) and postman Panama (2 subspecies, $n = 7$, MANOVA F^1_5 , 0.802, $p = 0.683$; ANOVA F^1_5 , 0.111, $p = 0.753$) mimicry rings.

DISCUSSION

Phylogenetic history partly explains the distribution of cyanogenic glucosides across Heliconiini species

We observed that mimicry rings had different levels of CG profile and total concentration, but these differences are mostly driven by phylogenetic relatedness among mimetic species. Generally, species are closely-related within mimicry rings with similar CG profiles, likely shaped by evolutionary history rather than selection exerted by predators. Observed variations among species in CG concentrations are related with phylogenetic relationships, suggesting that drift over time following divergence between species partly explains the variation in CG chemical profiles. Our results in wild-caught individuals are consistent with the significant phylogenetic signal in CG profile observed in captive-bred Heliconiini (de Castro, Zagobelny, *et al.*, 2019). Nevertheless, the phylogenetic signal associated with CG profile is stronger when considering species rather than subspecies, suggesting that despite a strong effect of the divergence between clades (ancient node), substantial variation within species are observed in our wild-caught individuals. In *Heliconius* the phylogenetic signal at the genus level was weaker than when calculated within the pupal-mating and non-pupal-mating clades independently. This suggests that CG profiles have mainly diverged between these two clades and are quite variable within these two clades, probably because of substantial variations in the ecology of the different species composing these two clades.

Geographic variation in mimicry rings impacts CG profiles

The important variation in CG profile observed within species is mostly explained by variations between subspecies living in different geographic range. For instance, Panamanian subspecies of *A. vanillae* and *H. erato* were more chemically defended than Southern subspecies of the same two species. Subspecies generally differ in wing colour pattern and geographic distribution, pointing at the influence of ecological factors in shaping the variation in CG concentration profile in Heliconiini. Although *Heliconius* species from the pupal-mating and non-pupal-mating clades are phylogenetically distant, they can be involved in the same mimicry ring. This is the case for *H. erato demophoon* and *H. melpomene rosina*, which are part of the postman Panama mimicry ring and presented similar CG profiles, suggesting either an effect of the mimetic interactions and/or of the similarity in local host-plants chemistry. By

sampling wild butterflies from different countries, our study highlights that host-plant interaction and geography are important ecological factors shaping variations in chemical defences within species.

How host-plant specialisation shapes chemical defences

Indeed, host-plant range and preference vary locally in some species (Smiley, 1978), so that variation in sequestered CGs in butterflies probably reflects host-plant availability and use across sampled localities. For example, *H. melpomene* has a wider range of host-plant species in its eastern distribution area. In Central America it feeds on *P. menispermifolia* or *P. oerstedii* depending on the localities but feeds preferentially on *P. platyloba* in Peru, (Billington *et al.*, 1990; Jiggins, 2016). This emphasizes the plasticity in the host-plant range of many Heliconiini species and the importance of local adaptation with *Passiflora* species. Local patterns in host-plant use by Heliconiini is likely reflected in their CG profile.

The binary generalist/specialist classification used here is a rough simplification of the host-plant specialization spectrum. Nevertheless, we still observed, as expected, that specialist subspecies had higher concentrations of sequestered CGs (Engler & Gilbert, 2007; Jiggins, 2016). However, we did not detect any correlation between the level of host-plant specialization and the synthesis/sequestration balance, contrary to previous studies where synthesis and sequestration were shown to be negatively correlated traits, with fluctuant intensity across the phylogeny (Engler & Gilbert, 2007; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019).

As CGs are *Passiflora* secondary metabolites, their production may vary in space, time and across tissues depending on abiotic and biotic conditions exert on plant. Thus, reported sequestered CGs in our study on wild butterflies are potentially a subset of the CGs contained in locally-available *Passiflora* host-plants. The evolution of Heliconiini chemical defence profile would thus be shaped by both host-plant specialization of the different butterfly species and available *Passiflora* host-plants variations across the geographical areas.

Variable CG profiles within mimicry rings and Müllerian mimicry

Variation in CG concentrations between mimicry rings observed here had already been reported in a study based on colorimetric assays (to investigate total CG concentration per individual regardless of each CG identity) (Arias, Meichanetzoglou, *et al.*, 2016). This effect of

mimicry on the individuals belonging to different co-occurring mimicry rings are thus not necessarily equally defended, and potentially perceived with different degrees of aversion by predators. Recently, an experiment using domestic chicks shows that beyond a certain CG concentration, birds learned to avoid the prey at a similar speed (Chouteau *et al.*, 2019). Variations in the level of CGs observed within and among mimicry rings might thus not directly translate into variation in learning behaviour by predators, so that the evolution of high chemical defence in some Heliconiini would not necessarily be promoted by natural selection exerted by predators in mimetic prey. Furthermore, it is currently unknown whether predator rejection behaviour depends on the total concentration of CG or is mostly shaped by the presence of key CGs with a particularly repellent taste. Chemical defences are also a complex cocktail (Speed *et al.*, 2012) with components acting through synergetic or antagonist effects.

Predator communities and strength in predation pressure acting on aposematic prey vary in space and time, as demonstrated in the field using artificial poison frogs and caterpillars (Chouteau & Angers, 2011; Mappes *et al.*, 2014). Predator sensibility to detect bitterness of CGs and to endure unpleasant taste vary (Li & Zhang, 2014), as well as their tolerance towards cyanide (Cardoso, 2019). Indeed, based on how hungry they are, avian predators may decide to feed on unpalatable butterflies (Marshall, 1908; Chai, 1986b). The geographic variation in chemical profile detected here might therefore be influenced by both host-plant availability and composition of predator communities. But the strong phylogenetic signal detected on CG profiles, and the high sensitivity of predator to CG suggests that the evolution of elevated levels of chemical defence is not directly related to colour pattern evolution.

CONCLUSIONS

Our study sheds light on the evolution of CGs in Heliconiini butterflies, and highlights the strong effect of evolutionary history in the variation of CG profile observed between species. Variation in CG profiles between mimicry rings seems to be mostly driven by phylogenetic relatedness between mimetic species. Nevertheless, the strong variation observed between individuals belonging to different mimicry rings within species suggests that other ecological factors might be at play. Some species seem to rely on neo-synthesis only, whereas other species mostly perform CG sequestration from *Passiflora* host-plants. Many species rely on a combination of these two pathways for CG acquisition, which contributes to substantial variation of chemical profiles both between species and among species. Geographic variation in host-plants, but also abundance of mimicry rings could also influence the CG profile: the individual predation risk is indeed lower in abundant mimicry rings as compared to rare ones (Chouteau *et al.*, 2016), so that selection for higher distastefulness might be higher in localities where a given mimicry ring is at low density.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

The study was conceived by VL, BN, OS and ME. Specimens were collected by OS, KMK and VL. SB welcomed OS at the Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Denmark, so she could perform the chemical analyses with help from EC. Statistical analyses were done by OS. OS wrote the manuscript with contributions from all authors. All authors participated in constructive discussions and approved manuscript final version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche under the LabEx ANR-10-LABX-0003-BCDiv, in the program “Investissements d’avenir” number ANR-11-IDEX-0004-02 attributed to OS and Paris city council grant *Emergence* to VL. EC would like to thank Professor Chris Jiggins for the financial support through the European Research Council grant number 339873 (Acronym: SpeciationGenetics) and the Marie Curie Actions for her fellowship (Acronym: Cyanide Evolution).

We would like to thank Gerardo Lamas from the Natural History Museum of Lima (Peru) and Peruvian authorities (Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre) for delivering research and export permits (Research permit number: RDG 0373-2017-SERFOR-DGGSPFFS). We acknowledge the collecting permits issued by the Ministry of the Environment of Ecuador (MAE-DNB-CM-2016-0045), the Ministry of the Environment of Panama (SE/AP-11-17) and Brazil (TBC). Collection of new Brazilian samples was made under SISBIO licence 59194-1. The export of new material from Brazil was made through the Federal University of Pará under general approval for export of biological material by the Council for Management of Genetic Patrimony (*Conselho de Gestão de Patrimônio Genético*), Deliberation No. 19 of the 19th March, 2003, in reference to process number 02018.005329/02-10(73), along with the specific documentation required by that approval for each individual exportation event.

OS wishes to thank Melanie McClure, Mathieu Chouteau, Marion Cau, Mario Tuanama and Ronald Mori-Pezo for precious support on the field. OS thanks David Ian Pattison for technical assistance with LC-MS/MS, and Charline Pinna, Camille Le Roy and Léa Terray for help on R coding. We thank Lawrence E. Gilbert and Neil Rosser for their expertise on Heliconiini host-plant specialization. We thank Richard Merrill for inspiring discussions about unpalatably variation across localities.

DATA ACCESSIBILITY







Raw data file describing each compound and concentration per individual will be uploaded on Dryad once the manuscript is accepted.




SUPPLEMENTARY MATERIAL

Genre	Species	subspecies	Female	Male	TOTAL	Country	Specialization
<i>Agraulis</i>	<i>vanillae</i>	<i>luciana</i>	1	3	4	Peru	Generalist
<i>Agraulis</i>	<i>vanillae</i>	<i>vanillae</i>	1	1	2	Panama	Generalist
<i>Dione</i>	<i>juno</i>	<i>huascuma</i>	1	2	3	Panama	Generalist
<i>Dione</i>	<i>juno</i>	<i>miraculosa</i>	5	8	13	Peru	Generalist
<i>Dryadula</i>	<i>phaetusa</i>	NA	2	6	8	Peru/Ecuador	Generalist
<i>Dryas</i>	<i>iulia</i>	<i>moderata</i>	14	24	38	Peru/Panama/Brazil	Generalist
<i>Eueides</i>	<i>isabella</i>	<i>dissoluta</i>	8	11	19	Peru	Generalist
<i>Eueides</i>	<i>isabella</i>	<i>eva</i>	0	3	3	Panama	Generalist
<i>Eueides</i>	<i>isabella</i>	<i>hippolinus</i>	0	2	2	Peru	Generalist
<i>Eueides</i>	<i>lampeto</i>	<i>acacetes</i>	1	1	2	Peru	Generalist
<i>Eueides</i>	<i>aliphera</i>	<i>aliphera</i>	1	0	1	Brazil	Generalist
<i>Eueides</i>	<i>lybia</i>	<i>lybia</i>	0	4	4	Brazil	Generalist
<i>Eueides</i>	<i>tales</i>	<i>calathus</i>	0	1	1	Ecuador	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>aoede</i>	<i>cupidineus</i>	9	13	22	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>burneyi</i>	<i>jamesi</i>	0	1	1	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>charithonia</i>	<i>vazquezae</i>	0	2	2	Panama	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>congener</i>	<i>congener</i>	0	3	3	Ecuador	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>demeter</i>	<i>joroni</i>	2	0	2	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>doris</i>	<i>doris</i>	3	5	8	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>doris</i>	<i>viridis</i>	2	2	4	Panama	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>eleuchia</i>	<i>primularis</i>	0	2	2	Ecuador	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>erato</i>	<i>cyrbia</i>	0	1	1	Ecuador	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>erato</i>	<i>demophoon</i>	2	1	3	Panama	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>erato</i>	<i>emma</i>	1	4	5	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>erato</i>	<i>favorinus</i>	11	20	31	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>eratosignis</i>	<i>ucayalensis</i>	0	3	3	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>ethilla</i>	<i>aerotome</i>	5	16	21	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>hecale</i>	<i>felix</i>	0	2	2	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>hecale</i>	<i>melicerta</i>	2	4	6	Panama	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>hecale</i>	<i>zuleika</i>	0	1	1	Panama	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>hewitsoni</i>	NA	0	3	3	Panama	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>himera</i>	NA	2	3	5	Ecuador	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>melpomene</i>	<i>aglaope</i>	1	0	1	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>melpomene</i>	<i>amaryllis</i>	5	16	21	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>melpomene</i>	<i>amaryllis*aglaope</i>	1	2	3	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>melpomene</i>	<i>rosina</i>	1	3	4	Panama	Specialist

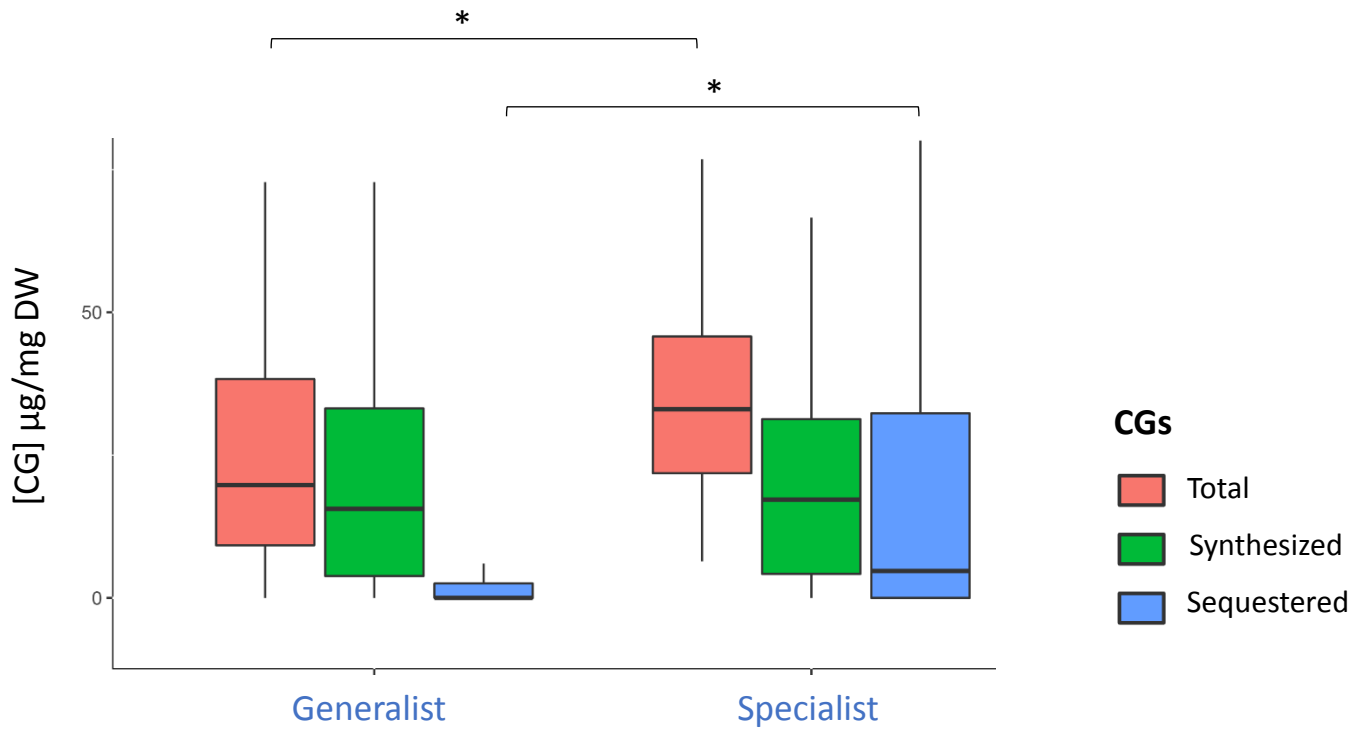
Genre	Species	subspecies	Female	Male	TOTAL	Country	Specialization
<i>Heliconius</i>	<i>numata</i>	<i>arcuella</i>	2	0	2	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>numata</i>	<i>bicoloratus</i>	4	15	19	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>numata</i>	<i>lyrcaeus</i>	1	0	1	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>numata</i>	<i>tarapotensis</i>	2	10	12	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>numata</i>	<i>zobryssi</i>	0	1	1	Brazil	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>pachinus</i>	NA	2	2	4	Panama	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>pardalinus</i>	<i>butleri</i>	1	1	2	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>pardalinus</i>	<i>sergestus</i>	3	11	14	Peru	Generalist
<i>Heliconius</i>	<i>sara</i>	<i>magdalena</i>	2	3	5	Panama	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>sara</i>	<i>sara</i>	16	22	38	Peru/Ecuador/Brazil	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>telesiphe</i>	<i>sotericus</i>	0	3	3	Ecuador	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>timareta</i>	<i>thelxinoe</i>	0	1	1	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>timareta</i>	<i>timareta</i>	0	2	2	Ecuador	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>wallacei</i>	<i>flavescens</i>	2	8	10	Peru/Brazil	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>xanthocles</i>	<i>melior</i>	0	1	1	Peru	Specialist
<i>Heliconius</i>	<i>xanthocles</i>	<i>zamora</i>	2	0	2	Ecuador	Specialist
<i>Philaethria</i>	<i>diatonica</i>	NA	0	2	2	Peru	Generalist
<i>Philaethria</i>	<i>dido</i>	<i>dido</i>	0	1	1	Peru	Generalist
<i>Philaethria</i>	<i>dido</i>	<i>panamensis</i>	1	0	1	Panama	Generalist

Supporting information 6: Detailed list of sampled butterfly subspecies (n = 375 individuals), with number of females (n = 119) and males (n = 256) as well as provenance country (Brazil, Ecuador, Panama or Peru). Some species do not have subspecies name so it was "NA" assigned. Right column "Specialization" indicates whether subspecies are generalists (feed on wide panel of Passiflora plants) or specialists (feed on a restricted range of Passiflora plants).

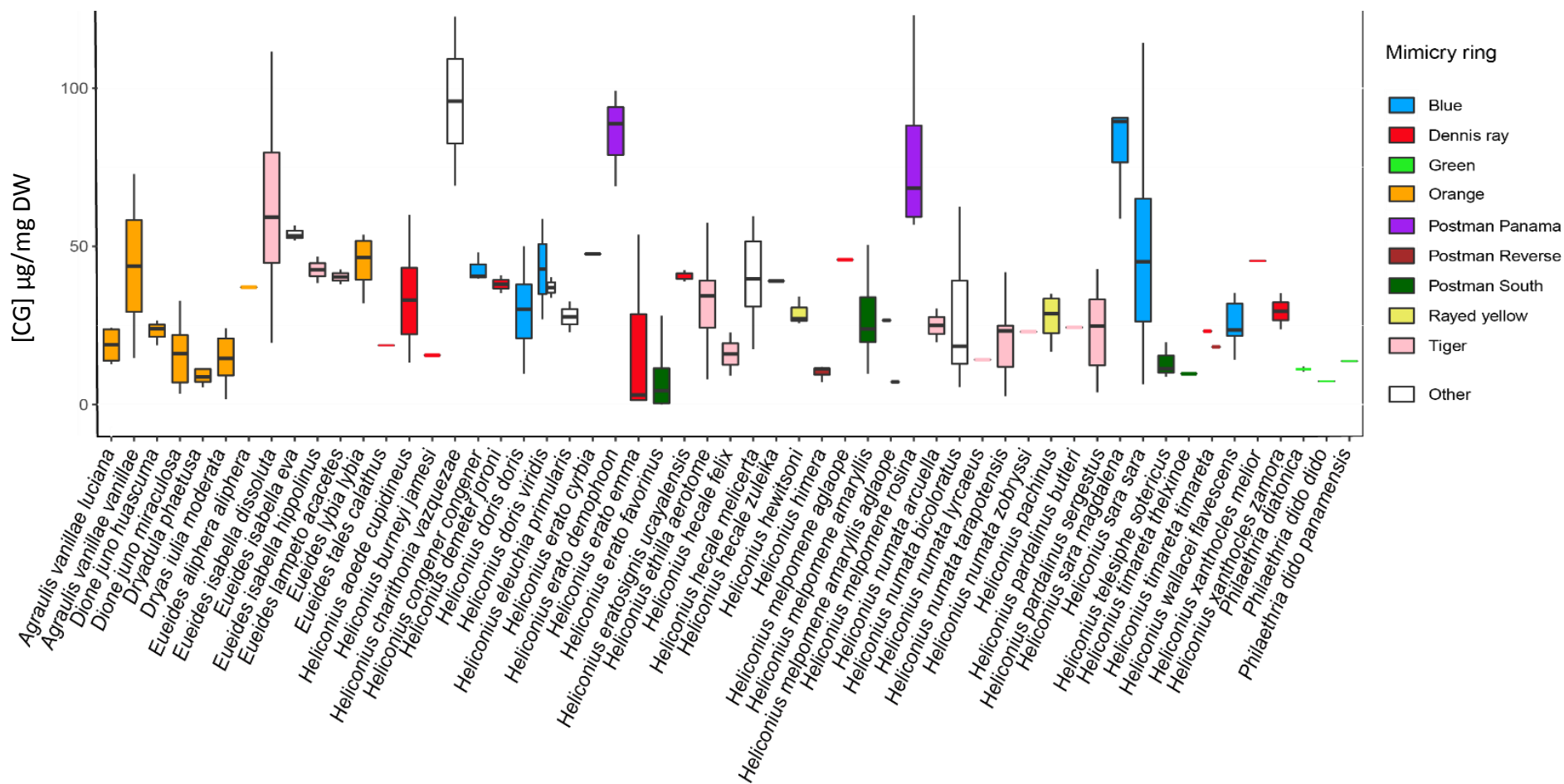
Mimicry ring	Subspecies
<p>Blue</p> 	<p><i>Heliconius congener congener</i> <i>Heliconius doris doris</i> <i>Heliconius doris viridis</i> (blue morph) <i>Heliconius sara magdalena</i> <i>Heliconius sara sara</i> <i>Heliconius wallacei flavescens</i></p>
<p>Dennis ray</p> 	<p><i>Eueides tales calathus</i> <i>Heliconius aoede cupidineus</i> <i>Heliconius burneyi jamesi</i> <i>Heliconius demeter joroni</i> <i>Heliconius erato emma</i> <i>Heliconius eratosignis ucayalensis</i> <i>Heliconius melpomene aglaope</i> <i>Heliconius timareta timareta</i> <i>Heliconius xanthocles melior</i> <i>Heliconius xanthocles zamora</i></p>
<p>Green</p> 	<p><i>Philaethria diatonica</i> <i>Philaethria dido dido</i> <i>Philaethria dido panamensis</i></p>
<p>Orange</p> 	<p><i>Agraulis vanillae luciana</i> <i>Agraulis vanillae vanillae</i> <i>Dione juno huascuma</i> <i>Dione juno miraculosa</i> <i>Dryadula phaetusa</i> <i>Dryas iulia moderata</i> <i>Eueides aliphera aliphera</i> <i>Eueides lybia lybia</i></p>
<p>Postman Panama</p> 	<p><i>Heliconius erato demopoon</i> <i>Heliconius melpomene rosina</i></p>
<p>Postman Ecuador/Peru</p> 	<p><i>Heliconius erato favorinus</i> <i>Heliconius melpomene amaryllis X glaope</i> <i>Heliconius telesiphe sotericus</i> <i>Heliconius timareta thelxinoe</i></p>

Mimicry ring	Subspecies (continued)
Postman reverse 	<i>Heliconius himera</i> <i>Heliconius timareta timareta</i>
Rayed yellow 	<i>Heliconius hewitsoni</i> <i>Heliconius pachinus</i>
Tiger 	<i>Eueides isabella dissoluta</i> <i>Eueides isabella hippolinus</i> <i>Eueides lampeto acacetes</i> <i>Heliconius ethilla aerotome</i> <i>Heliconius hecale felix</i> <i>Heliconius numata arcuella</i> <i>Heliconius numata lyrcaeus</i> <i>Heliconius numata tarapotensis</i> <i>Heliconius numata zobryssi</i> <i>Heliconius pardalinus butleri</i> <i>Heliconius pardalinus sergestus</i>
Other	<i>Heliconius melpomene amaryllis X glaope</i> <i>Eueides isabella eva</i> <i>Heliconius charithonia vazquezae</i> <i>Heliconius doris viridis</i> (red morph) <i>Heliconius eleuchia primularis</i> <i>Heliconius erato cyrbia</i> <i>Heliconius hecale melicerta</i> <i>Heliconius hecale zuleika</i> <i>Heliconius numata bicoloratus</i>

Supporting information 7: Subspecies are divided in nine mimicry rings. Geographically isolated, phenotypically unique and hybrid individuals were assigned to "Other". Subspecies belonging to the same mimicry ring share a given colour pattern within the same locality. Mimicry rings and subspecies within are listed in alphabetical order.



Supporting information 8: Amount of chemical defences according to host-plant specialization. CG concentrations are given in µg/mg of dried body mass. We pooled generalist subspecies (n = 210 individuals distributed in 32 subspecies) on the left and specialist subspecies (n = 165 individuals distributed in 23 subspecies) on the right. We represented the total amount of CG (red boxplot) that sums synthesized (green boxplot) and sequestered (blue boxplot) CG concentrations. Asterix shows significant statistical difference.



Supporting information 9: Total CG concentration per subspecies. Concentrations are given in $\mu\text{g}/\text{mg DW}$. Boxplot colours correspond to the associated mimicry ring with legend on the right. Subspecies are listed in alphabetical order from left to right ($n = 55$ subspecies).



Chapitre III

*Environmental and genetic factors
shaping chemical defences in
aposematic butterflies*



Environmental and genetic factors shaping chemical defences in aposematic butterflies.

OMBELINE SCULFORT^{1,2}, MELANIE MCCLURE¹, MARIANNE ELIAS¹, BASTIEN NAY^{2,3} AND VIOLAINE LLAURENS¹

¹ Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne-Université, EPHE, Université des Antilles, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France

² Unité Molécules de Communication et Adaptations des Micro-organismes (MCAM), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, 57 rue Cuvier (BP 54), 75005 Paris, France

³ Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, CNRS, ENSTA, Route de Saclay, 91128 Palaiseau Cedex, France

Corresponding author: Ombeline Sculfort, ombelinesculfort@hotmail.fr

Keywords: Aposematism, cyanogenic glucosides, evolution, LC-MS/MS, Müllerian mimicry, passion-vine butterfly, secondary metabolites, unpalatability

INTRODUCTION

The evolution of aposematic signals such as warning coloration, often shared by different species living in sympatry is tightly linked with the evolution of chemical defences (Sherratt, 2008). Yet, important variations in the level and the nature of chemical defence are observed in aposematic species, for instance in poison frogs (Santos & Cannatella, 2011) and butterflies (de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). In particular, in mimetic species sharing a common warning coloration, striking variations in chemical defences have been observed both within and among species (Sculfort *et al.*, under review, Chap. II), highlighting not only the effect of shared ancestry, but suggesting that environmental factors could be important in shaping chemical defence variations. Chemical defences in aposematic species are often linked to diet, such as in poisonous frogs which sequester defensive alkaloids from certain arthropod prey (Santos & Cannatella, 2011). In aposematic butterflies, the evolution of chemical defences is often linked to host-plant adaptation, whereby plant defensive metabolites are sequestered or detoxified by caterpillars (Engler *et al.*, 2000). The level of defences might thus be a by-product of the available food sources and be highly plastic depending on the chemical profiles of the host-plant consumed. However, the level of defence could also be regulated by metabolism, enabling detoxification of plant unpalatable compounds (Engler *et al.*, 2000) or synthesis of defensive compounds from plant precursors (Zagrobelny *et al.*, 2014). Here we investigate the origin and fluctuation over developmental stages of chemical defence variations in mimetic butterflies belonging to the tribe Heliconiini. Heliconiini butterflies are a relevant model to investigate chemical defence regulations because of their two documented mechanisms of acquiring defensive compounds. Chemical defences of Heliconiini mostly rely on cyanogenic glucosides (α -hydroxynitriles-*O*- β -glycosides are molecules with a sugar, a cyanide group and two variable radical chains around a central carbon, referred to as CGs) (Conn, 1978), that can be either *de novo* synthesized from amino-acids (Wray *et al.*, 1983) or sequestered from *Passiflora* (passion-vine) host-plants (Engler *et al.*, 2000). These repellent molecules have a bitter taste (Nahrstedt & Davis, 1985) and release toxic cyanide upon predation (Conn, 1980) that strongly deters avian predators (Cardoso, 2019). Heliconiini are known to synthesized two aliphatic CGs (a CG with two simple linear radical chains), namely linamarin and lotaustralin (Fig. 26), at both larval and adult stage (Nahrstedt & Davis, 1985; Davis & Nahrstedt, 1987). A third aliphatic CG, the epilotaustralin was reported in wild

Heliconiini and has been hypothesized to be synthesized concomitantly with its lotaustralin epimer (Sculfort *et al.*, under review, Chap. II). However, at least five *Passiflora* species consumed by Heliconiini also produce these three aliphatic CGs (Olafsdottir, Cornett, *et al.*, 1989; Jiggins, 2016; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Reared caterpillars of *Heliconius melpomene* can uptake these aliphatic CGs from artificial diet (de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019), preventing straightforward conclusions on metabolic origin of aliphatic CGs in adult butterflies. Furthermore, in long-lived species belonging to the genus *Heliconius* the use of pollen as an amino-acid source has been hypothesized to favour CG *de novo* synthesis (Cardoso & Gilbert, 2013). *Passiflora* plants produce a wide panel of secondary metabolites: nearly 30 CGs but also β -carboline alkaloids, flavonoids and saponins with protective role against herbivores such as voracious Heliconiini caterpillars (reviewed in de Castro *et al.*, 2017). Heliconiini caterpillars can overcome these *Passiflora* defences, and especially sequester and metabolise CGs. So far, Heliconiini are known to exclusively sequester cyclopentenoid CGs (CG with a five carbon cycle as radical group) from *Passiflora* (Engler *et al.*, 2000; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). This phenomenon has been demonstrated in *H. sara* which can take up the CG epivolkenin from *P. auriculata* and metabolize it into the non-CG sarauriculatin (Engler *et al.*, 2000).

Variation of CGs is observed throughout the lifetime development of Heliconiini individuals: in *H. melpomene* adults, for instance, sequestered CGs during caterpillar stage are catabolized, and *de novo* synthesis increases, resulting in an increasing total CG concentration over lifetime of *H. melpomene* individuals (de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019). Nevertheless, the *de novo* synthesis capacities and sequestration capacities can probably vary among species, modifying both the CG profiles of caterpillars, but also the accumulation of defensive compounds throughout life. Specialist species feeding on a narrow *Passiflora* range are indeed generally more heavily defended (Arias, Meichanetzoglou, *et al.*, 2016) because of increased efficiency in sequestering CGs from their specific *Passiflora* host-plants (Jiggins *et al.*, 2006). Engler & Gilbert (2007) demonstrated that total CG concentration of specialist butterfly species were also higher when caterpillars were consuming their preferred host-plant as compared to when they fed on other *Passiflora*. Contrastingly, the CG concentration observed in butterflies belonging to generalist species was generally lower and depended less on the *Passiflora* consumed by caterpillars. However, in the generalist species *Heliconius erato*, a positive

correlation was still detected between the total CG amount in the butterfly and in its *Passiflora* host plant (Hay-Roe & Nation, 2007). The larval diet could thus have a significant impact on the CG profile as caterpillar and adult. Variations in CG production and distribution in *Passiflora* species as well as variations in the level of host-plant specialisation might thus explain the large variability of sequestered CGs observed within and among wild Heliconiini (Sculfort et al., under review, Chap. II).

Here we aim at investigating the variation through individuals' life and environmental and genetic factors that might be involved in the important quantitative and qualitative variations in chemical defences observed in Heliconiini butterflies. First, we studied the qualitative and quantitative variations in chemical compounds throughout age in 5 different species with different sequestration capacities. We thus reared 193 individuals from 5 different Heliconiini species in controlled conditions, and investigated the chemical profile of individuals at different developmental stage using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

We then tested the effect of maternal lineage and larval diet on butterflies' chemical profiles by focusing on the species *H. numata*, because individuals are described to be able to both synthesize and sequester CGs. We thus compared the chemical profiles of 132 individuals produced by different *H. numata* females reared in two different host-plants; the CG-containing *P. edulis* with CG and the none-CG-containing *P. riparia*.

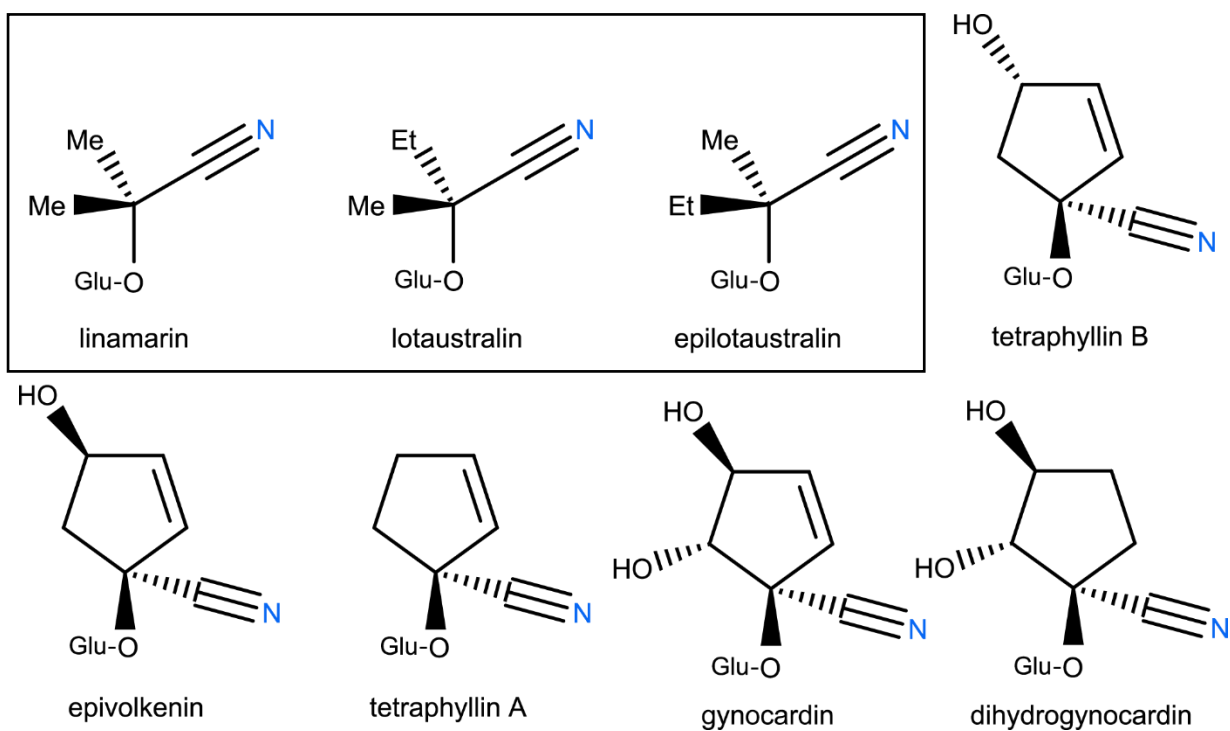


Figure 26: Reported cyanogenic glucosides within *Heliconiini* butterflies. The three aliphatic CGs putatively-synthesized by *Heliconiini* are framed, followed by five cyclopentenoid CGs sequestered from *Passiflora* plants. Glu symbolises glucose group.

MATERIAL AND METHODS

Butterfly rearing

Wild female butterflies were caught in natural populations around the city of Tarapoto in Northern Peru, San Martin department. Females were placed alive in an individual outdoor insectary (4.0 x 3.0 m and 2.5 m high) and fed *ad libitum* with daily-changed fresh pollen and sugar water and had access to *Passiflora* host-plants. Host-plant species were chosen among available species and sufficiently abundant to provide fresh food during the whole caterpillar development. Chosen host-plant species are routinely used to raise our butterfly species in this biological station.

Experiment on age effect (Exp. 1): To test whether variations in CG profiles throughout life differ among Heliconiini species, we reared 5 different species on their preferred local host-plants. We thus had one maternal lineage of *Dione juno* ($n = 20$ individuals) and *Heliconius doris* ($n = 25$) on *P. riparia*. These two host-plants are acceptable and used by Heliconiini. However, as these *Passiflora* are cultivated fruit-species, female butterflies choose them in anthropic area but may not do so in remote forest area, where they are probably absent. One maternal lineage of *H. melpomene* was raised on *P. triloba* ($n = 7$) and two lineages of *H. erato* on *P. trifasciata* (line₁ $n = 4$; line₂ $n = 5$), two preferred host-plants for *H. melpomene* and *H. erato* respectively. Laid eggs were collected daily, and each of them was reared on a single *Passiflora* species (Sup. 10). Caterpillars of *D. juno* and *H. doris* are gregarious and individuals from the same species can thus be reared together in batch. As other species are cannibal during larval stage, individuals were individually reared in different plastic pots and fed *ad libitum* with fresh *Passiflora* leaves.

Experiment on host-plant effect (exp. 2): To test for the effect of genetic variations and larval diet, we had four maternal lineages of *H. numata*, for which eggs were collected and separated in two batches to be reared on either *Passiflora riparia* or *P. edulis* (line₁ $n = 13$ on *P. riparia* + 9 on *P. edulis*; line₂ $n = 24 + 21$; line₃ $n = 7 + 18$; line₄ $n = 4 + 8$). One out of the five lineages of *H. numata* was exclusively reared on *P. riparia* (line₅ $n = 28$). As wild Heliconiini females mate more than once, offspring are considered as half-siblings. In both experiments, caterpillars, prepupae (last larval instar) and virgin adults were sampled. Virgin adults were collected at different ages and killed by placing them at -18°C . Wings were cut and preserved dry in an

envelope placed in a box containing silica gel to absorb humidity. Adult bodies, caterpillars and prepupae were conserved in individual plastic vial containing 100% methanol — HPLC gradient grade suitable for UPLC/UHPLC instruments VWR® — and kept in freezer (approximately -18°C).

Cyanogenic glucoside extraction in methanol

Each individual was transferred with its methanol from the plastic vial into a glass tube. Methanol was evaporated at room temperature until the individual was fully dried using Savant Automatic Environmental SpeedVac System AES1010 with VaporNet. Individuals were weighed before being crushed into a fine powder in a glass mortar and pestle using liquid nitrogen. Then, 2 mL of 100% methanol —HPLC gradient grade suitable for UPLC/UHPLC instruments VWR®— were added to the butterfly powder before stirring for 1 hour at room temperature. Extracts were centrifuged during 20 min at 1600 rpm, filtered using 7 mm diameter glass pipettes and cotton, filtered again with a MultiScreen 0.45 μm hydrophilic, low protein binding plate, and centrifuged 5 min at 3500 rpm. Raw filtrates were diluted 50 times in deionized water, properly vortexed and stored in fridge until LC-MS/MS injections.

Liquid chromatography and tandem mass spectrometry

The performed protocol has been specially optimized to identify and quantify CGs in butterfly methanol filtrates (Briolat *et al.*, 2019). Analytical LC-MS/MS was performed using an Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies, Germany) hyphenated to a Bruker HCT-Ultra ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). Chromatographic separation was carried out on a Zorbax SB-C18 column (Agilent; 1.8 μM , 2.1x50 mm). Mobile phases A and B are deionized water containing 0.1% (v/v) formic acid and 50 μM NaCl and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid, respectively. The gradient was as followed: 0 - 0.5 min, isocratic 2% B; 0.5 - 7.5 min, linear gradient 2% - 40% B; 7.5 - 8.5 min, linear gradient 40% - 90% B; 8.5 - 11.5 isocratic 90% B; 11.6 - 17 min, isocratic 2% B. Flow rate was set up at 0.2 mL/min and increased at 0.3 mL/min between 11.2 to 13.5 min. During LC step, initially neutral CGs get associated with Na^+ cation and these molecular ions were analysed with MS in positive electrospray mode. The oven temperature was fixed at 35°C .

In addition to the 193 butterfly samples, we ran blank control samples and reference samples. Blank was methanol gone through the whole protocol extraction, and the reference sample

was a mix of every butterfly filtrates. Cyanogenic glycosides were identified by comparison to standard solutions (aliphatic were chemically synthesized at PLEN, Møller *et al.*, 2016, cyclopentenoid were donated by Gilbert and Engler *et al.*, 2000). We made three calibration curves based on three commercial standards: linamarin, lotaustralin/epilotaustralin and amygdalin (commercial, Sigma Aldrich), from 0.1 to 20 ng/μL each. Blanks, standards, calibration curve and reference sample were run first. The reference sample was injected every ten butterfly samples.

Chemical data analyses

Mass spectra were analysed using the Bruker Compass Data Analysis 4.3 software. We targeted sodium adducts [M+Na⁺] of linamarin [retention time (RT) 2.4 min at m/z 270], lotaustralin [RT 5.4 min at m/z 284], epilotaustralin [RT 5.5 min at m/z 284], tetraphyllin B [RT 1.3 min at m/z 310], epivolkenin [RT 2.3 min at m/z 310], tetraphyllin A [RT 4.9 min at m/z 294], gynocardin [RT 1.4 min at m/z 326], dihydrogynocardin [RT 1.4 min at m/z 328] and amygdalin [RT 6.4min at m/z 480]. For every targeted compound, total amount was estimated based on the Extracted Ion Chromatogram (EIC) peak areas and quantification based on regression equation calculated from standard curve (in ng of CG/mL of butterfly extract). The concentration of each CG in every butterfly samples was determined by dividing the total amount of compounds by the butterfly mass (final concentration in μg of CG per mg of dried butterfly weight).

Statistical analyses

All statistics were computed using R 3.4.4 and RStudio 1.1.463 ("R: The R Project for Statistical Computing," 2019; "RStudio," 2019). To test the effect of species, sex, larval diet, age and mother lineage on the total CG concentration we performed ANOVA tests, and MANOVA tests to assess differences for profiles of CG concentrations regarding the same factors, using *stats* 3.4.2 package (R Core Team, 2017). Tukey Honest Significant Differences (THSD) post-hoc tests following significant ANOVA were performed. MANOVA associated pairwise comparison post-hoc test was computed using the package *RVAideMemoire* 0.9-72 (Hervé, 2019). We performed statistical tests using individual variations to take into account intra-lineage variability ($n = 193$ individuals). Plots were realized with *ggplot2* 3.0.0 package (Wickham *et al.*, 2019).

RESULTS

Variations in chemical profiles among Heliconiini butterflies

In adult butterflies, we revealed large variations in concentrations of the different targeted CG compounds across Heliconiini species. Most preponderant compounds are the putatively-synthesized CGs, with important amounts of linamarin (Tab. 3). However, in *H. erato* reared on *P. trifasciata* only one out of the nine individuals contained putatively-synthesized CGs only, while in two distinct individuals only sequestered epivolkenin was detected. In other four *H. erato* individuals, sequestered compounds were coupled with synthesized CGs, and no CG was detected in the two remaining individuals, highlighting the large variation and flexibility in sequestering and synthesizing CG within this species, even when reared under the same conditions. Consistent with results from other studies in wild butterflies, the average total CG concentration in *H. erato* was the lowest (mean of total [CG] = 6.20 ± 8.94 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$), significantly departing from the total CG concentrations observed in the other species tested here, except for *H. melpomene* (THSD *H. erato* / *H. melpomene*, $p = 0.96$) (Tab. 3). Similarly, CG profiles differed among the tested Heliconiini species, except between *H. erato* and *H. melpomene* (pairwise comparison: $p = 0.122$) (Tab. 4). The highest average total CG concentrations were found in *H. doris* (mean of total [CG] = 43.60 ± 15.70 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) and *D. juno* (mean of total [CG] = 41.51 ± 34.97 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$), while *H. numata* (mean of total [CG] = 35.08 ± 22.91 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) and *H. melpomene* (mean of total [CG] = 18.61 ± 16.80 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) exhibited an intermediate level. Sex had also a significant effect on CG total concentration: adult females were generally more defended than adult males ($n = 85$ females, mean total [CGs] = 40.87 ± 26.87 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$; $n = 83$ males, mean total [CGs] = 29.26 ± 20.80 $\mu\text{g}/\text{mg DW}$) (Tab. 4).

CGs	Putatively-synthesized			Putatively-sequestered		Total
Species	Lin	Lot	Epilot	Tet. B	Epivol	[CG]
<i>D. juno</i>	31.77 ± 26.18	7.83 ± 8.58	1.90 ± 1.75	0.00	0.00	41.51 ± 34.97
<i>H. doris</i>	41.15 ± 14.83	2.44 ± 1.58	0.02 ± 0.09	0.00	0.00	43.60 ± 15.70
<i>H. erato</i>	2.82 ± 5.03	1.14 ± 2.74	0.37 ± 1.04	0.00	1.87 ± 2.47	6.20 ± 8.94
<i>H. melpomene</i>	21.00 ± 12.46	3.16 ± 3.44	1.52 ± 2.88	0.00	0.00	18.61 ± 16.80
<i>H. numata</i>	30.32 ± 19.36	4.47 ± 4.34	0.37 ± 0.62	0.17 ± 0.21	0.00	35.08 ± 22.91

Table 3: Mean concentrations with standard deviation of each CG reported in adults from the five *Heliconiini* species tested, *D. juno* (n = 20), *H. doris* (n = 22), *H. erato* (n = 9), *H. melpomene* (n = 5), *H. numata* (n = 112). Putatively *de novo* synthesized CGs are linamarin (Lin), lotaustralin (Lot) and epilotaustralin (Epilot). Putatively-sequestered CGs are tetraphyllin B (Tet. B) and epivolkenin (Epivol). Tetraphyllin A, gynocardin and dihydrogynocardin were either absent or in so low concentrations they were not detected. Concentrations are given in µg/mg of DW.

Chemical defences increased during lifetime in Heliconiini

By tracking down the CG concentration in individuals sampled at different stages, we detected a general positive correlation between defensive compound concentration and butterfly's age (Tab. 4, Fig. 27). This increase in total CG concentration throughout life was observed in the five species studied, with slight variations in the rate of increase among species. Nevertheless, due to our limited sample size, we cannot conclude whether these differences between species were significant. This increase of total CG concentration mostly relies on the synthesis of linamarin (MANOVA, $F^1_{191} = 10.901$, $p = 0.001$) and epilotaustralin (MANOVA, $F^1_{191} = 19.711$, $p < 0.001$) as adults.

Tested factors	Statistical results	
Heliconiini	Total [CGs]	Profile of [CGs]
Species	$F^4_{157}, 4.978, p = 0.001$	$F^4_{157}, 0.839, p < 0.001$
Sex	$F^1_{157}, 8.620, p = 0.004$	$F^1_{157}, 0.063, p = 0.066$
Age	$F^1_{157}, 8.169, p = 0.005$	$F^1_{157}, 0.175, p < 0.001$
Species : Age	$F^4_{157}, 0.100, p = 0.982$	$F^4_{157}, 0.121, p = 0.491$

Table 4: Comparison of total CG concentrations (ANOVA) and CG profiles (MANOVA), within all Heliconiini tested ($n = 193$ individuals) (Experiment 1)

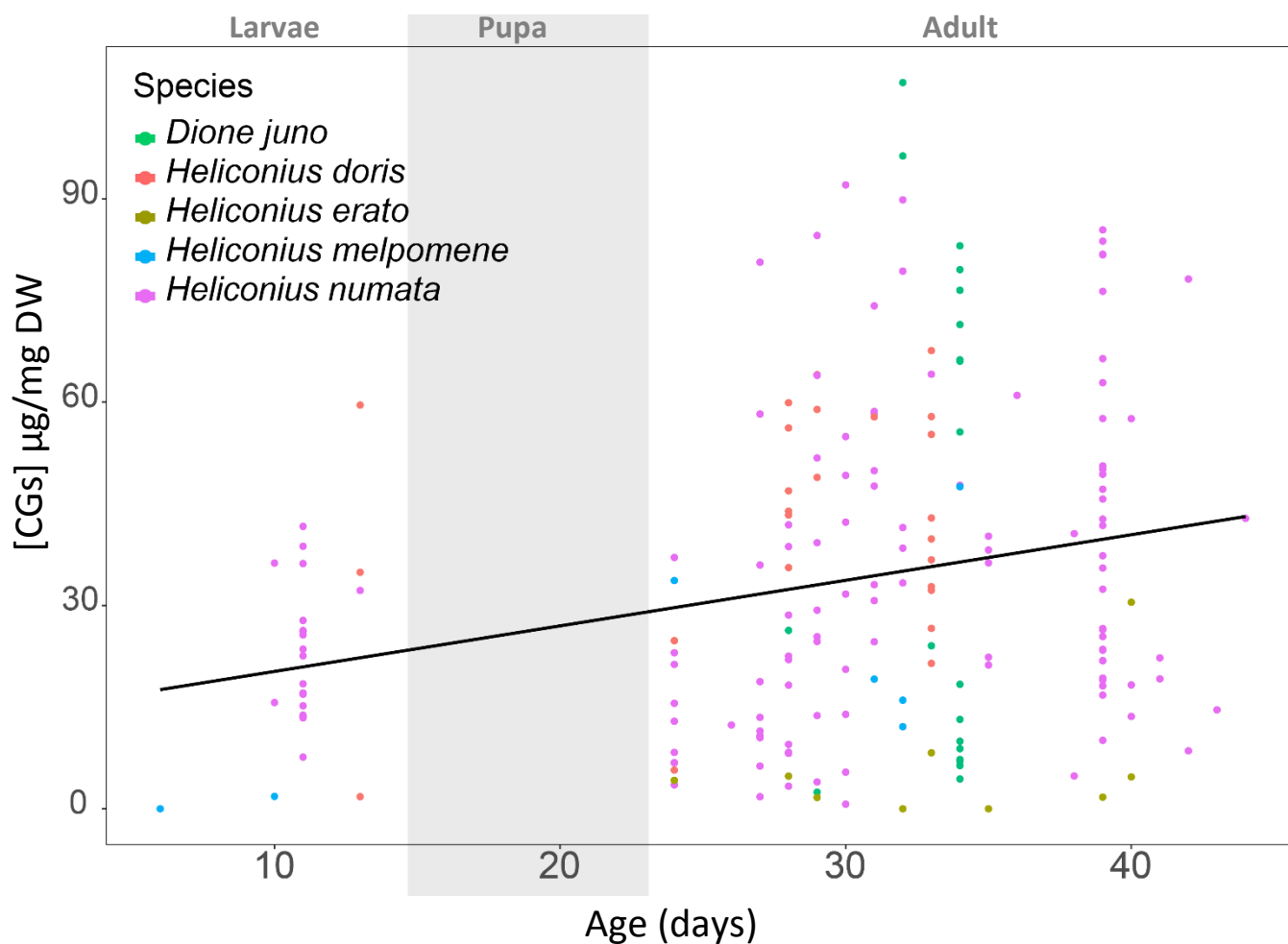


Figure 27: Total CG concentrations increased during butterfly life-cycle. Y-axis shows the total CG concentration per individuals in $\mu\text{g}/\text{mg DW}$, depending on the butterfly's age in days. *D. juno* ($n = 20$ individuals) and *H. doris* ($n = 25$ individuals) were fed on *P. riparia*, *H. erato* ($n = 9$ individuals) on *P. trifasciata*, *H. melpomene* ($n = 7$ individuals) on *P. triloba* and *H. numata* ($n = 131$ individuals) were fed on either *P. riparia* or *P. edulis*. Larval stage is comprised between 6 and 11 days, prepupal stage corresponds to day 13, pupal stage starts at day 14 and ends at day 23, and adult stage is in between 24 and 44 days. Black line is regression curve taking account all individuals ($n = 192$).

Chemical defence variations between different *Heliconius numata* lineages

No significant effect of sex and host-plant diet was detected within our *H. numata* sample, although a marginally significant effect of host-plant on CG profiles was detected (*P. edulis* $n = 56$, mean total [CGs] = $35.54 \pm 24.73 \mu\text{g}/\text{mg DW}$; *P. riparia* $n = 76$, mean total [CGs] = $31.68 \pm 20.11 \mu\text{g}/\text{mg DW}$) (Tab. 5). CG defences of *H. numata* were mostly composed of *de novo* synthesis, as *P. riparia* does not provide CGs and individuals reared on *P. edulis* did not sequestered tetraphyllin B, with the exception of one female out of 56 individuals. Contrastingly, we found a marginally significant effect of the maternal lineage on total CG concentration and a significant effect on CG profiles (Tab. 5), consistent with a genetic variation in the capacity to synthesize CG among the *H. numata* individuals tested.

Tested factors	Statistical results	
	Total [CGs]	Profile of [CGs]
<i>Heliconius numata</i>		
Maternal lineage	$F^4_{97}, 2.177, p = 0.077$	$F^4_{97}, 0.303, p = 0.013$
Sex	$F^1_{97}, 0.191, p = 0.663$	$F^1_{97}, 0.047, p = 0.335$
Age	$F^1_{97}, 6.718, p = 0.011$	$F^1_{97}, 0.389, p < 0.001$
Host-plant diet	$F^1_{97}, 0.394, p = 0.532$	$F^1_{97}, 0.092, p = 0.056$
Maternal lineage:sex	$F^4_{97}, 1.997, p = 0.101$	$F^4_{97}, 0.192, p = 0.246$
Maternal lineage:Host-plant diet	$F^3_{97}, 0.945, p = 0.422$	$F^3_{97}, 0.072, p = 0.848$

Table 5: Comparison of total CG concentrations (ANOVA) and CG profiles (MANOVA), within *H. numata* individuals produced by 5 wild females, and reared on different host-plants tested ($n = 132$ individuals) (Experiment 2).

DISCUSSION

Heliconiini invest in *de novo* synthesis as adults more than in sequestration as larvae

Our results highlight the important investment in CG synthesis in the five species studied. Although the chemical profiles of the butterflies studied varies among species even when reared on the same host-plants, a lot of compounds detected in wild samples (Sculfort *et al.*, under review, Chap. II) were not found in this experiment where butterflies were reared on a single host-plants. This highlights that the chemical profiles are probably influenced by host-plant availability and chemical composition, but also that *de novo* synthesis at adult stage has probably a more important contribution to adult chemical defences than previously thought. In our experiment, only some adults of *H. erato* totally relied on sequestered CGs during caterpillar stage, resulting in lower CG concentrations as adults as compared to the other species tested here.

In our experiment, adults from all 5 species tested were generally more chemically-defended than caterpillars, suggesting positive selection on increased chemical defences in these aposematic butterflies, independently from adaptation to host-plants in caterpillars (de Castro, Demirtas, *et al.*, 2019). The ecology of these two developmental stages drastically differ: the caterpillars have either a cryptic dark colour or a white colour contrasting with the background, associated with spines as physical defences, whereas flying adults display conspicuous wing colour patterns. Although we do not have chemical defence data for caterpillar from *D. juno* and *H. doris*, these highly defended species are gregarious during caterpillar stage. Demonstrated higher amount of CG in gregarious species compared to solitary species was hypothesized to be selected under parasite pressure (Arias, Meichanetzoglou, *et al.*, 2016). Pressures exerted on caterpillars and adults are expected to be different: birds, ants and parasitoids are predators of caterpillars, whereas birds, lizards, spiders and mantis are adult's preponderant predator. These different predator taxa may not have the same sensitivity to CGs. In adult Heliconiini butterflies, chemical defences drive the convergent evolution of colour pattern (Sherratt, 2008), resulting in so-called mimicry rings composed of different sympatric species displaying similar aposematic colour patterns. Both defensive compounds and the local abundance of mimicry rings then shape predator learning and avoidance behaviour (Sherratt, 2008). In our study we detected a reduced CGs content in

H. erato, with some individuals even completely undefended (one *H. melpomene* was undefended as well). *H. erato* is generally abundant in the localities where we collected the wild females used in this experiment. This finding supports previous field studies emphasizing such low chemical defence content within *H. erato*, which is never observed among other species (Arias *et al.*, 2016, Sculfort *et al.*, under review, Chap. II). The evolution of chemical defence synthesis in *Heliconius* adults might also be linked with their pollen-feeding behaviour that provides a lots of proteins, used as a source of amino-acids (Cardoso & Gilbert, 2013). *Heliconius* differ in pollen-plant species, but how the identity of the plant species that provides pollen resources influences the CG production is unknown (Estrada & Jiggins, 2002). By highlighting the importance of chemical defences synthesis as adults in Heliconiini, we thus hope our empirical results will stimulate research on the evolution of CG synthesis, testing in particular the effect of mimicry ring abundance and pollen consumption.

Genetic variations in CG synthesis capacities?

Our results obtained on *H. numata* are consistent with a genetic control of CGs concentrations, although the maternal effect detected here could also be explained by maternally-transmitted epigenetic effect.

Even when reared on different *Passiflora* species, *H. numata* studied here had similar chemical profiles, mostly composed of three synthesized aliphatic CGs. A previous study on wild *H. numata* revealed that they preferentially contained synthesised CG, although sequestered CGs were detected in some butterflies (Sculfort *et al.*, under review, Chap. II). The acquisition of CGs in this species is probably at least partly controlled by genetic factors underpinning synthesis ability by triggering the production of the relevant machinery to process amino-acids into CGs. Increased capacities of CG synthesis as adult could then allow to maintain high level of defences when feeding on a wide range of *Passiflora* as caterpillar. The CG synthesis capacities may be under strong positive selection in species where the abundance of co-mimetic species strongly varies among localities. Further research on the evolution of this CG synthesis throughout the Heliconiini clade is now required to investigate the link between host-plant specialisation and mimicry ring abundance. This would shed light on the role of ecological interactions, either with host-plant or mimetic butterfly communities, on the evolution of chemical defences in aposematic species.

CONCLUSIONS

For the first time, we investigated qualitative and quantitative variation in defensive compounds of different Heliconiini species throughout butterfly life-cycle. Despite our limited sample size due to field conditions, our precise quantification of the different CGs at various butterfly ages highlight the overall increase in defence levels throughout life. This increase seems enabled by the synthesis capacities that might be under genetic control, as suggested here in *Heliconius numata*. Variation in host-plant distribution but also abundance of mimicry rings could influence chemical defences in mimetic butterflies, because individual predation risk is lower in abundant mimicry rings as compared to rare ones (Chouteau et al., 2016), so that selection for higher distastefulness might be emphasized in localities where a given mimicry ring is at low density. Further research on variations in synthesis capacities within and among species are now required to understand the evolution of chemical defence in Heliconiini, and the genetic basis underlying these variations.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Experiments were designed by VL, BN, ME and OS. OS reared butterflies with support from MM. Chemical analyses and statistical analyses were managed by OS. OS wrote the manuscript with contributions from all authors. All authors participated in constructive discussions and approved manuscript final version.

COMPETING INTERESTS

We declare no competing interests.

FUNDINGS

This work was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche under the LabEx ANR-10-LABX-0003-BCDiv, in the program “Investissements d’avenir” number ANR-11-IDEX-0004-02 attributed to OS and Paris city council grant *Emergence* to VL.

ACKNOWLEDGMENTS

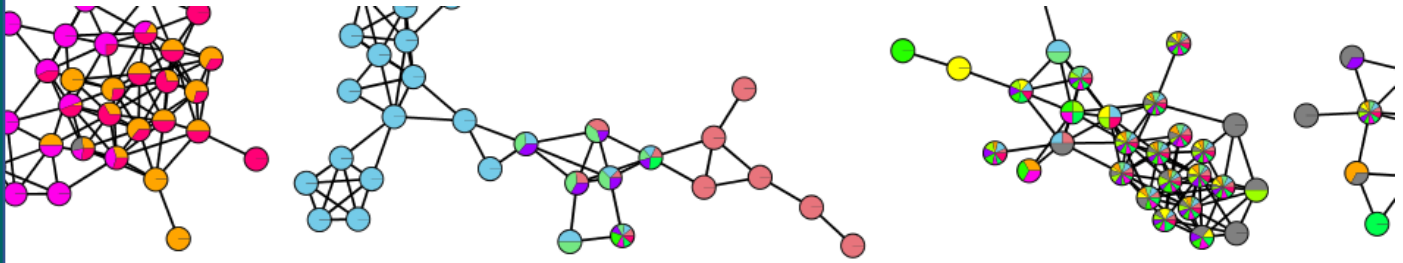
We thank Mathieu Chouteau, Mario Tuanama and Ronald Mori-Pezo for help on the field and during rearing experiments. We would like to thank Gerardo Lamas from the Natural History Museum of Lima (Peru) and Peruvian authorities (Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre) for delivering research and export permits (Research permit number: RDG 0373-2017-SERFOR-DGGSPFFS). LC-MS/MS analyses were performed at the Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Denmark, and we thank Søren Bak for welcoming OS in his facilities. We thank Érika C. Pinheiro de Castro and David Ian Pattison for precious technical assistance with LC-MS/MS practice.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Species Developmental stage	Plant 1		Plant 2	
	Number of individual	Mean [CG]total	Number of individual	Mean [CG]total
<i>Dione juno</i>	<i>Passiflora riparia</i>		-	
Adult – female	10	72.82 ± 21.08	-	
Adult – male	10	10.19 ± 6.30		
Adult – total	20	41.50 ± 34.97		
<i>Heliconius doris</i>	<i>Passiflora riparia</i>		-	
Prepupae	3	32.07 ± 23.67	-	
Adult – female	13	47.85 ± 17.06		
Adult – male	9	37.45 ± 9.51		
Adult – total	22	43.60 ± 15.33		
<i>Heliconius erato</i>	<i>Passiflora trifaciata</i>		-	
Adult – male	5	8.34 ± 11.21	-	
<i>Heliconius erato</i>	<i>Passiflora trifaciata</i>		-	
Adult – female	3	4.70 ± 2.72	-	
Adult – male	1	0		
Adult – total	4	2.96 ± 3.11		
<i>Heliconius melpomene</i>	<i>Passiflora triloba</i>		-	
Caterpillar	2	0.91 ± 0.91	-	
Adult – female	3	33.44 ± 11.59		
Adult – male	2	14.06 ± 1.95		
Adult – total	5	25.69 ± 13.12		
<i>Heliconius numata</i>	<i>Passiflora riparia</i>		-	
Caterpillar	4	20.80 ± 3.88	-	
Adult – female	12	26.53 ± 18.66		
Adult – male	12	33.25 ± 12.89		
Adult – total	24	29.89 ± 16.39		
<i>Heliconius numata</i>	<i>Passiflora riparia</i>		<i>Passiflora edulis</i>	
Caterpillar	2	26.96 ± 11.77	3	25.00 ± 1.72
Prepupae	1	32.21	0	-
Adult – female	5	31.10 ± 15.44	3	43.77 ± 30.54
Adult – male	5	39.64 ± 9.89	3	58.61 ± 17.98
Adult – total	10	35.37 ± 13.65	6	51.19 ± 26.13

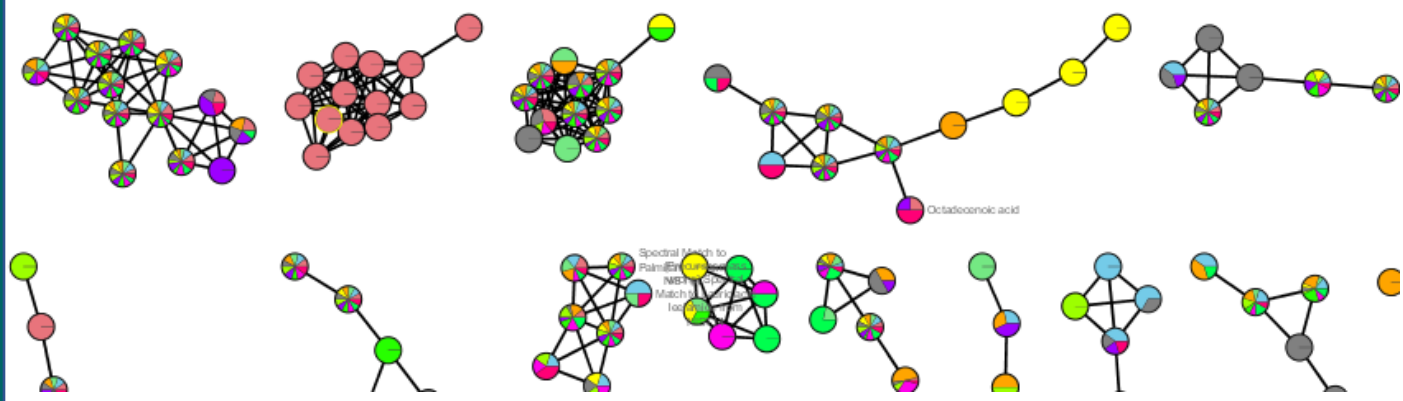
Species Developmental stage	Plant 1		Plant 2	
	Number of individual	Mean [CG]total	Number of individual	Mean [CG]total
<i>Heliconius numata</i>	<i>Passiflora riparia</i>		<i>Passiflora edulis</i>	
Caterpillar	4	13.78 ± 3.98	2	34.72 ± 6.94
Adult – female	8	39.16 ± 27.21	11	53.82 ± 30.99
Adult – male	12	41.88 ± 22.54	8	25.53 ± 13.26
Adult – total	20	40.79 ± 24.55	19	41.91 ± 28.73
<i>Heliconius numata</i>	<i>Passiflora riparia</i>		<i>Passiflora edulis</i>	
Caterpillar	0	-	2	36.21 ± 0.04
Adult – female	3	27.30 ± 20.05	9	36.19 ± 19.21
Adult – male	4	13.25 ± 6.91	7	24.18 ± 24.62
Adult – total	7	19.87 ± 15.90	16	30.93 ± 22.54
<i>Heliconius numata</i>	<i>Passiflora riparia</i>		<i>Passiflora edulis</i>	
Caterpillar	0	-	2	13.70 ± 0.11
Adult – female	2	12.71 ± 7.86	3	21.16 ± 8.35
Adult – male	2	66.95 ± 9.39	3	28.00 ± 21.31
Adult – total	4	39.83 ± 28.47	6	24.58 ± 16.54

Supplementary 10: Butterfly and host-plant samples used in this study. We reared five species of Heliconiini using four species of *Passiflora*. Four Heliconiini species were reared on a single *Passiflora* species: *D. juno* (1 lineage, $n = 20$ individuals) and *H. doris* (1 lineage, $n = 25$ individuals) on *P. riparia*, *H. erato* (2 lineages, $n = 9$ individuals) on *P. trifasciata* and *H. melpomene* (1 lineage, $n = 7$ individuals) on *P. triloba*. For four out of five lineages of *H. numata* ($n = 132$ individuals), eggs were collected and separated in two batches to be rear on *P. riparia* or *P. edulis*. One lineage of *H. numata* was exclusively reared on *P. riparia*. For each treatment are indicated number of individuals at each developmental stage, mean concentration of total CGs and standard deviation in $\mu\text{g}/\text{mg DW}$.



Chapitre IV

Peut-on explorer qualitativement le panel des défenses chimiques des Heliconiini et déterminer leur allocation ?

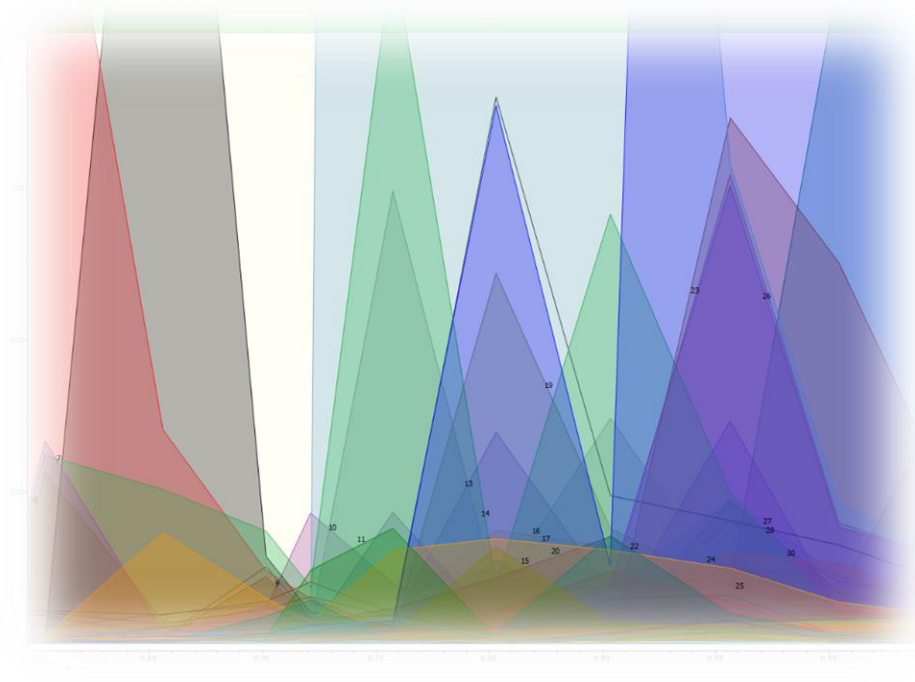


Remerciements

Dans la première partie de ce chapitre, j'ai mis à profit la technique de réseau moléculaire pour explorer la diversité des glucosides cyanogènes de Heliconiini en collaboration avec Grégory Genta-Jouve, maître de conférences de l'Université Paris Descartes (UMR 8638), que je remercie pour son temps et son aide.

Pour les expériences de localisation des glucosides cyanogènes traitées dans un second temps, j'ai pu bénéficier du soutien de Martine Maibèche, professeure à Sorbonne Université, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire d'écologie chimique à l'institut d'écologie et des sciences environnementales de Paris. Je remercie Annick Maria pour m'avoir généreusement fourni en cobayes de papillon *Spodoptera littoralis* et Thomas Chertemps pour m'avoir appris les bases et aiguillé dans la mise en place du protocole de coupe des papillons.

Pour l'analyse des coupes de papillon je remercie tout particulièrement Edith Nicole de l'Ecole Polytechnique de Palaiseau qui m'a fait confiance pour manipuler l'énorme bête qu'est le spectromètre de masse et qui a généré les images de répartition des ions.



INTRODUCTION

Les Heliconiini sont souvent relâchés très rapidement et indemnes après une attaque d'oiseau (Chai, 1996; Pinheiro & Campos, 2019). Cela tient du fait que ces papillons ne sont pas broyés car ils ont une cuticule épaisse qui résiste à la pression exercée par le bec des oiseaux, mais aussi par la présence des glucosides cyanogènes (Nahrstedt & Davis, 1985). Ces derniers sont responsables d'un goût amer désagréable et de la libération de cyanure d'hydrogène toxique. Si les glucosides cyanogènes étaient stockés trop profondément dans le corps des papillons, les prédateurs ne les détecteraient qu'après avoir écrasé complètement leur proie, ce qui augmenterait la probabilité de tuer le papillon. La sélection naturelle tendrait donc à favoriser une localisation périphérique, voire externe, des défenses chimiques, permettant une détection et une répulsion rapide des prédateurs ; qui offrirait de meilleures chances de survie pour le papillon.

En raison des origines métaboliques différentes des glucosides cyanogènes, synthétisés ou séquestrés à partir des passiflores, la localisation des différentes molécules pourrait aussi être variable. De plus mâles et femelles investissent les glucosides cyanogènes dans des organes reproducteurs qui leurs sont propres, ce qui conduit à de la variabilité entre les sexes. Même si la concentration de glucosides cyanogènes est variable entre les individus d'une même espèce (Chapitre II), les tissus de localisation de ces molécules sont supposés identiques entre les individus.

Des dosages sur différentes sections de larves disséquées d'*Heliconius charithonia* ont montré que les glucosides cyanogènes synthétisés, la linamarine et lotaustraline, sont majoritairement stockés dans l'hémolymphe, puis le corps gras, les muscles et tégument et enfin le tube digestif, par ordre décroissant (Nahrstedt & Davis, 1983). Néanmoins, les auteurs précisent que les faibles quantités trouvées dans le tube digestif pourraient être dues à des résidus d'hémolymphe. Chez les larves de zygène (Zygaenidae) ces mêmes molécules sont acheminées et concentrées dans des cavités cuticulaires périphériques et le tégument (Fig. 28) (Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2014; Zagrobelny *et al.*, 2014).

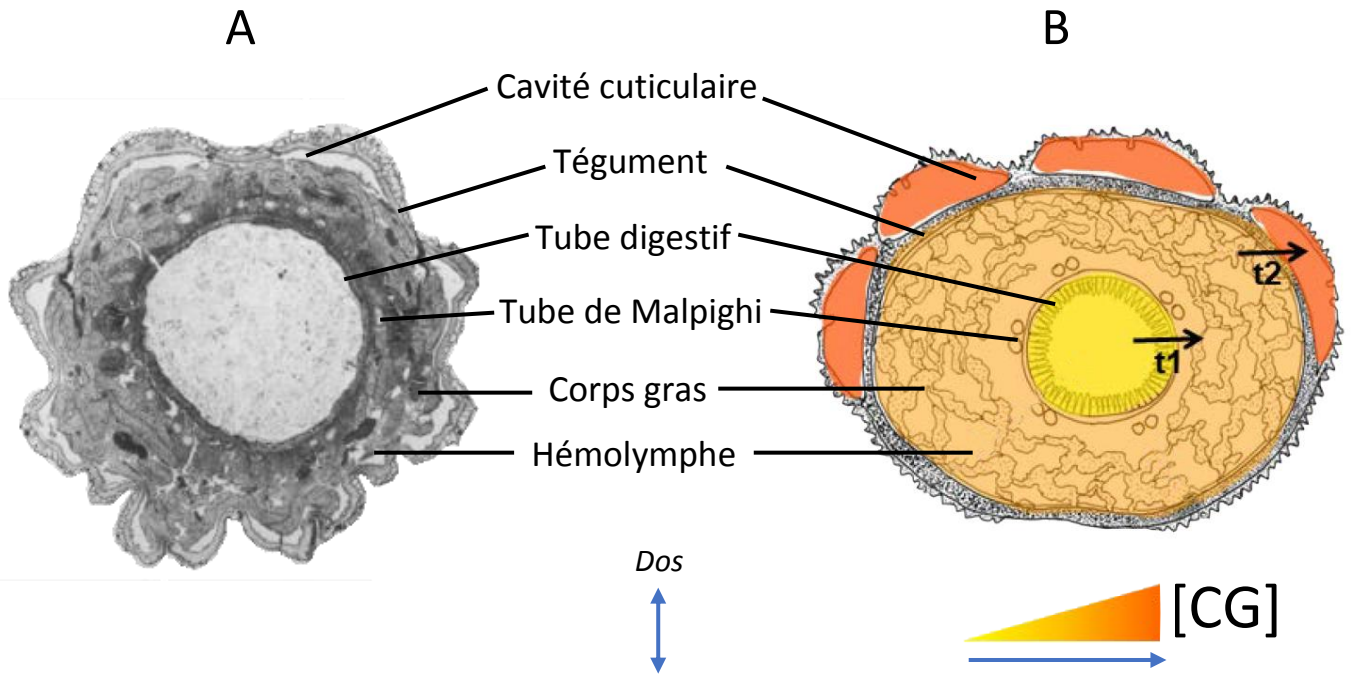


Figure 28 : A) coupe transversale selon l'axe dorso-ventral du sixième stade larvaire de la zygène du trèfle *Zygaena trifolii*. Coupe incluse dans la paraffine et image obtenue au microscope optique puis grossit 13 fois (Franzl & Naumann, 1985). B) Schéma d'une coupe transversale de larve de zygène représentant le gradient de concentration croissant des glucosides cyanogènes totaux, du tube digestif (concentration la plus faible en jaune) aux cavités cuticulaires (concentration la plus forte en orange). Les flèches t1 et t2 symbolisent les transporteurs de ces composés (Zagobelny, de Castro, et al., 2018).

Concernant les Heliconiini adultes, la localisation des glucosides cyanogènes est plus floue. Des dosages des glucosides cyanogènes totaux chez *H. erato* indiquent que le thorax est la région la plus concentrée suivi de la tête, des ailes puis de l'abdomen (Hay-Roe & Nation, 2007). Chez les Heliconiini, neuf glucosides cyanogènes ont été répertoriés chez l'adulte durant cette thèse, dont deux pour la première fois :  pilotaustraline et probablement la deidacline, un st reoisom re de la tétraphylline A également synthétisée par les passiflores (Spencer et al., 1983; Tober & Conn, 1985; Jaroszewski et al., 2002). Jusqu'à présent les recherches sur les défenses chimiques des Heliconiini ont été menées soit i) au niveau de la

concentration totale des glucosides cyanogènes, donc sans tenir compte de la variabilité de ces molécules (Engler & Gilbert, 2007; Hay-Roe & Nation, 2007; Arias, Meichanetzoglou, *et al.*, 2016), soit ii) sur des animaux issus d'élevages et nourris sur un spectre extrêmement réduit de plantes hôtes n'offrant pas l'accès à la diversité réelle des glucosides cyanogènes potentiellement assimilables (de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). Ces papillons détournent et séquestrent six glucosides cyanogènes de leur plante hôte. Cependant les passiflores synthétisent un large spectre d'une trentaine de composés susceptibles d'être ingérés par les larves (Seigler *et al.*, 1982; Dhawan *et al.*, 2004; de Castro, Zagrobelny, *et al.*, 2019). En plus de cette diversité, l'identification de ces molécules dans les extraits de papillons est limitée due à la difficulté d'obtenir des standards analytiques. Ainsi le panel de glucosides cyanogènes des Heliconiini est potentiellement sous-estimé à ce jour.

Les recherches rapportées dans ce chapitre ont été menées dans le but d'explorer la potentielle diversité de glucosides cyanogènes au sein des espèces d'Heliconiini grâce aux techniques de réseau moléculaire. Dans un second temps il a été tenté de i) déterminer avec précision la localisation des glucosides cyanogènes à l'échelle anatomique, ii) déterminer s'il existe une différence d'allocation entre molécules synthétisées ou séquestrées et iii) s'il y a des variations d'allocation entre les espèces mais aussi au sein des espèces, en s'appuyant sur l'imagerie métabolique par spectrométrie de masse.

Ces recherches étant essentiellement exploratoires, il est présenté ici leur état d'avancement et les pistes d'amélioration des différents protocoles impliqués pour de futures expériences.

Prospection de la diversité des glucosides cyanogènes des Heliconiini par la méthode des réseaux moléculaires

L'objectif était de détecter de potentiels glucosides cyanogènes non répertoriés chez les Heliconiini adultes par comparaison de leurs profils de fragmentation en spectrométrie de masse avec ceux présents et connus. La technique des réseaux moléculaires est une extension des techniques de métabolomique, qui permet d'organiser et de visualiser les données des ions moléculaires fragmentés issus d'un mélange complexe, en se basant sur la similarité de leurs données spectrales (Nothias-Scaglia *et al.*, 2015). Cette approche nécessite un traitement informatique des données d'analyse en spectrométrie de masse, qui permet de comparer et d'annoter les composés de plusieurs échantillons simultanément.

L'obtention d'un réseau moléculaire requiert donc la combinaison de plusieurs outils, après obtention d'un extrait complexe de métabolites :

- 🦋 la chromatographie en phase liquide en ultra haute performance (abrégée UHPLC pour Ultra High Performance Liquid Chromatography), qui permet la séparation des composés d'un mélange complexe;
- 🦋 la spectrométrie de masse tandem (MS/MS ou MS²), qui analyse chacun de ces composés par ionisation puis fragmentation de l'ion moléculaire obtenu;
- 🦋 la plateforme GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) dédiée à l'interprétation des données spectrales de type MS²;
- 🦋 un logiciel de visualisation et de mise en forme du réseau moléculaire tel que Cytoscape (Fig. 29).

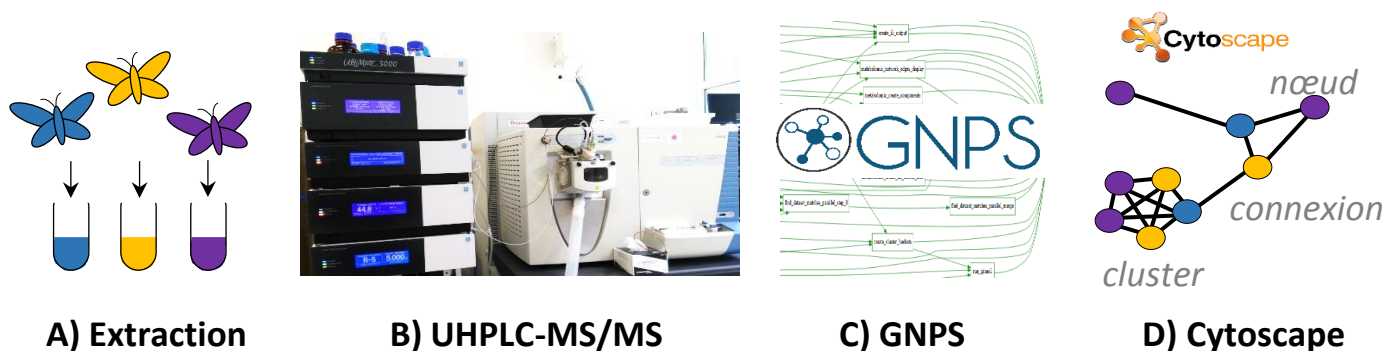


Figure 29 : Etapes expérimentales pour générer un réseau moléculaire. A) extraction des métabolites des échantillons d'intérêt, B) séparation des molécules en UHPLC, ionisation et acquisition de leurs données spectrales en MS², C) alignement, comparaison des spectres entre eux et avec les spectres disponibles dans les bases de données puis construction du réseau moléculaire via la plateforme GNPS, D) visualisation et mise en forme du réseau moléculaire avec le logiciel Cytoscape. Un nœud représente un spectre de fragmentation MS² propre à un ion précurseur. Les ions sont regroupés en clusters sur la base de la similarité de leur spectres MS².

L'UHPLC est une technique chromatographique de chimie analytique consistant à séparer physiquement les composés d'un mélange. Les molécules sont séparées en fonction de leur polarité et de leur affinité avec la phase stationnaire de la colonne de chromatographie. Les glucosides cyanogènes sont des molécules très polaires ayant tendance à vite sortir du système UHPLC sans avoir le temps d'être bien séparées. Afin d'augmenter leur temps de rétention et d'optimiser leur séparation, l'utilisation d'une colonne peu polaire, contenant comme phase stationnaire un gel de silice hydrophobe greffée avec des chaînes apolaires en C₁₈ est préconisée ainsi qu'un faible débit d'élution. Après séparation, chaque composé est analysé par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, les molécules neutres sont ionisées puis séparées selon leur rapport masse sur charge (m/z). Le spectromètre de masse sélectionne un ion précurseur qui est ensuite fragmenté. Les fragments obtenus sont détectés puis analysés en haute résolution afin de générer un spectre MS² propre à chaque ion précurseur. Ce spectre constitue une signature pour chaque composé analysé.

Afin de maximiser la diversité des molécules, des mélanges de plusieurs individus par espèces ont été préparés. Lorsqu'une molécule est en concentration suffisante pour être détectable elle génère des données spectrales en MS². La multitude de molécules par échantillon et donc de données MS² rendent l'interprétation manuelle des données très fastidieuse. La comparaison des spectres MS² par alignement se fait donc automatiquement sur la plateforme en ligne GNPS (Wang *et al.*, 2016). Actuellement c'est la seule plateforme gratuite permettant de construire un réseau moléculaire. GNPS prend en charge la comparaison du jeu de données avec tous les spectres MS² déjà publiés, ce qui permet d'identifier les ions connus présents dans les échantillons et d'annoter le réseau moléculaire (Fig. 30). GNPS construit le réseau moléculaire en représentant chaque spectre sous forme d'un nœud (ou perle) souvent associé à la masse de l'ion précurseur correspondant. Les spectres sont comparés par alignement et un indice de corrélation, nommé cosinus de similarité (cosine score, CS) est associé à chaque paire de spectres. Le cosinus de similarité est compris entre zéro (spectres totalement différents), et un (spectres totalement identiques). La longueur des connexions entre les nœuds traduit le degré de similarité entre les spectres MS². Plus la connexion est courte, plus les spectres et ions précurseurs se ressemblent (Yang *et al.*, 2013). Le réseau moléculaire ainsi construit permet d'identifier des composés inconnus par similarité avec des composés connus, qui sont tous situés dans un même cluster de nœuds.

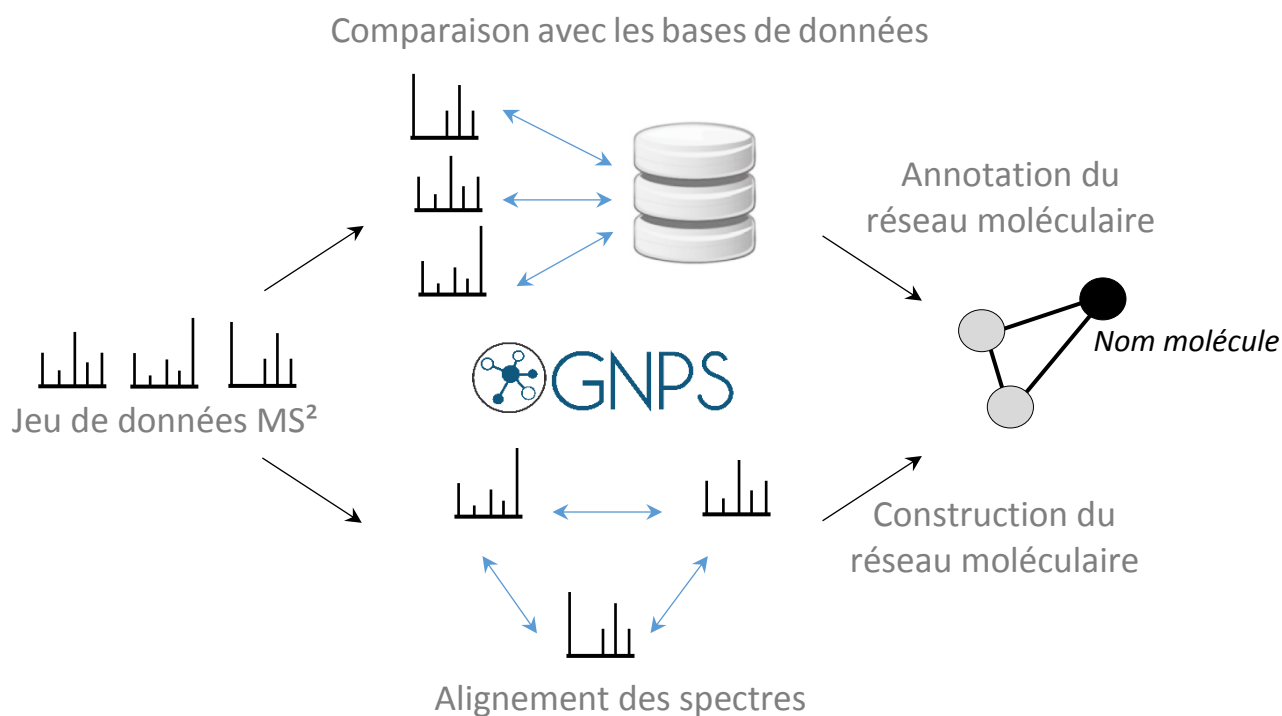


Figure 30 : GNPS permet d'aligner et de comparer les paires de spectres pour construire un réseau moléculaire basé sur la similarité des profils de fragmentation des molécules. Les spectres sont confrontés à ceux stockés dans les bases de données en ligne ce qui peut conduire à l'identification de molécules. Schéma modifié d'après Wang et al. (2016).

MATERIELS ET METHODES

Echantillons biologiques

Onze espèces et un mélange d'Heliconiini ont été analysées en réseau moléculaire (Tab. 6). Plusieurs extraits bruts d'individus d'une même espèce ont été mélangés afin d'augmenter la diversité métabolique de l'espèce (voir protocole d'extraction des papillons, chapitre II, page 90). Concernant les neuf glucosides cyanogènes ciblés précédemment, leur présence ou absence pour chaque individu utilisé ici est connue (analyse du profil chimique des individus, chapitre II, page 94). Cela permet de savoir au moins à quels glucosides cyanogènes s'attendre dans le réseau moléculaire, et constituent des molécules repères à chercher lors des analyses chimiques. Si ces molécules n'apparaissent pas cela peut orienter les pistes d'amélioration du protocole.

Echantillons	n	Lina	Lot	Epilo	Tét. B	Epivo	Tét. A	Tét. A énan.	Gyn	Dihy
<i>Dryas iulia</i>	20									
<i>Eueides isabella</i>	17									
<i>Heliconius aoede</i>	8									
<i>H. charithonia</i>	2									
<i>H. doris</i>	10									
<i>H. eleuchia</i>	2									
<i>H. erato</i>	28									
<i>H. hewitsoni</i>	3									
<i>H. melpomene</i>	25									
<i>H. sara</i>	20									
<i>Philaethria dido</i>	2									
Heliconiini	≈300									

Tableau 6 : Liste des 11 espèces et le mélange d'Heliconiini analysés en réseau moléculaire. Le nombre correspondant est le nombre d'extraits d'individus combinés pour obtenir l'échantillon représentatif de l'espèce et de la tribu. Les cases noircies indiquent la présence des glucosides cyanogènes détectés en LC-MS/MS dans ces individus et donc présents dans l'échantillon. Abréviations des glucosides cyanogènes déjà répertorié ; Lina : linamarine, Lot : lotaustraline, Epilo : épilotaustraline, Tét. B : tétraphylline B, Epivo : épivolkenine, Tét. A : tétraphylline A, Tét A. énan : stéréoisomère de la tétraphylline A (deidacline), Gyn : gynocardine et Dihy : dihydrogynocardine.

UHPLC-MS/MS

La séparation des échantillons a été menée à l'Université Paris Descartes sur une chaîne UHPLC UltiMate 3000 system (Dionex, Thermo Fisher Scientific) et une colonne C₁₈ (XBridge, 4,6 x 50 mm x 3,5 µm ; Waters) stabilisée à 21°C. Les solvants utilisés pour l'élution sont, phase A : eau déminéralisée et + 0.1% d'acide formique (HCOOH) et phase B : acétonitrile + 0.1% HCOOH. Le gradient utilisé au cours du temps est de : 1 – 5 min, linéaire 1% de phase B ; 5,0 – 7,5 min, linéaire 15% B ; 7,5 – 10,0 min, linéaire 25% B ; 10,0 – 12,5 min, linéaire 30% B ; 12,5 – 13,5 min, linéaire 90% B ; 13,5 – 14,5 min, isocratique 90% B ; 14,5 – 15,0 min linéaire 1% B ; 15,0 – 16,0 min , linéaire 1% B. Le débit est maintenu à 0,3 mL/min. Le débit est fixé à 0,2 mL/min et 5 µL par échantillon brute non dilué sont injectés. L'UHPLC est couplée à un spectromètre de masse hybride équipé d'une trappe d'ion linéaire associé à un détecteur Orbitrap (LTD Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific). La source d'ionisation par électronébulisation (notée ESI pour ElectroSpray Ionization) opère en mode positif. Les

spectres MS² sont acquis dans la gamme m/z 150 à 1000. En plus des 11 échantillons d'espèces de papillons, sont analysés : un échantillon « mixte » issu du mélange de centaines d'extraits bruts de papillons des 33 espèces d'Heliconiini, des blancs (méthanol), et une solution de glucosides cyanogènes standards (20 ng/μL de linamarine + 20 ng/μL de lotaustraline + 20 ng/μL d'amygdaline, Sigma Aldrich) pour affiner la méthodologie.

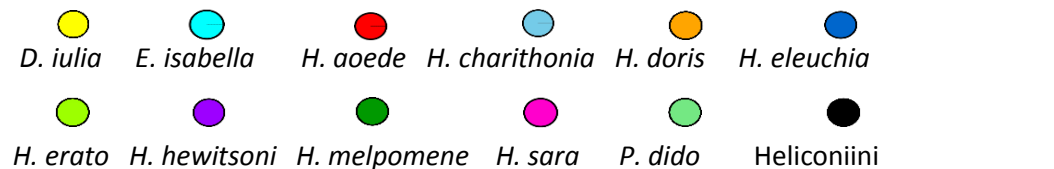
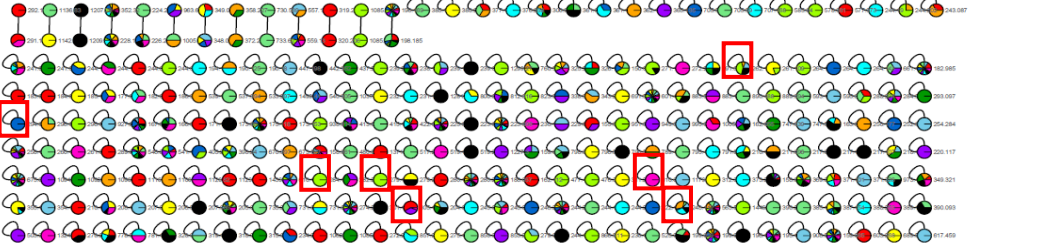
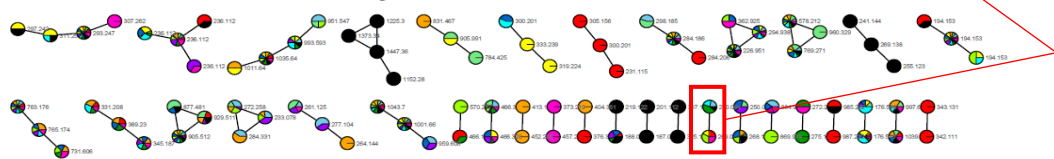
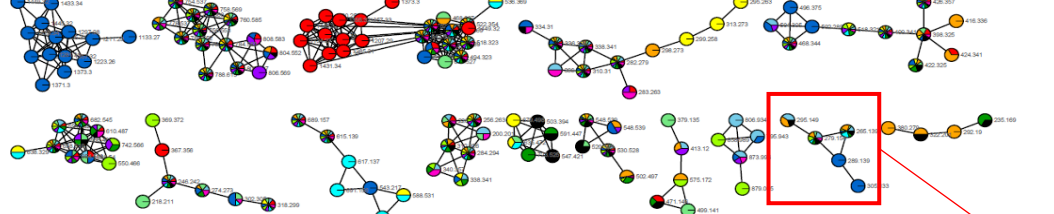
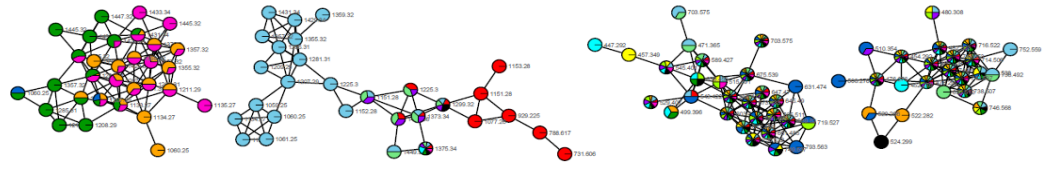
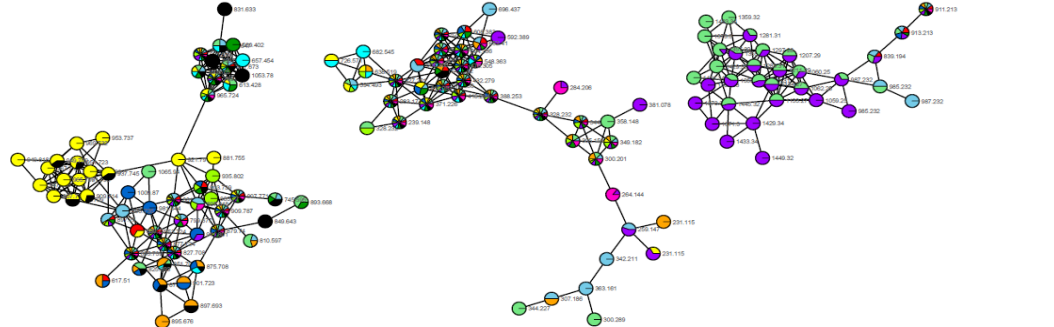
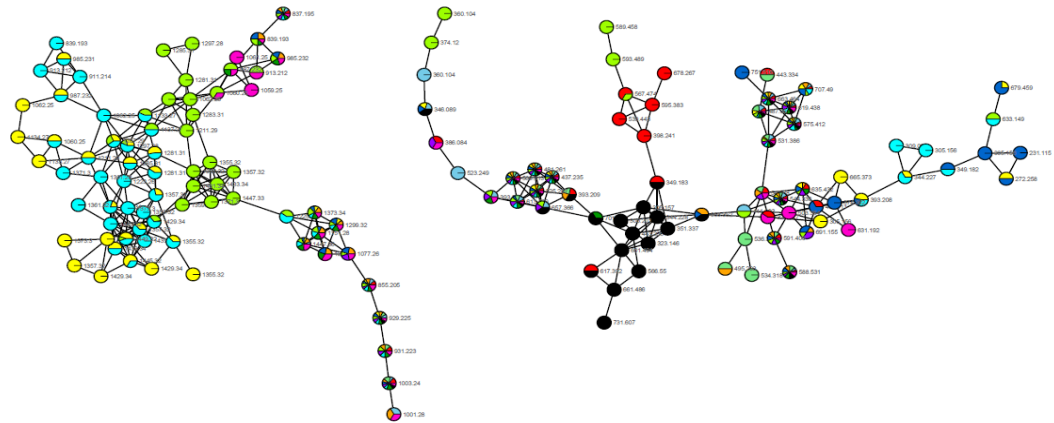
Construction du réseau moléculaire

Via le logiciel MSConvert 3.0.19039 ("ProteoWizard," 2019), les fichiers de sortie de l'UHPLC-MS/MS au format .raw sont convertis au format .mzml (qui contient les données de MS et MS² de chaque ion détecté dans l'échantillon). Ces données sont déposées sur le serveur MassIVE Public Dataset ("MassIVE," 2019) de la plateforme GNPS via un logiciel de transfert de fichier d'un ordinateur vers un serveur (WinSCP, client FTP *File Transfer Protocol*). Sur le serveur MassIVE ces données sont publiques et archivées sous la référence MSV000083477. Le réseau moléculaire peut être prévisualisé en ligne sur GNPS, avant d'être téléchargé et mis en forme hors ligne avec le logiciel Cytoscape 3.7.1 ("Cytoscape," 2019). Les spectres MS² dont le cosinus de similarité (CS) est supérieur à 0,65 sont schématisés sous forme de nœuds. Si deux spectres MS² ont quatre ions minimums en commun et un CS > 0,65 alors une connexion entre les nœuds se dessine. Un nœud est coloré en fonction de l'échantillon biologique dans lequel l'ion a été détecté. Un nœud monochrome signifie que l'ion est détecté dans un seul des échantillons. En revanche un nœud peut avoir plusieurs couleurs associées (camembert) car un même ion peut être présent dans plusieurs échantillons.

RESULTATS ET DISCUSSION

Lors d'un premier essai les échantillons de papillons étaient dilués au 1/50 dans du méthanol pur. Les glucosides cyanogènes censés être présents n'étaient visibles ni dans les chromatogrammes, ni dans le réseau moléculaire. Après vérification, ces molécules sont bien présentes dans les échantillons mais en trop faible concentration pour être sélectionnées et fragmentées par le spectromètre de masse. Le dispositif et les appareils UHPLC-MS/MS utilisés ont en effet une résolution extrêmement élevée (détermination pointue des rapports m/z des ions) mais en contrepartie une sensibilité basse. Un second essai avec les échantillons bruts non dilués a permis la visualisation de certains glucosides cyanogènes candidats (Tab. 6) dans le réseau moléculaire (Fig. 31A). Le réseau moléculaire ne permet pas de discriminer les énantiomères ou les stéréoisomères très proches structuralement, qui ont des temps de rétention différents mais qui fragmentent de la même façon. Leurs spectres MS^2 sont donc identiques mais les molécules sont représentées sous des nœuds distincts et très proches dans le réseau moléculaire. Ainsi, il n'est pas possible de faire la différence entre les stéréoisomères déjà connus pour être présents dans les extraits de papillons : lotaustraline/épilotaustraline, tétraphylline B/épivolkenine et tétraphylline A/probablement la deidacline.

A



B

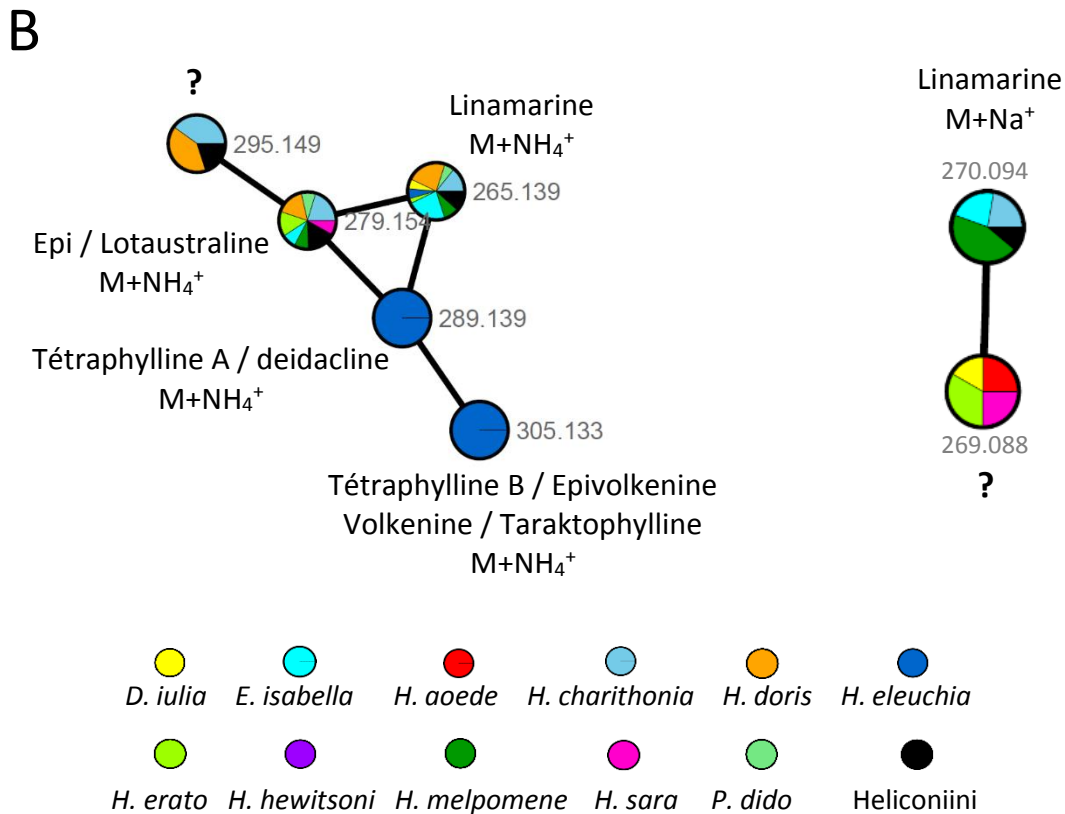


Figure 31 : A) Visualisation globale du réseau moléculaire des Heliconiini. Les glucosides cyanogènes connus sont encadrés en rouge. Les composés isolés sont des ions de linamarine, lotaustraline/épilotaustraline, tétraphylline A/deidaclin et tétraphylline B/épiVOLKENINE et peut être deux autres stéréoisomères. B) Agrandissements des deux clusters des glucosides cyanogènes. L'origine des molécules est codée par une couleur et le pourcentage de chaque couleur reflète la proportion relative dans les échantillons biologiques. Un nœud multicolore indique qu'une même molécule est présente dans plusieurs échantillons.

Beaucoup de clusters et d'ions isolés ont été détectés. Au total, ce réseau regroupe 880 spectres soit moins de 880 molécules car une même molécule peut être présente sous différents ions (par exemple la linamarine M+Na⁺ ou M+NH₄⁺). Les masses des ions glucosides cyanogènes candidats (connus chez les Heliconiini ou synthétisés par les passiflores) ont été calculées et recherchées manuellement. Par exemple l'ion de la linamarine associé avec un

proton : $M+H^+$ est isolé, $M+Na^+$ est similaire à un ion inconnu, et la linamarine $M+NH_4^+$ est similaire à d'autres glucosides cyanogènes eux aussi complexés à un cation ammonium (Fig. 31B). L'ion de rapport m/z de 305.133 peut correspondre à la tétraphylline B ou à l'épivolkenine connus pour être présents chez les Heliconiini, mais cette masse peut également correspondre aux stéréoisomères volkenine ou taraktophylline, deux autres glucosides cyanogènes cyclopenténoïques synthétisés par les passiflores (Jaroszewski *et al.*, 2002). Certains glucosides cyanogènes comme la tétraphylline B ou l'épivolkenine sont censés être retrouvés dans six échantillons testés, or ils n'apparaissent ici que dans l'échantillon d'*H. eleuchia*. Cela pourrait être dû à la sensibilité de l'appareil et/ou à des différences de concentrations importantes entre ces échantillons puisque de grandes variations inter et intraspécifiques existent en termes de défenses chimiques (Chap. II). Par ailleurs, les rares molécules annotées par GNPS, principalement issues du métabolisme primaire, sont : l'acide aminé L-arginine (*H. aoede*), la coprostanone (*E. isabella*, *H. aoede*, *H. doris*, *H. erato* et *H. sara*) et l'acide octadécénoïque (*H. aoede*, *H. hewitsoni* et *H. sara*). Deux ions de masses 269,088 et 295,149 ont des structures proches de celles des glucosides cyanogènes, puisqu'elles apparaissent dans les deux mêmes petits clusters mais restent non identifiés (Fig. 31B). L'ion 269,088 est proche de la linamarine à une unité près. Cet ion pourrait être la linamarine modifiée où un groupe NH_2 remplace un groupe OH . Quant à l'ion 295,149 (masse de la lotaustraline plus 16, ce qui correspond à la masse d'un atome d'oxygène) il pourrait être composé d'oxydation de la lotaustraline ou potentiellement correspondre au sachalosite V complexé à un cation NH_4^+ . Le sachalosite V est un glucoside cyanogène cyclopenténoïque dérivé de l'isoleucine qui n'a jamais été répertorié chez un papillon ou une passiflore et dont l'identification n'est pas vérifiée ici. Le sachalosite V a été inventorié dans certaines plantes des genres *Rhodiola* (Crassulaceae), *Ribes* (Grossulariaceae) et *Jatropha* (Euphorbiaceae) et *Lotus* (Fabaceae) qui sont les plantes hôtes des zygènes, papillons aposématistes séquestrant des glucosides cyanogènes (Nakamura *et al.*, 2007; Bjarnholt & Møller, 2008).

PERSPECTIVES

Dans les conditions de l'expérience, le réseau moléculaire a permis de visualiser quelques glucosides cyanogènes normalement présents dans les échantillons, mais pas d'identifier d'autres composés. En effet, le gynocardine et dihydrogynocardine n'ont pas été détectés, et la nature des deux ions inconnus regroupés avec les glucosides cyanogènes (de $m/z = 269,088$ et $m/z = 295,149$) reste très hypothétique. Les masses correspondant à d'autres glucosides cyanogènes de passiflores (aliphatiques : linustatine, néolinustatine ; cyclopenténoïques : passibiflorine, passicapsine, passitriasciatine, passieduline ; aromatiques : prunasine, amygdaline) et aux alcaloïdes β -carbolines (harmane et harmine) séquestrés par les papillons ont été cherchées mais pas trouvées. Même à partir des échantillons bruts non dilués, les molécules restent en trop faible concentration, ce qui explique le nombre réduit d'ions fragments dans les spectres MS^2 . Ces spectres peu fournis limitent GNPS dans la comparaison avec les spectres annotés des bases de données. Malgré la quantité de spectres de références disponibles dans les bases de données, il est possible que les glucosides cyanogènes ou métabolites de papillons restent peu documentés ce qui compromettrait l'identification des composés des échantillons. Des pistes existent pour tenter d'améliorer les résultats de cette étude exploratoire. L'évaporation d'une partie du méthanol des échantillons permettrait d'augmenter la concentration des molécules et la qualité des spectres MS^2 . Le réglage des paramètres d'analyse en spectrométrie de masse pourrait également être testé, comme par exemple l'augmentation de l'énergie de collision pour augmenter le nombre d'ions fragments par spectre MS^2 .

Cette méthodologie intéressante a encore besoin d'être affinée et pourrait plus tard être utilisée pour explorer d'autres familles de molécules comme les alcaloïdes β -carbolines ou la grande diversité des alcaloïdes pyrrolizidiniques et des alcaloïdes pyrrolizidiniques oxydés des Ithomiini (Chap. V). Il y a chez cette tribu mimétique de certains *Heliconius*, environ 80 de ces molécules de défense candidates, dont beaucoup de stéréoisomères.

Localisation des glucosides cyanogènes chez les *Heliconius* adultes via l'imagerie par spectrométrie de masse

Le but de ce travail était de visualiser la répartition spatiale des différents glucosides cyanogènes au sein des papillons adultes et d'en préciser les voies d'acquisition et de stockage, grâce aux performances exceptionnelles de l'imagerie métabolique par spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions (IMS-FT-ICR : *Imaging Mass Spectrometry-Fourier Transformation-Ion cyclotronic Resonance*) (Marshall *et al.*, 1998). L'imagerie par spectrométrie de masse a déjà fait ses preuves dans l'élucidation de l'identification et de la répartition d'un métabolite original de détoxification chez le ver de terre (*Lumbricus rubellus*) (Liebeke *et al.*, 2015), et la répartition des glucosides cyanogènes dans le fruit du lin (*Linum usitatissimum*) (Dalisy et al., 2015). Ces derniers travaux ont permis de montrer que la linustatine se situe dans l'endosperme et les tissus embryonnaires, alors que la linamarine et la lotaustraline sont présentes dans l'ensemble du réceptacle (Fig. 32).

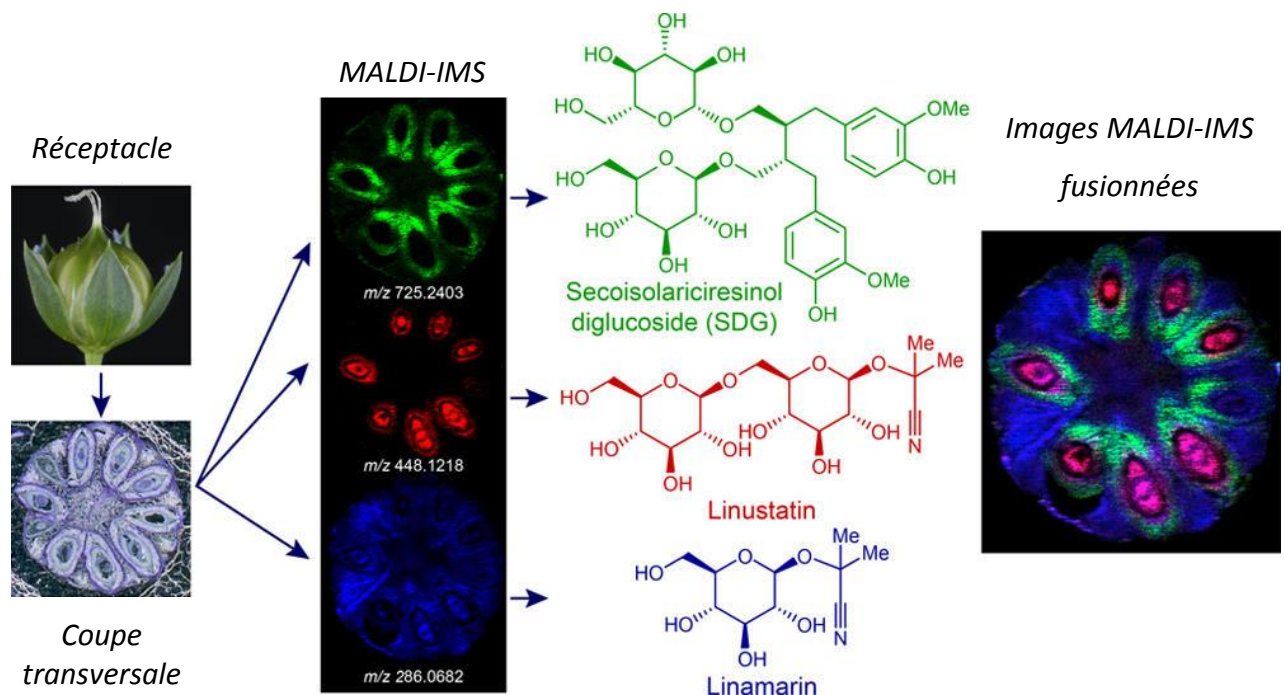


Figure 32 : Localisation des glucosides cyanogènes dans le fruit du lin (*Linum usitatissimum*). Photographie du réceptacle intact, coupe histologique au microscope optique. Répartition des différents ions en imagerie par spectrométrie de masse par ionisation de désorption laser avec matrice (MALDI-IMS). Fusion des différentes images. Figure d'après Dalisy *et al.* (2015).

La technologie IMS-FT-ICR permet de mesurer avec une précision pointue les masses parfois extrêmement proches des glucosides cyanogènes *in situ* dans un échantillon très complexe. N'ayant pas de standard de référence pour tous les glucosides cyanogènes, il est nécessaire d'utiliser une machine à très haute résolution car les molécules sont identifiées sur la base de leur rapport masse sur charge (m/z) et la façon dont elles fragmentent.

La première étape de préparation d'échantillons consiste en la réalisation de coupes fines sur les organes ou tissus congelés avec un cryotome. La coupe histologique est transférée sur une lame ayant une fine couche d'oxyde d'indium et d'étain (lame ITO) qui améliore la conductivité et l'ionisation des molécules. La lame est ensuite déposée dans le spectromètre de masse, et la zone à analyser est délimitée par ordinateur. Un faisceau laser balaye la coupe point par point (Fig. 33). Plus les points sont rapprochés et nombreux, plus la résolution de l'image sera fine, ce qui en contrepartie rallonge le temps d'analyse. En chaque point, le laser percute la surface de la coupe et désorbe les molécules qui sont ionisées et analysées en spectrométrie de masse (McDonnell & Heeren, 2007). Pour une analyse en FT-ICR, les ions éjectés de l'échantillons biologiques sont piégés par un champ magnétique dans la cellule ICR du spectromètre de masse. Dans cette cellule, les ions rentrent en mouvement cyclotronique dont la fréquence de rotation dépend uniquement du champ magnétique et du rapport m/z . La fréquence de rotation est inversement proportionnelle au rapport m/z (un ion avec un faible mouvement cyclotronique a un m/z et donc une masse moléculaire élevée, et inversement) (Scigelova *et al.*, 2011). En chaque point de la coupe histologique, une moyenne de spectres MS^2 est enregistrée (Fournier, 2007). Par traitement informatique, il est alors possible d'identifier différents marqueurs organiques et inorganiques et de générer simultanément l'image de leur distribution spatiale.

Plusieurs défis étaient à relever dans ce projet, mais le majeur d'entre eux a été de réaliser des coupes de papillon en préservant l'intégrité des tissus et la répartition des glucosides cyanogènes. En tranchant les papillons le risque est en effet de mettre en contact les glucosides cyanogènes avec leur enzyme la β -glucosidase. La dégradation enzymatique des glucosides cyanogènes les rendraient indétectables lors de l'analyse. De plus, le corps du papillon et ses organes sont extrêmement fragiles, avec des téguments relativement durs qui rendent la coupe difficile, ce qui n'est pas le cas avec des coupes d'organes mous plus

courantes. Pour faciliter la coupe, un fixateur chimique est souvent utilisé, mais pour une analyse en spectrométrie de masse, cette manipulation risquerait d'interagir avec les métabolites d'intérêt ou de perturber l'analyse.

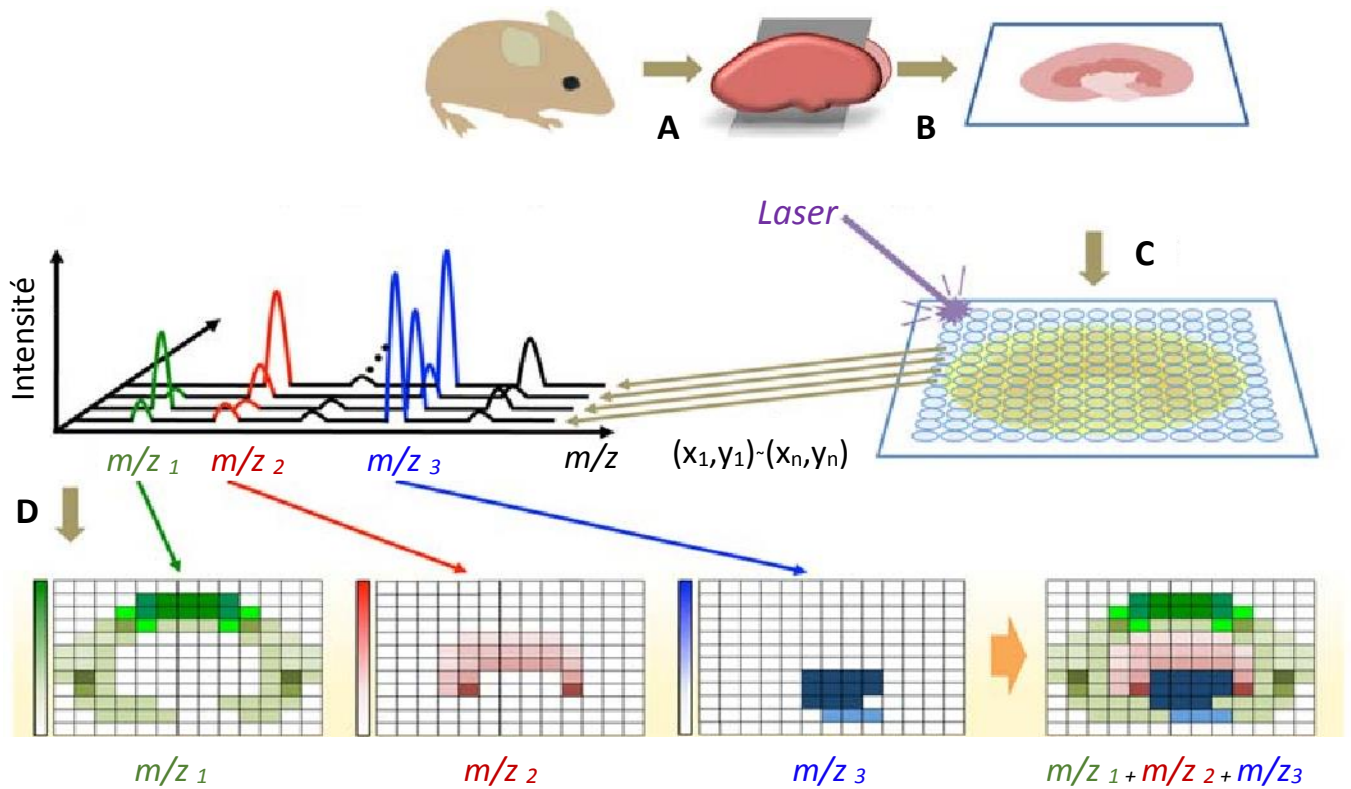


Figure 33 : Schématisation du principe de l'imagerie par spectrométrie de masse. A) sacrifice et dissection si besoin de l'échantillon, B) congélation et coupe des tissus au cryotome, C) dépôt de la coupe sur une lame de microscope, définition des zones à balayer au laser et enregistrement des spectres MS^2 en chaque coordonnée de la coupe, D) visualisation de la répartition des ions d'intérêt indépendamment ou simultanément. Schéma modifié d'après Fujimura & Miura, (2014).

MATERIELS ET METHODES

Papillons

Pour les besoins de l'expérience, les échantillons doivent être le plus frais possible pour préserver l'intégrité des structures internes. Les papillons doivent être vivants et sacrifiés au dernier moment. Les individus capturés au Pérou et conservés dans le méthanol n'étant pas

adaptés, des chrysalides d'*Heliconius* mais aussi de papillons de la tribu des Ithomiini sont commandées sur internet auprès de Stratford Butterfly Farm (www.tropicalbutterflypupae.com). Le choix des espèces est dépendant des disponibilités du fournisseurs. Un fois reçues, les chrysalides sont suspendues dans une cage (100 x 50 x 80 cm) régulièrement humidifiée et dans une pièce à température ambiante. Les adultes sont nourris avec un mélange d'eau, de sucre et de pollen jusqu'au jour des analyses où ils sont sacrifiés (Fig. 34). L'accès aux *Heliconius* étant limité, les premières mises au point du protocole de fixation et de coupe se font en utilisant des noctuelles méditerranéennes (*Spodoptera littoralis*, Noctuidae). Ces papillons ravageurs de cultures sont élevés en routine au département d'écologie sensorielle de l'Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris, où les coupes sont réalisées.

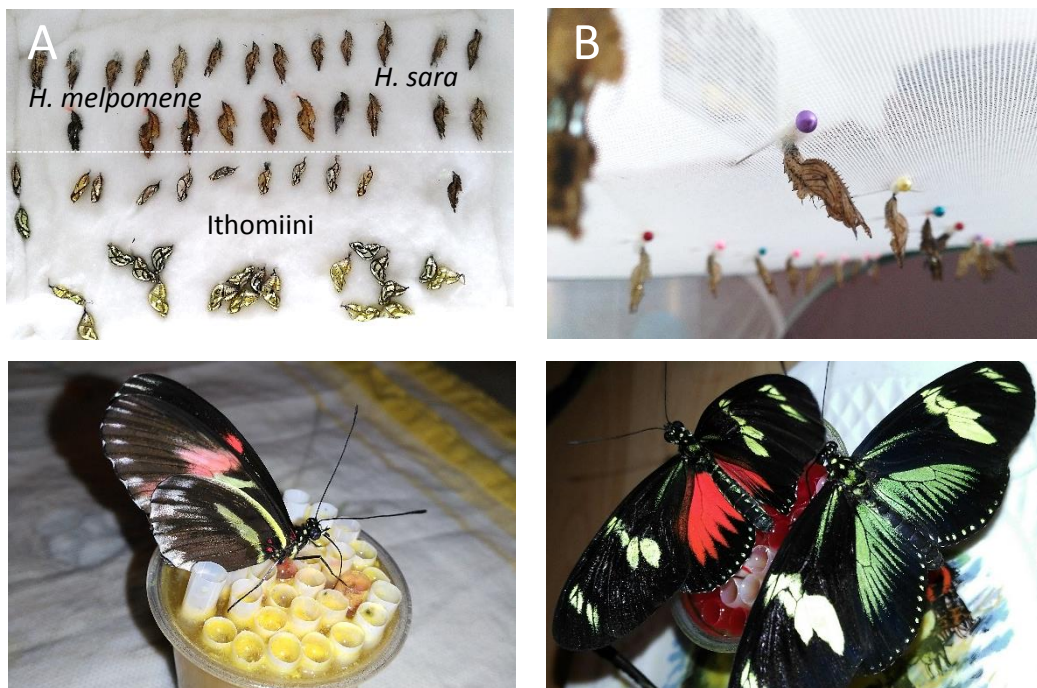


Figure 34 : Elevage de papillons pour le projet d'imagerie. A) Réception des chrysalides d'*Heliconiini* et de la tribu des *Ithomiini*, B) suspension des chrysalides dans une cage. Nourrissage des adultes C) *Heliconius melpomene* et D) *Heliconius doris*. Photos : Ombeline Sculfort.

Dissection des papillons adultes

Les individus sont étourdis au froid au réfrigérateur. Avec des petits ciseaux, les ailes sont coupées et non conservées, le corps est ensuite disséqué en trois : tête, thorax et abdomen.

Fixation chimique des échantillons

La fixation chimique consiste à reconstituer le gel protéique très hydraté du papillon lorsqu'il est vivant. Le fixateur va immobiliser les molécules et les rendre insolubles dans l'eau et les solvants organiques. Cette étape permet de bloquer les réactions enzymatiques et d'éviter toute modification structurelle. Ne pas ajouter de fixateur à l'échantillon a également été testé (Tab. 7).

Le paraformaldéhyde (PFA) est un fixateur chimique très courant en microscopie électronique (Wigglesworth, 1958; Ott, 2008; Gordon *et al.*, 2019). C'est une forme polymérisée et pure du formaldéhyde (formol) qui réagit avec les chaînes latérales des protéines pour former des groupements hydroxy-méthyl. Les étapes de fixation sont :

- Immerger chaque échantillon du PFA à 4 % dilué dans tampon phosphate (PBS)
- Laisser 1h sous agitation à température ambiante
- Pour le lavage : éliminer le fixateur (PFA/PBS) et remplacer par du PBS
- Laisser 15min sous agitation à température ambiante
- Renouveler l'opération

Le second fixateur testé est le saccharose, un disaccharide, soit une combinaison d'un glucose et d'un fructose. Cette molécule pénètre dans l'échantillon et assure un bon maintien des tissus. Pour se faire, les échantillons baignent dans du saccharose à 10% ou 18% dilué dans le PBS, pendant 24h au réfrigérateur.

Surgélation et choc thermique

L'intérêt d'une surgélation est évalué. Les échantillons peuvent être plongés dans un bain d'isopentane (-130°C) ou d'hexane (-95°C) refroidi par de l'azote liquide (-195°C). Le choc thermique provoque une surgélation immédiate et fige et durcit les échantillons.

Enrobage

Englober l'échantillon dans une matrice d'enrobage permet en générale de faciliter la découpe. Le premier agent d'enrobage testé est « un milieu de température optimale de coupe » communément appelé OCT pour Optimal Cutting Temperature (Qpath Tissue OCT, VWR chemical). C'est un liquide très visqueux et incolore à température ambiante, qui devient blanc en se solidifiant au froid. L'échantillon à découper est collé à sa base avec de l'OCT à la

plaque de découpe, puis complètement recouvert d'OCT et mise quelques minutes au froid afin que l'enrobage solidifie.

En s'inspirant des données de la littérature et de l'article de Dalisay *et al.* (2015, voir Fig. 32), un enrobage à l'agarose a également été essayé. L'agarose en poudre (low melting NuSieve GTG, Cambrex) est mélangée à l'eau pour une concentration finale de 5% ou 15%. Le mélange est chauffé quelques secondes au micro-onde et remué pour un aspect final homogène avec le moins de bulle d'air possible. L'échantillon biologique est placé dans moule conçu sur mesure où l'agarose tiède est coulé puis refroidi.

Congélation

L'échantillon peut être congelé, et plusieurs méthodes sont testées : bain d'azote liquide (-195°C), conservation au congélateur à -20°C ou à -80°C. Cette étape permet de rendre les échantillons durs et denses ce qui peut faciliter l'obtention de coupes histologiques correctes.

Coupe transversale des papillons

Les échantillons sont fixés sur la plaque de découpe et découpés sur un cryotome CM1860 UV, Leica. La température est fixée à -32°C, soit la température la plus basse possible avec l'appareil, pour éviter le réchauffement des échantillons. Différentes tailles de coupes transversales sont testées, en cherchant à obtenir les coupes les plus fines possibles. Les coupes sont transférées sur une lame ITO et conservées au réfrigérateur.

Etapes	Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fixation	PFA	X	X										
	Saccharose		18%	10%									
Surgélation	Isopentane				X								
	Hexane					X							
Enrobage	OCT	X	X	X	X		X	X					
	Agarose								5%	15%	15%	15%	15%
Congélation	Azote liquide								X	X			
	Congélateur							-80°C (15h)			-80°C (1h30)	-80°C (72h)	-80°C (5j)

Tableau 7 : récapitulatif des différentes combinaisons testées.

Spectromètre de masse

Les coupes peuvent être recouvertes d'une matrice, qui peut faciliter l'ionisation des molécules. L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque est une matrice classiquement utilisée en imagerie par spectrométrie de masse. Pour tester la pertinence de cette étape, deux concentrations de standards sont testées : 2 mg/mL et 2 µg/mL, avec et sans matrice. Des standards commerciaux de linamarine et amygdaline (SigmaAldrich) en poudre sont dilués dans l'eau et déposés sur une lame ITO. Après évaporation de l'eau, la matrice en solution est déposée avec une pipette et les échantillons sont analysés une fois la lame sèche. En France, sept machines permettent de faire de l'imagerie par spectrométrie de masse en FT-ICR. Ce projet a été validé par la Fédération de recherche TGE FT-ICR (FR 3624) pour être réalisé sur l'instrument disponible à l'Ecole Polytechnique de Palaiseau. L'imagerie se déroule au Laboratoire de Chimie Moléculaire en utilisant le spectromètre Bruker Solarix XR 9.4 Tesla. La source Laser Désorption Ionisation (LDI) est en mode positif. Le laser se déplace par pas de 20 µm sur la coupe. La puissance du faisceau est réglée à 25% et la taille du faisceau est minimale pour augmenter la résolution de l'image. A chaque coordonnée de la coupe, le laser tire 600 fois à une fréquence de 2000 Hz. Les paramètres du guidage des ions sont optimisés pour les ions de faibles m/z ; énergie dans la cellule de collision de -2,5 V, temps de vol depuis la cellule de collision jusqu'à la cellule ICR de 0,7 ms et masse Q1 de 150 m/z . La gamme de masse recherchée est de 101,05 à 2000 m/z et la taille des données de 1 Mpts ce qui donne un temps de détection des ions dans la cellule ICR de 0,3670 seconde. Les données sont sauvegardées en format FID pour un retraitement allégé. Pour une diminution du bruit de fond, les spectres profils sont réduits d'un facteur de 97%. Les images sont traitées avec le logiciel PeakByPeak développé par l'entreprise SpectroSwiss avec qui une collaboration est formée. SpectroSwiss élabore des logiciels d'analyse d'image en spectrométrie et fournit une licence d'utilisation de son logiciel en échange de coupe de papillons sur lesquelles mettre au point leurs travaux.

RESULTATS ET DISCUSSION

Coupes transversales de papillons

Est présentée ici une liste non exhaustive des coupes réalisées lors des différents essais, afin de trouver un protocole optimal de coupe.

En présence de fixateurs

Essai 1 sur Tithorea harmonia (Ithomiini, Nymphalidae)

Le PFA seul ne permet pas l'obtention de coupes nettes. Les tissus se découpent mal et sont craquelés à cause des changements de températures subis (Fig. 35).

Essai 2 sur Heliconius doris

Les tissus se découpent assez bien sauf le thorax qui est assez gros. Le saccharose aide au bon maintien des tissus mais reste en petites couches (Fig. 36). Le PFA pourrait dénaturer les glucosides cyanogènes en réagissant avec les fonctions diol des glucosides et ne sera donc pas utilisé par la suite.

Essai 3 sur Tithorea harmonia

Sans PFA et avec une plus faible teneur en saccharose, les coupes ne sont pas améliorées (Fig. 37). Pour certaines parties, comme le thorax, il n'a pas été possible d'obtenir une seule coupe. Les changements de température dégradent les coupes et fissurent les tissus.

Impact de la surgélation des tissus

Essai 4 sur Heliconius sara

Le bain de pentane couplé à la matrice OCT ne donne pas de bons résultats, surtout au niveau de l'abdomen (Fig. 38). Les corps sont très difficiles à couper proprement.

Essai 5 sur Spodoptera littoralis

Les tissus n'étaient pas adaptés pour des coupes transversales et le bain d'hexane a fissuré l'abdomen. Aucune coupe n'a été possible (Fig. 39).

Les protocoles 1 à 5 testés et présentés ici ne réunissent pas les conditions pour réaliser des coupes correctement. Les changements de température entre les étapes dégradent et craquèlent les tissus. Les fixateurs PFA et saccharose ainsi que les étapes de surgélation ne sont pas retenus. En effet bien que le PFA permettent une bonne fixation des tissus, il pourrait

interagir avec les glucosides cyanogènes et le saccharose reste déposé dans les intersites des coupes. La surgélation des tissus n'a pas permis d'obtenir des coupes nettes. La mise au point du protocole de coupe se poursuit en supprimant ces deux étapes.

Mise au point de coupes sans fixation ni surgélation

*Essai 6 sur *Tithorea tarricina* et essai 7 sur *Heliconius melpomene**

Une coupe de tête 19 µm d'épaisseur est réalisée lors de l'essai 6 mais en très mauvais état (Fig. 40). En n'utilisant que l'agent d'enrobage OCT les coupes se tiennent mal. Afin de les densifier, une étape de congélation à -80°C est testée lors de l'essai 7 et une coupe de trachée de 20 µm présentée (Fig. 41). La congélation améliore la découpe mais en fondant l'OCT entraîne des particules et déplace potentiellement les glucosides cyanogènes. En imagerie, les essais de coupes enrobées dans l'OCT ne sont pas exploitables car cette matrice émet énormément d'ions parasites (alcools de polyvinyles, polyéthylène glycol, résines non réactives) qui brouillent les spectres MS². Pour des analyses en imagerie par spectrométrie de masse, l'OCT n'est pas une matrice appropriée et d'autres techniques d'enrobage sont donc explorées.

L'agarose en guise de matrice d'enrobage alternative à l'OCT

*Essai 8 sur *Spodoptera littoralis**

En s'inspirant de la méthodologie utilisée par Dalisay et al. (2015), l'agarose est testée en tant que matrice d'enrobage des coupes (Fig. 42). L'agarose est un agent d'enrobage prometteur mais trop souples et pas assez dense à 5%.

*Essai 9 sur *Spodoptera littoralis**

L'agarose à 15% paraît bien mieux adapté qu'à 5%. Les coupes peuvent être assez fines mais souvent déchirées ce qui porte préjudice à leur intégrité (Fig. 43).

*Essai 10 sur *Spodoptera littoralis**

Les échantillons se coupent relativement bien, en revanche les solutions aqueuses internes du papillon cristallisent lors de la congélation (Fig. 44).

Essai 11 sur Heliconius melpomene

L'agarose permet d'obtenir de jolies coupes mais une fois en dehors du cryotome elles se réchauffent ce qui entraîne la formation de fissures dans les tissus à cause des variations de température (Fig. 45).

Essai 12 sur Heliconius melpomene

Ce dernier protocole testé permet de réaliser des coupes plutôt nettes. Il est possible d'obtenir des coupes de thorax entier avec le vaisseau dorsal (VD) et le ganglion nerveux (G), les coupes d'abdomen ne sont pas forcément déchirées ou craquelées (Fig. 46).

Les coupes avec des craquelures mettent en cause les conditions expérimentales et les variations de températures rencontrées. En général la tête reste la partie la plus difficile à couper. Le dernier protocole testé, avec enrobage dans l'agarose à 15% et congélation à -80°C pendant plusieurs jours, offre jusqu'à présent les meilleurs résultats. Il est nécessaire d'approfondir et d'améliorer ce protocole car les conditions de coupe ne sont pas idéales et il faut tout de même beaucoup d'essais avant d'obtenir une coupe entière et correcte.

En présence de fixateurs

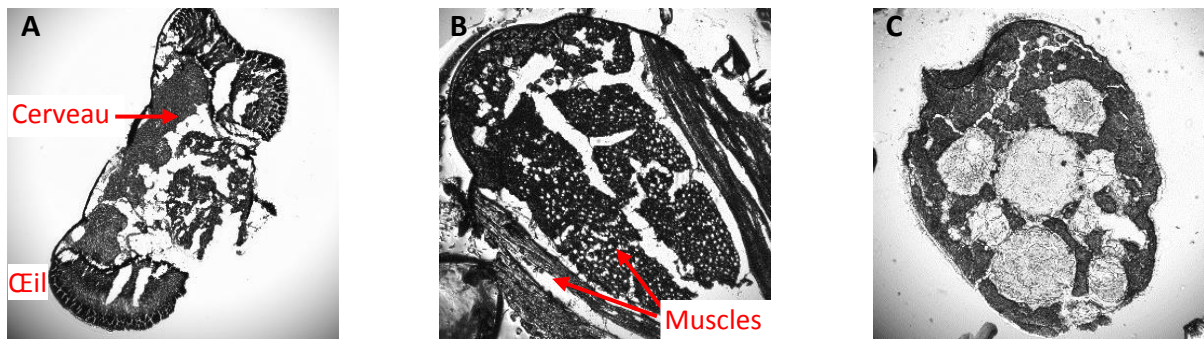


Figure 35 : Coupes de *T. harmonia*. A) Tête, 25 μm d'épaisseur, B) thorax 60 μm , C) abdomen 25 μm .

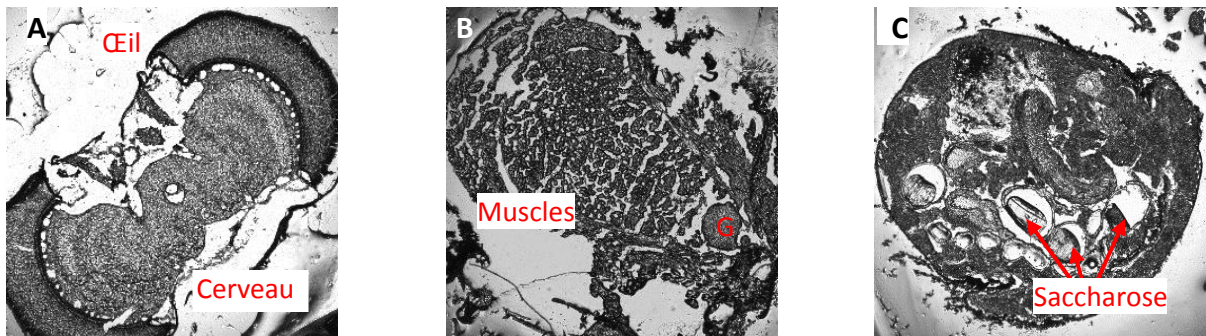


Figure 36 : Coupes d'*H. doris*. A) Tête, 20 μm d'épaisseur, B) thorax 25 μm , G : ganglion nerveux thoracique C) abdomen 20 μm . Le saccharose qui remplit les interstices et cavités du papillons, se rétracte au froid et forme une gelée à la coupe.

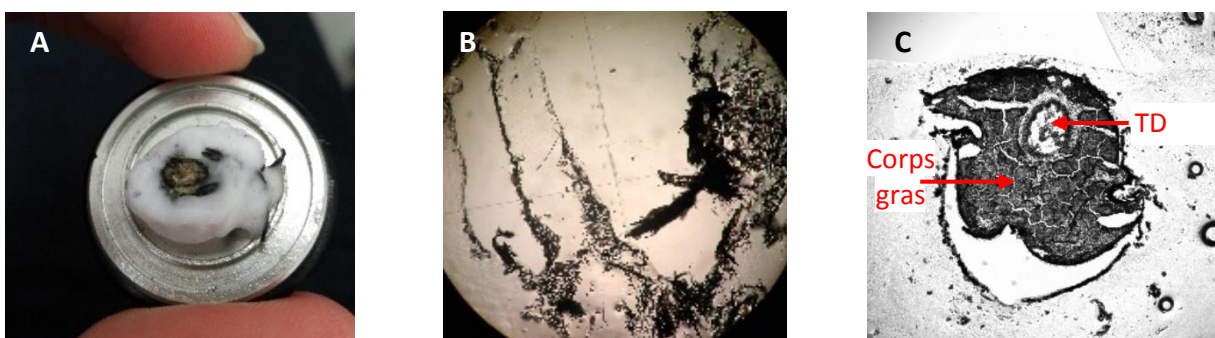


Figure 37 : Essai sur *T. harmonia*. A) Montage du thorax dans l'OCT, B) échec de coupe, uniquement de l'OCT C) abdomen 25 μm , TD : tube digestif, et corps gras craquelé par les variations de températures.

Impact de la surgélation des tissus

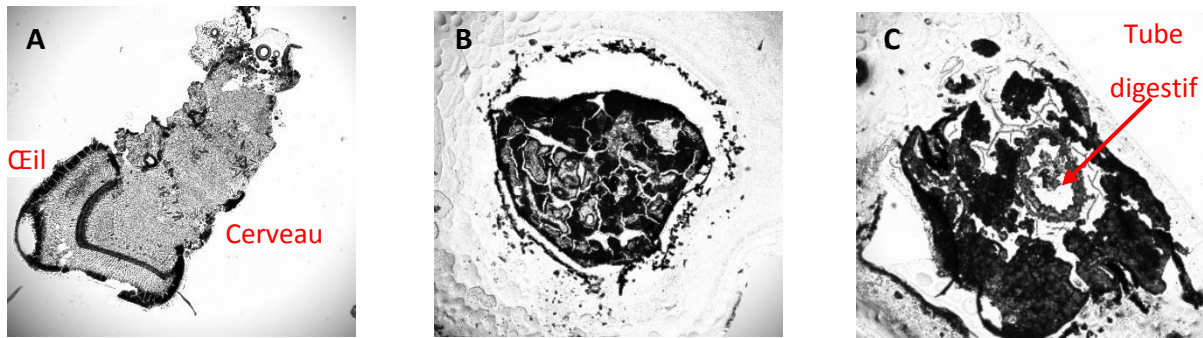


Figure 38 : Essai sur *H. sara*. A) Tête, 18 µm d'épaisseur, B-C) abdomen 20 µm

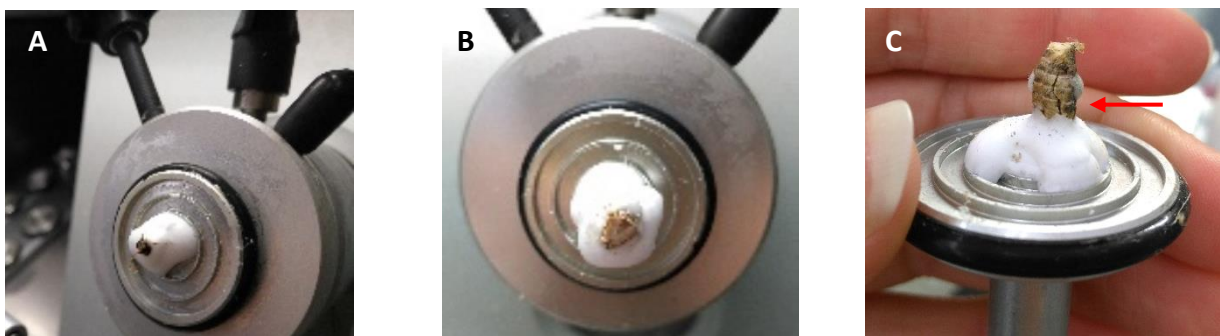


Figure 39 : Essai sur *S. littoralis*. A) Montage de la tête, B) du thorax et de C) l'abdomen fissuré dans l'OCT.

Mise au point de coupes sans fixation ni surgélation

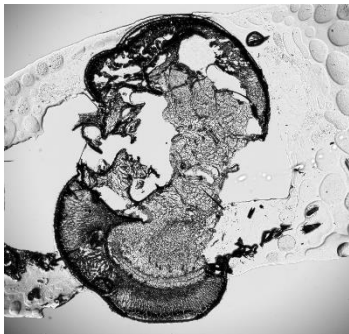


Figure 40 : Essai sur *T. tatticina*. Coupe de tête de 19 µm d'épaisseur. Peu de coupes ont pu être réalisées. Les tissus ne se tiennent pas et se déchirent au passage de la lame du cryotome.

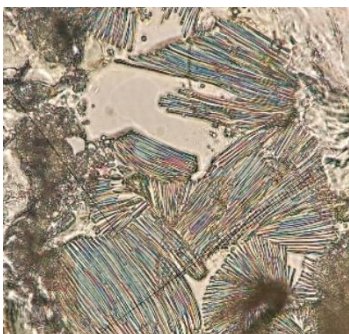


Figure 41 : Essai sur *H. melpomene*. La congélation densifie les tissus qui se tiennent un peu mieux que précédemment mais ils ne sont pas plus faciles à couper. Coupe de trachées, 20 µm d'épaisseur.

L'agarose en guise de matrice d'enrobage alternative à l'OCT

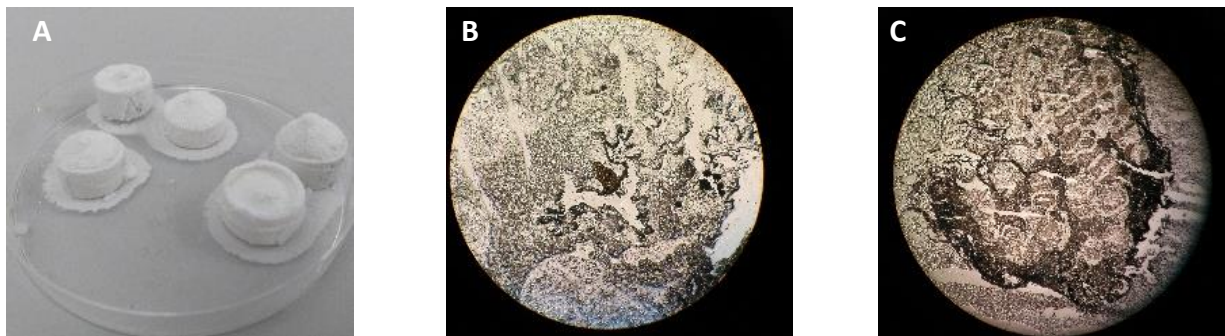


Figure 42 : Essai sur *S. littoralis*. A) Moules faits sur mesure pour l'inclusion des échantillons dans l'agarose. Les moules sont blanchis et congelés par le bain d'azote liquide. Coupes d'abdomen à B) 20 μm et C) 25 μm d'épaisseur.

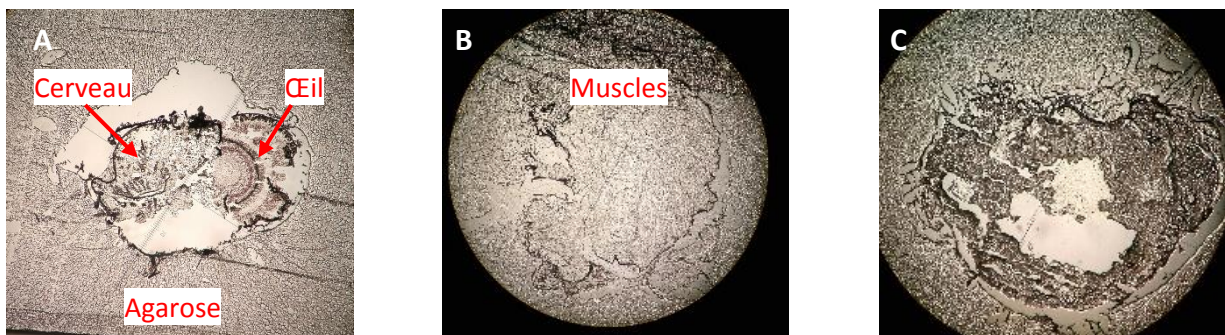


Figure 43 : Essai sur *S. littoralis*. A) Tête, 10 μm d'épaisseur, B) thorax 10 μm , C) abdomen 19 μm .

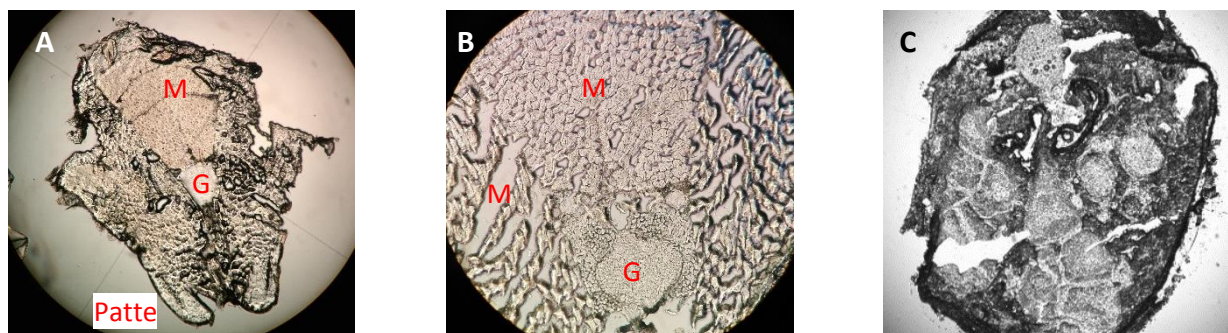


Figure 44 : Essai sur *S. littoralis*. Coupe de thorax à A) 40 μm d'épaisseur et B) 17 μm , C) abdomen à 19 μm . Les lettres signifient ; M : muscles, P : pattes et G : ganglion nerveux thoracique.

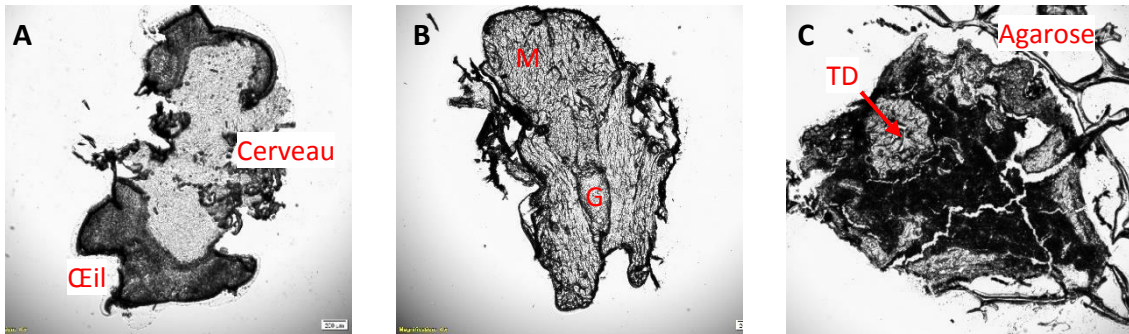


Figure 45 : Essai sur *H. melpomene*. A) Tête, 15 μm d'épaisseur, B) thorax 30 μm , G : ganglion nerveux thoracique C) abdomen 25 μm .

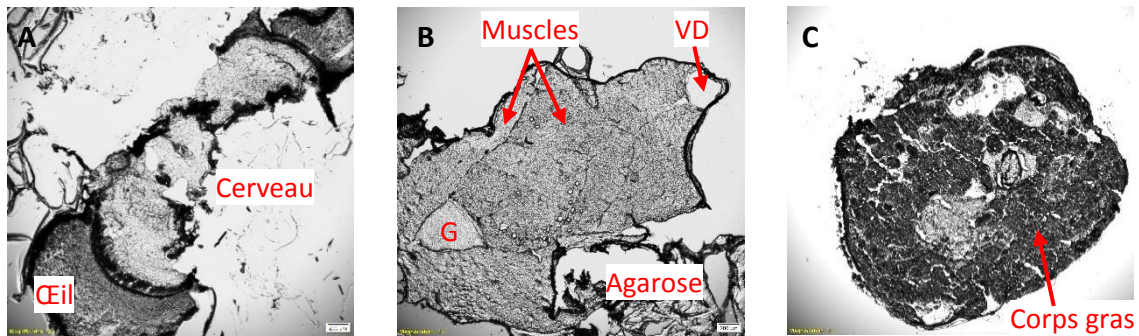


Figure 46 : Essai sur *H. melpomene*. A) Tête, 25 μm d'épaisseur, B) thorax 16 μm , G : ganglion nerveux thoracique C) abdomen 20 μm .

Imagerie par spectrométrie de masse (IMS)

Les glucosides cyanogènes standards linamarine et amygdaline sont aussi bien ionisés et détectés avec et sans matrice. L'ajout d'une matrice n'est donc pas indispensable pour visualiser les glucosides cyanogènes. Les quelques coupes de papillons analysés en IMS (Fig. 47) ne sont donc pas supplémentées en matrice.

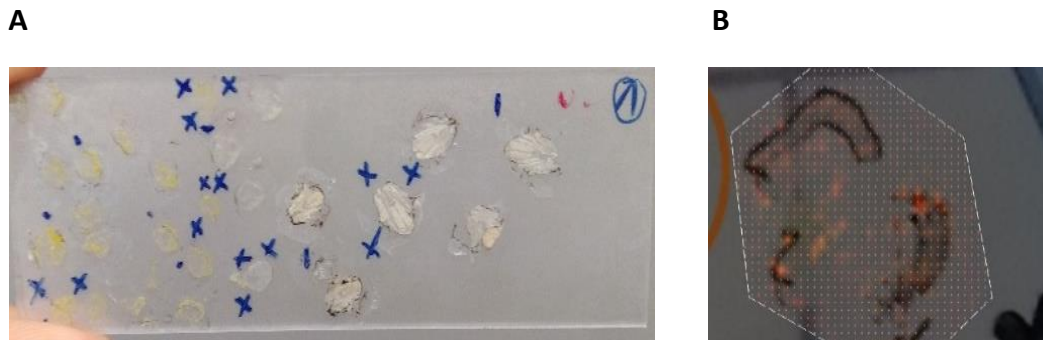


Figure 47 : A) Exemple de coupes transversales déposées sur une lame ITO. B) Pour chaque coupe, la zone à balayer par le laser est délimitée (pointillés blancs) et chaque point orange à 20 μm d'intervalle représente un point de passage du laser et les coordonnées d'un spectre MS^2 .

Quelques résultats sur des coupes transversales d'*Heliconius melpomene* sont présentés ici. Ces coupes ont été obtenues selon le meilleur protocole, le numéro 12. Cependant, la coupe reste de qualité médiocre, étant donné qu'elle ne respecte pas l'intégrité des tissus. Parmi les glucosides cyanogènes candidats, des traces de linamarine et de lotaustraline associées à un cation sodium ont été repérées dans la coupe de tête (Fig. 48).

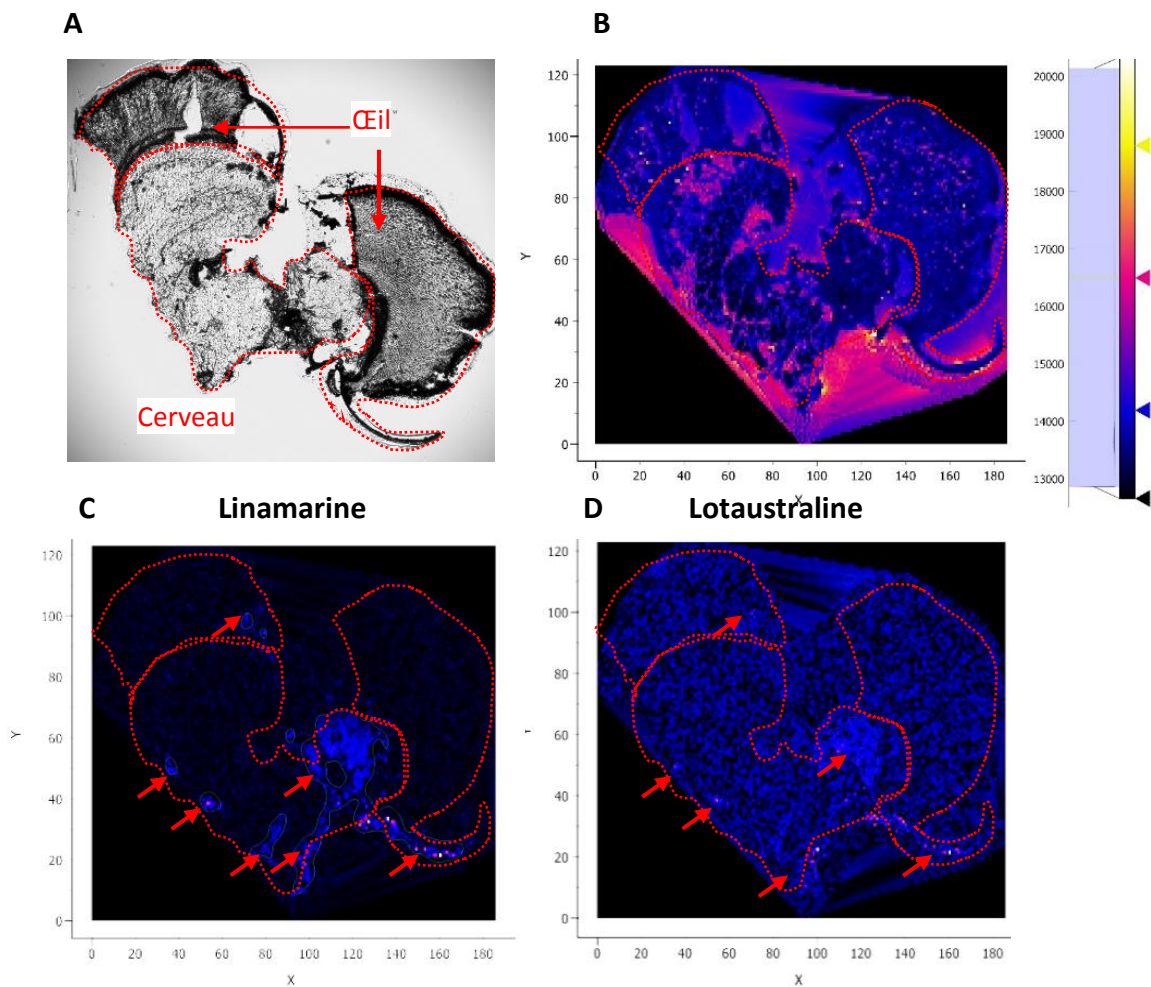


Figure 48 : A) coupe transversale de tête d'*Heliconius melpomene* en microscopie optique. Sur cette coupe est présentée la répartition et l'intensité des B) ions totaux, C) des ions linamarine $[M+Na^+] = 270,09536$, et lotaustraline $[M+Na^+] = 284,11101$.

Après le thorax, la tête est la partie la plus concentrée en glucosides cyanogènes chez *H. erato* (Hay-Roe & Nation, 2007). Détecter et localiser de la linamarine et de la lotaustraline dans la tête d'*H. melpomene* vraisemblablement au niveau du tégument est en accord avec les données de la littérature. Ces ions sont aussi détectés dans le cerveau mais il n'est pas possible de déterminer s'ils sont présents dans les tissus nerveux ou l'hémolymphe. Seules la linamarine et la lotaustraline, des glucosides cyanogènes synthétisés par les papillons, ont été mis en évidence dans les coupes d'*H. melpomene*. Aucun autre glucoside cyanogène, synthétisé ou séquestré, n'a été repéré.

Les recherches ont été étendues à d'autres molécules de défenses chimiques, l'harmine et l'harmane, deux alcaloïdes β -carbolines séquestrés par les papillons (Cavin & Bradley, 1988).

Seule l'harmine a été détecté, ce qui corrobore les travaux de Cavin & Bradley (1988), démontrant que c'est l'alcaloïde β -carboline le plus présent chez *Heliconius*. L'harmine semble être localisé dans la tête : particulièrement le cerveau et dans une moindre mesure les yeux ; dans le thorax : surtout les muscles et un peu dans le ganglion nerveux thoracique. Sa présence dans l'abdomen est un artefact (toute la zone délimitée par l'analyse, aussi bien dans la coupe qu'autour, émet un signal artefact) (Fig. 49).

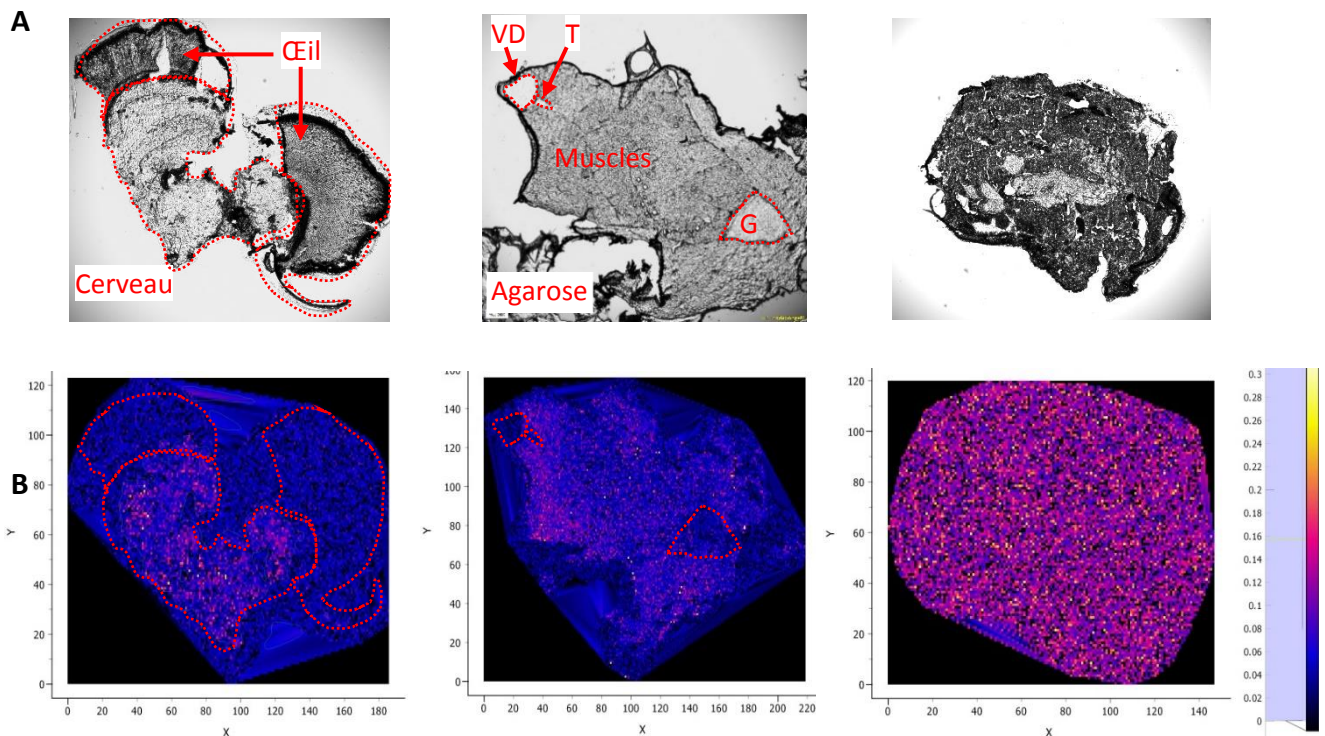
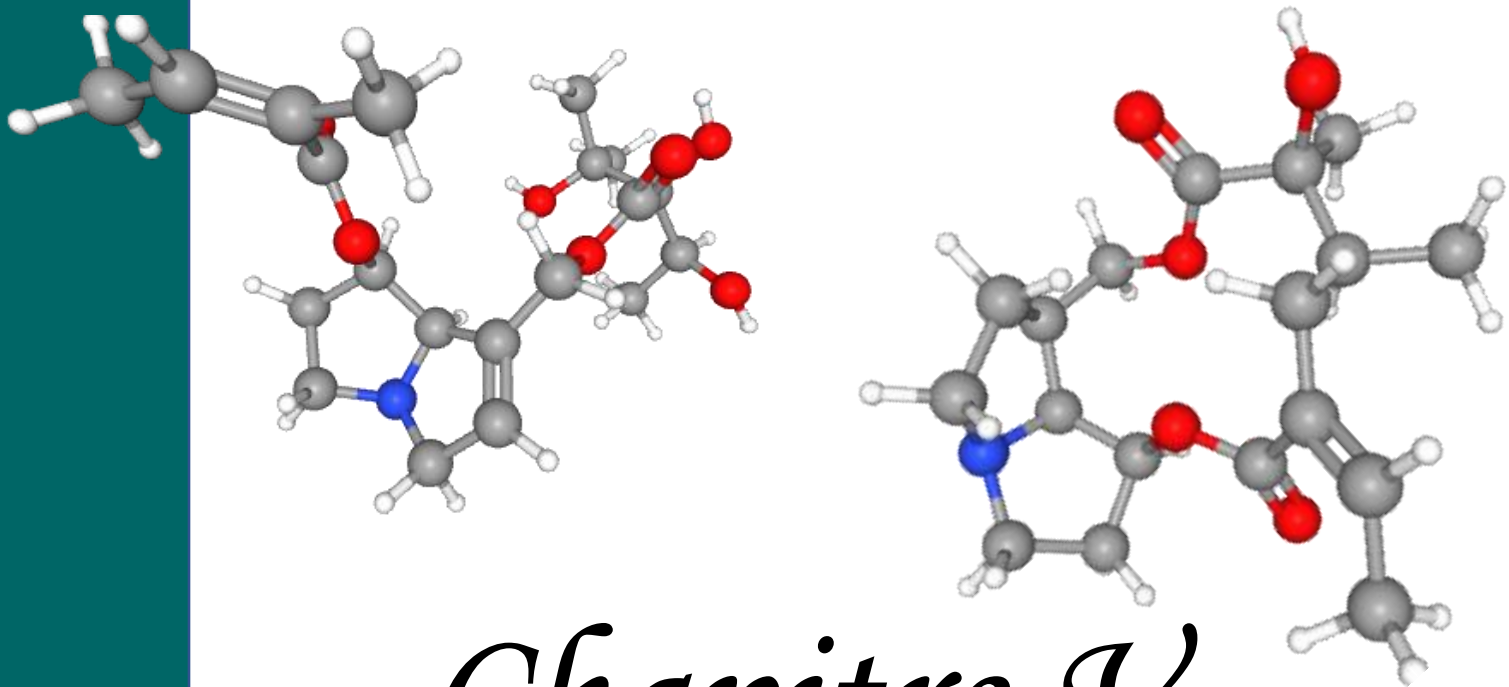


Figure 49 : Localisation de l'alcaloïde β -carboline harmine. A) Images en microscopie optique de coupes transversales de tête, thorax avec délimité le vaisseau dorsal (VD), la trachée (T), le ganglion thoracique (G), et abdomen. B) Les mêmes coupes en imagerie par spectrométrie de masse. Les couleurs représentent la répartition et l'intensité des ions ayant un m/z de 235,08473 qui correspondent à l'harmine associé à un cation sodium.

L'harmine a précédemment été détectée dans le tube digestif et dans l'hémolymphe (Cavin & Bradley, 1988). La localisation dans la tête est les yeux est un résultat nouveau et il est possible que l'harmine ne soit pas séquestrée dans les tissus nerveux mais circule dans l'hémolymphe irrigant le cerveau.

PERSPECTIVES

Les protocoles de coupe et de conservation sont à approfondir pour permettre de mener à bien ce projet qui reste exploratoire dans l'état actuel des choses. L'imagerie par spectrométrie de masse a été utilisée pour la première fois chez des papillons et dans un cadre de problématique évolutive, à l'interface de la chimie analytique et de l'écologie chimique, ce qui représente une réelle innovation mais un projet ambitieux. Cette méthodologie a permis de localiser les glucosides cyanogènes aliphatiques linamarine et lotaustraline dans la tête, et l'alcaloïde β -carboline harmine dans la tête et le thorax d'*Heliconius melpomene*. Il semblerait que l'harmine soit l'alcaloïde β -carboline majoritaire des *Heliconius* et que ce soit l'harmaline chez le genre *Agraulis* (Cavin & Bradley, 1988). Il y a deux études de localisation des différentes molécules de défenses chimiques à l'échelle des organes, une en 1983 pour les glucosides cyanogènes et une en 1988 pour les alcaloïdes β -carboline (Nahrstedt & Davis, 1983; Cavin & Bradley, 1988) et aucune donnée sur leur localisation cellulaire. Il est donc nécessaire d'améliorer ces protocoles afin de pouvoir dans le futur étendre les recherches à d'autres espèces du genre *Heliconius* mais aussi aux autres genres de la tribu des Heliconiini dans l'optique de démêler l'influence des relations phylogénétiques ou de facteurs écologiques sur la répartition des métabolites de défenses.

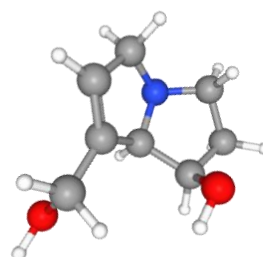
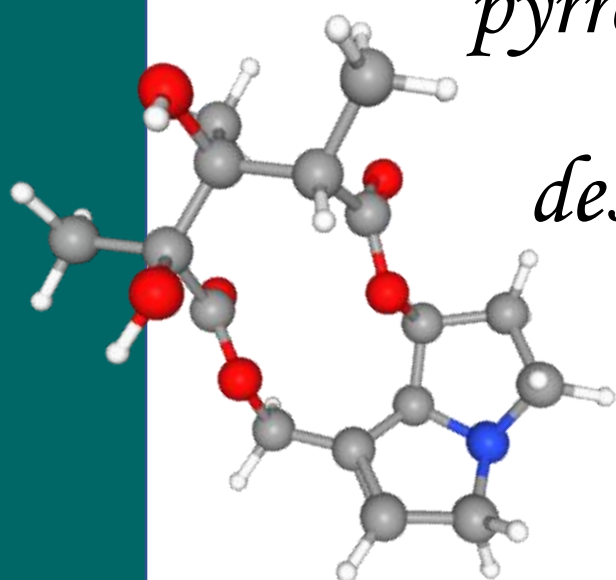


Chapitre V

*Quelles sont les défenses chimiques
des papillons mimétiques des
Heliconiini ?*

*Diversité des alcaloïdes
pyrrolizidiniques*

des Ithomiini



Remerciements

Au printemps-été 2018, j'ai encadré Lynda Hadj Mafoud, une stagiaire de master 2 en recherche et développement de stratégie analytique de l'université Paris Sud. Dans le cadre de son stage sur la variabilité et la diversité des défenses chimiques des Ithomiini, Lynda a généré les données brutes de présence/absence des alcaloïdes pyrrolizidinique (TASQ) et de réseau moléculaire. Je remercie le LabexBCDiv qui a permis de financer ce stage et Soizic Prado, Professeure du Muséum de mon UMR de chimie, pour sa gentillesse et son expertise des réseaux moléculaires.



INTRODUCTION

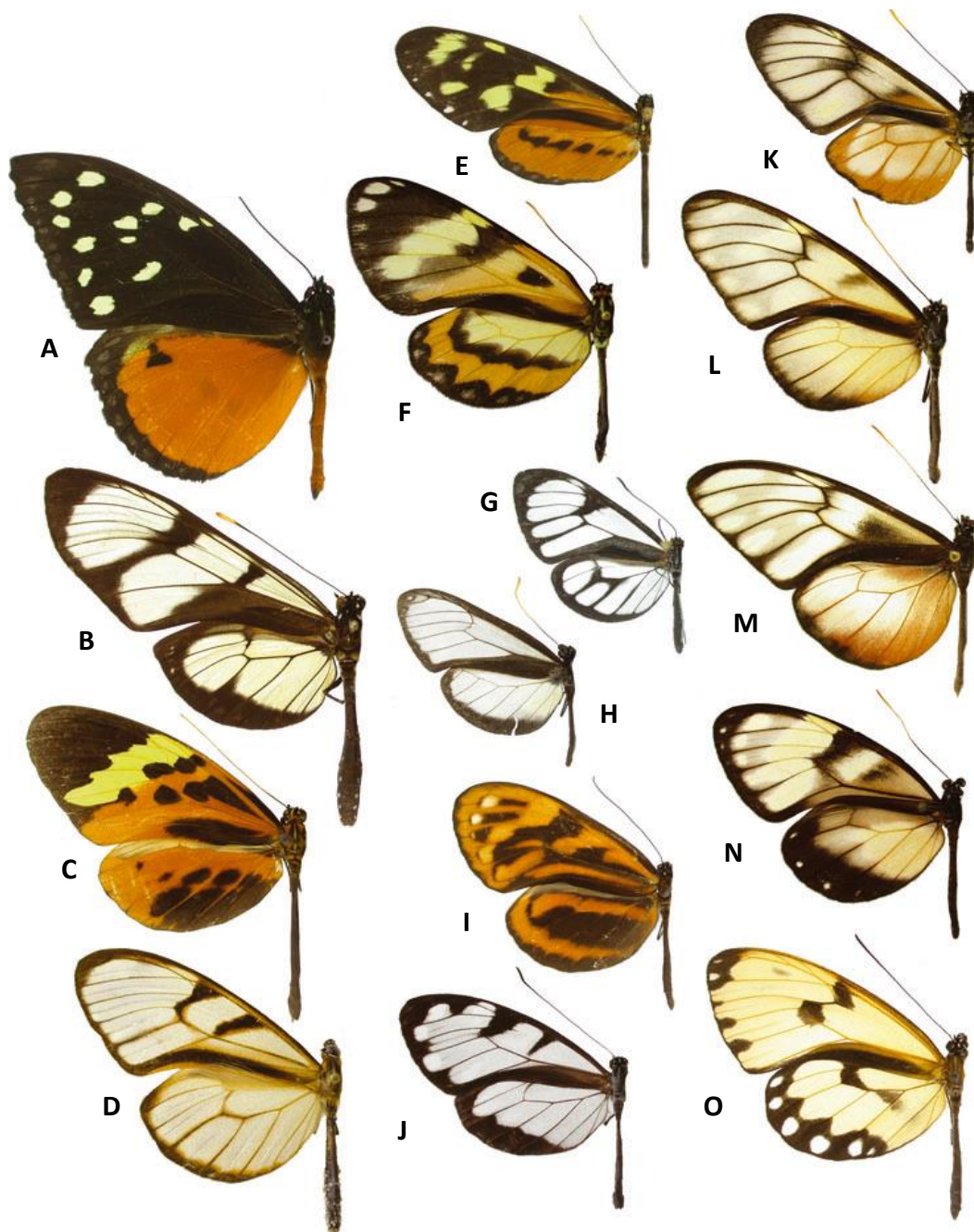


Figure 50 : Aperçu de la diversité des Ithomiini. Certaines espèces ont un patron de coloration plus ou moins coloré et d'autres des ailes partiellement ou entièrement transparentes. A) *Tithorea tarricina*, B) *Methona themisto*, C) *Melinaea menophilus*, D) *Athesis clearista*, E) *Mechanitis lysimnia*, F) *Placidina euryanassa*, G) *Ithomia terra*, H) *Napeogenes apulia*, I) *Hyposcada anchiala*, J) *Oleria santineza*, K) *Callithomia lenea*, L) *Dircenna jemina*, M) *Pteronymia lonera*, N) *Godyris zavaleta*, O) *Veladyris pardalis*. D'après Willmott & Freitas (2006).

Pourquoi s'intéresser aux défenses chimiques des Ithomiini ?

Même si elles sont phylogénétiquement distantes, nombre d'espèces de papillons des tribus Ithomiini et Heliconiini sont co-mimes et forment localement des cercles mimétiques. Ainsi, par convergence évolutive certaines espèces de ces deux tribus partagent un même patron de coloration mais des défenses chimiques de natures distinctes. Bien que la nature et les processus d'acquisition des défenses chimiques soient très contrastés entre les Ithomiini et Heliconiini, certaines espèces présentent des patrons de colorations aux ressemblances frappantes. Les Heliconiini séquestrent des glucosides cyanogènes au stade chenille et synthétisent ces molécules tout au long de leur vie. En revanche, quelques rares espèces d'Ithomiini séquestrent des alcaloïdes pyrrolizidiniques au stade chenille, la plupart des espèces les acquérant uniquement au stade adulte à partir de nectars de fleurs ou de végétaux en décomposition. Les nombreuses plantes hôtes possibles, les voies de séquestrations et de synthèses, ainsi que la différence dans les stades développementaux pour l'acquisition des défenses chimiques suggèrent une évolution différente dans ces deux tribus. Après une brève présentation des Ithomiini et des facteurs impliqués dans l'évolution des défenses chimiques, j'exposerai les résultats d'analyses chimiques visant à identifier et capturer la diversité des défenses chimiques de cette tribu.

Ce chapitre s'articule autour des questions suivantes :

- 🦋 Quels alcaloïdes pyrrolizidiniques et dérivés peuvent être séquestrés par les Ithomiini ?
- 🦋 Quelles sont les variations qualitatives des alcaloïdes pyrrolizidiniques entre les espèces d'Ithomiini ?
- 🦋 Est-il possible de mettre en évidence de nouvelles molécules séquestrées par les Ithomiini ?

Les Ithomiini ont des voies contrastées d'acquisition des défenses chimiques par rapport aux Heliconiini

Les Ithomiini (Nymphalidae : Danaeinae) forment une tribu de papillons tropicaux emblématiques ayant colonisé les forêts humides jusqu'à 3000 mètres d'altitude, de Mexico au sud du Brésil en passant par les Andes et les îles caraïbéennes (Beccaloni, 1997; Elias *et al.*, 2009). Cette tribu monophylétique regroupe 53 genres pour 393 espèces (Chazot, Willmott,

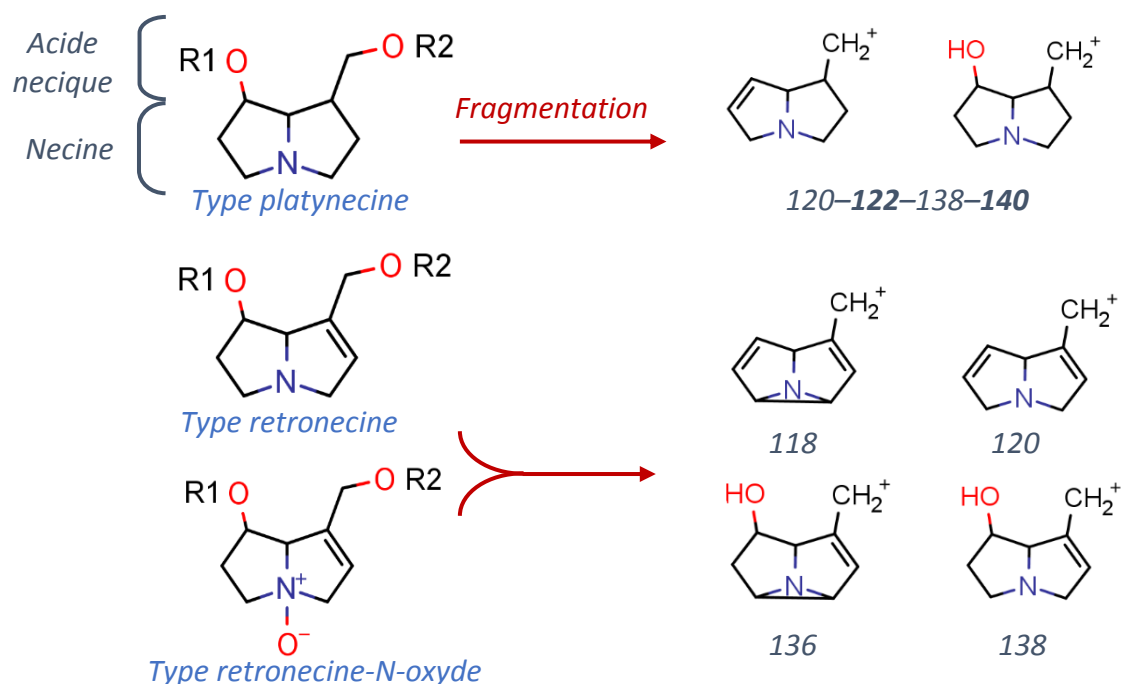
et al., 2019). Les Ithomiini ont un panel diversifié de formes, de tailles et de coloration des ailes, celles-ci étant plus ou moins colorées et/ou transparentes (Fig. 50) (Brown, 1981; Willmott & Freitas, 2006). Cette tribu est la plus importante radiation connue de papillons mimétiques, qui inspira grandement les notions de mimétisme Batésien et Müllerien (Bates, 1862; Müller, 1879a; Chazot *et al.*, 2016). Les Ithomiini dominant numériquement les communautés de papillons et de par leurs patrons de coloration abondants, ce sont probablement des espèces aposématiques vers lesquelles d'autres espèces d'autres tribus ont convergé sous pression de sélection par les prédateurs (Brown & Benson, 1974; Beccaloni, 1997). En effet, toutes les espèces d'Ithomiini sont aposématiques et mimétiques ; entre espèces d'Ithomiini mais aussi avec des Acraeinae, Troidini et Heliconiini (Fig. 51) (Brown, 1972, 1987; Brown & Benson, 1974). Ayant divergé il y a environ 82 millions d'années (Chazot, Wahlberg, *et al.*, 2019), certaines espèces d'Heliconiini et d'Ithomiini arborent les mêmes patrons de coloration par convergence évolutive. Cependant, les espèces des deux tribus possèdent des défenses chimiques différentes. Les Ithomiini, ainsi que toute la famille des Danainae, possèdent des alcaloïdes pyrrolizidiniques (Boîte 2) et non des glucosides cyanogènes contrairement aux Heliconiini (Boppré, 1984). Les Ithomiini séquestrent des alcaloïdes pyrrolizidiniques synthétisés par les plantes et médiateurs des relations plantes – herbivores – prédateurs (Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996) (Fig. 52).



Figure 51 : Exemple de mimétisme Müllerien entre Ithomiini et Heliconiini. Les co-mimes A) Ithomiini : *Melinea menophilus* et B) Heliconiini : *Heliconius numata* ; C) Ithomiini : *Tithorea tarricina* et D) Heliconiini : *Heliconius hecale*. Ces papillons ont un patron de coloration similaires mais se ressemblent également de par leur taille et leur vol nonchalant.

Boîte 2 : Qu'est-ce qu'un alcaloïde pyrrolizidinique ?

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont des métabolites secondaires de plantes à fleurs (Angiosperma). Plus de 660 composés ont été identifiés dans plus de 6000 plantes à travers le monde, appartenant entre autres aux familles des Asteraceae, Boraginaceae, Convolvulaceae, Eupatorieae, Fabaceae, Orchidaceae et Senecioneae (Frölich *et al.*, 2006; El-Shazly & Wink, 2014). Deux cycles pyrroles et un atome d'azote constituent un noyau (necine), portant des motifs plus ou moins ramifiés (acide necique) et parfois cyclique (ci-dessous). La moitié des composés identifiés sont hépatotoxiques et mutagènes pour les vertébrés (Ruan *et al.*, 2012). La toxicité à long terme est causée par la conversion des alcaloïdes pyrrolizidiniques en pyrroles par les cytochromes P₄₅₀ du foie. Ces dérivés très réactifs altèrent l'ADN et provoquent des tumeurs et cancers (Cooper & Huxtable, 1999; Kim *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 1999). L'analyse des rapports *m/z* des « ions signatures » (118-136 ; 120-138 ; 122-140), produits par fragmentation de la molécule parente en spectrométrie de masse en tandem, permet de distinguer les alcaloïdes pyrrolizidiniques non toxiques de type platynecine, et toxiques de type retronecine (Zhou *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2012; These *et al.*, 2013). N-oxydées ou non, les molécules de type retronecine fragmentent de la même façon et sont indifférenciables avec cette méthode.



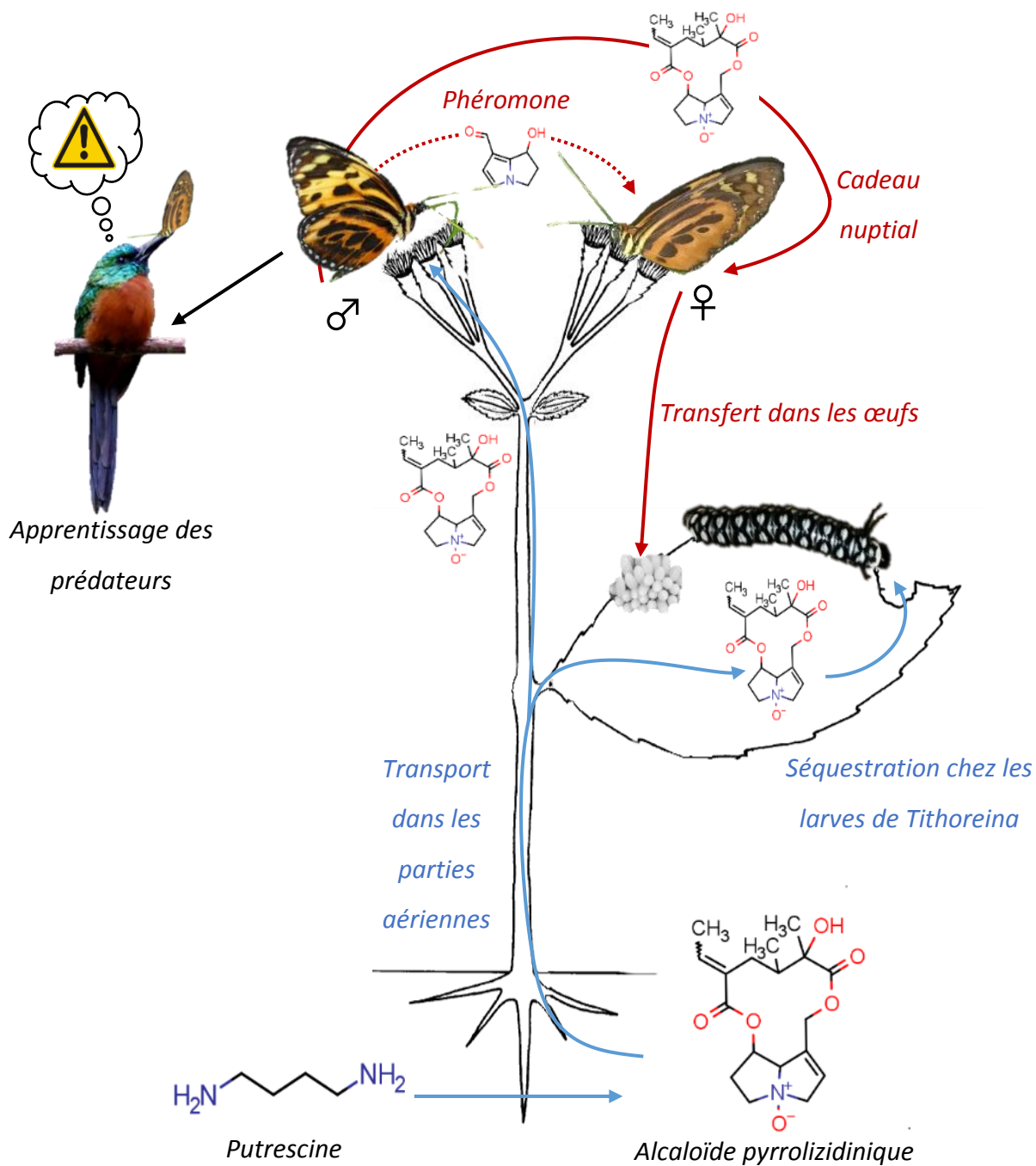


Figure 52 : Médiation des relations plantes – Ithomiini – prédateurs via les alcaloïdes pyrrolizidiniques. D’abord synthétisés dans les racines et/ou dans les tiges à partir de putrescine (une diamine), l’oxydation de l’azote facilite leur transport vers les parties vulnérables de la plantes (tissus reproducteurs et de croissance) où ils sont stockés (Hartmann & Ober, 2000, 2008). Les larves de la sous-tribu *Tithoreina* séquestrent les alcaloïdes pyrrolizidiniques à partir de leur plante hôte. Chez les neufs autres sous-tribus, les mâles adultes séquestrent des alcaloïdes pyrrolizidiniques présents dans les nectars ou feuilles en

décompositions. Ils sont ensuite métabolisés en phéromones (Schulz et al., 2004) volatiles sexuelles d'attraction et transmis à la femelle en cadeau nuptial (Brückmann et al., 2000). Elle en transfère une partie dans ses œufs (Trigo, Brown, Henriques, et al., 1996). Ces métabolites secondaires de défenses chimiques repoussent les prédateurs qui apprennent à les éviter. En bleu le transport des molécules dans la plante et en rouge dans les papillons. Schéma d'après Trigo (2011).

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont séquestrés des plantes

Seules les espèces de la tribu Tithoreina (genres *Tithorea*, *Elzunia*, *Aeria*) s'alimentent sur des plantes hôtes de la famille des Apocynaceae contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques (Fig. 53) (Brown, 1987; Drummond & Brown, 1987; Trigo, Brown, Witte, et al., 1996). Les autres larves d'Ithomiini consomment des Solanaceae, sauf les espèces des genres *Hyposcada* et *Megoleria* qui consomment des Gesneriaceae (Verdan & Stefanello, 2012). Ce sont des plantes hôtes chargées en alcaloïdes et diverses autres métabolites secondaires mais dépourvues d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (Trigo & Brown, 1990). Par exemple, les larves de *Placidula euryanassa* mangent des plantes du genre *Brugmansia* (Solanaceae) et ingèrent des alcaloïdes tropaniques séquestrés jusqu'au stade adulte (Freitas et al., 1996).



Figure 53 : Cycle de vie de *Tithorea harmonia*. A) Plante hôte du genre *Prestonia* (Apogynaceae) contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques. B) Jeunes chenilles et C) une chenille plus âgée au patron de coloration noir et blanc « en arlequin ». D) Prépupe à gauche : chenille suspendue et enroulée de façon caractéristique avant la mue nymphale, et chrysalide dorée à droite. Ces papillons ne tissent pas de cocon. E) Adulte après l'émergence. Crédits photos : Ombeline Sculfort.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent être séquestrés sans métabolisation ou être produits par inversions stéréochimiques (épimérisation) des isomères séquestrés des plantes (Trigo *et al.*, 1994). L'alcaloïde pyrrolizidinique le plus courant chez les Ithomiini est la lycopsamine (Brown, 1984; Trigo *et al.*, 1994; Freitas *et al.*, 1996), directement séquestrée ou épimérisée à partir de l'intermedine, rinderine ou echinatine (Trigo *et al.*, 1994; Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996). Les alcaloïdes pyrrolizidiniques des papillons sont aussi fortement présents sous forme N-oxydée, où un atome d'oxygène se lie à l'atome d'azote de la molécule (Trigo *et al.*, 1994). Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont systématiquement détectés dans les Ithomiini adultes sauvages (Boppré, 1984). Les mâles adultes recherchent activement des sources à partir desquelles ils peuvent acquérir ces métabolites. Les mâles séquestrent les alcaloïdes pyrrolizidiniques à partir du nectar, des exsudats, en grattant les feuilles et tiges en décomposition ou même à partir d'autres insectes morts (Bernays *et al.*, 1977; Brown, 1987; Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996). Généralistes, ils visitent des plantes des familles Asteraceae dont la sous-famille Eupatorieae et Boraginaceae (Trigo, Brown, Henriques, *et al.*, 1996). Les plantes sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ont une grande influence sur la distribution des Ithomiini. En effet localement la présence d'Ithomiini est souvent liée à la présence de sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (Pliske, 1975). Ce phénomène de pharmacophagie (recherche de substances non nutritives) est presque exclusivement observé chez les mâles (Pliske *et al.*, 1976). Les femelles visitent moins les fleurs et obtiennent des alcaloïdes pyrrolizidiniques pendant l'accouplement, puisque ces molécules sont transmises par le mâle dans son spermatophore en guise de « cadeau nuptial » (Fig. 52) (Lamas & Pérez, 1981; Brown, 1987; Brückmann *et al.*, 2000). Ces défenses chimiques renforcent la protection de la femelle vis-à-vis des prédateurs mais aussi celle de sa progéniture puisque les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont investis dans les œufs (Brown, 1987; Trigo, Brown, Henriques, *et al.*, 1996).

Ainsi, les variations des plantes hôtes consommées par les chenilles et la capacité de séquestration et métabolisation des alcaloïdes pyrrolizidiniques collectés par les adultes sur un grand panel d'espèces végétales, sont susceptibles d'engendrer de grandes disparités de défenses chimiques entre les individus et de protection vis-à-vis des prédateurs.

MATERIELS ET METHODES

Recherches bibliographiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques et dérivés candidats

Des recherches bibliographiques sont nécessaires pour dresser la liste des alcaloïdes pyrrolizidiniques dont la présence est avérée chez les Ithomiini, mais aussi pour trouver des stéréoisomères candidats non répertoriés chez ces papillons. L'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques présents dans les échantillons de papillons ne peut s'appuyer sur des standards commerciaux puisqu'il n'y en a pas à disposition au laboratoire. La chromatographie liquide en ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) est exploitée pour pallier à l'absence de standards. L'UHPLC-MS/MS permet de collecter les données spectrales MS^2 caractéristiques d'une molécule et sert de base à l'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Les données MS^2 sont donc collectées dans la littérature pour le maximum d'alcaloïdes pyrrolizidiniques candidats.

Echantillons biologiques

Durant l'été 2017, j'ai capturé 1258 Ithomiini adultes avec un filet à papillon, lors de ma mission de terrain dans la région péruvienne de San Martin au Pérou pendant l'été 2017. Les papillons sont conservés entiers dans une enveloppe placée dans une boîte contenant du silicagel pour absorber l'humidité. Trois individus de six espèces d'Ithomiini de localités différentes ont été analysés. L'espèce colorée et opaque *Mechanitis messenoides deceptus* ($n = 2$ femelles + 1 mâle), les espèces colorées mais non opaques *Ceratinia tutia* ($n = 2$ mâles + 1 femelle) et *Ithomia salapia derasa* ($n = 2$ mâles + 1 femelle), et les espèces partiellement transparentes : *Godyris dircenna* ($n = 2$ mâles + 1 femelle), *Godyris zavaleta* ($n = 3$ femelles) et *Oleria onega* ($n = 2$ mâles + 1 femelle) (Fig. 54).

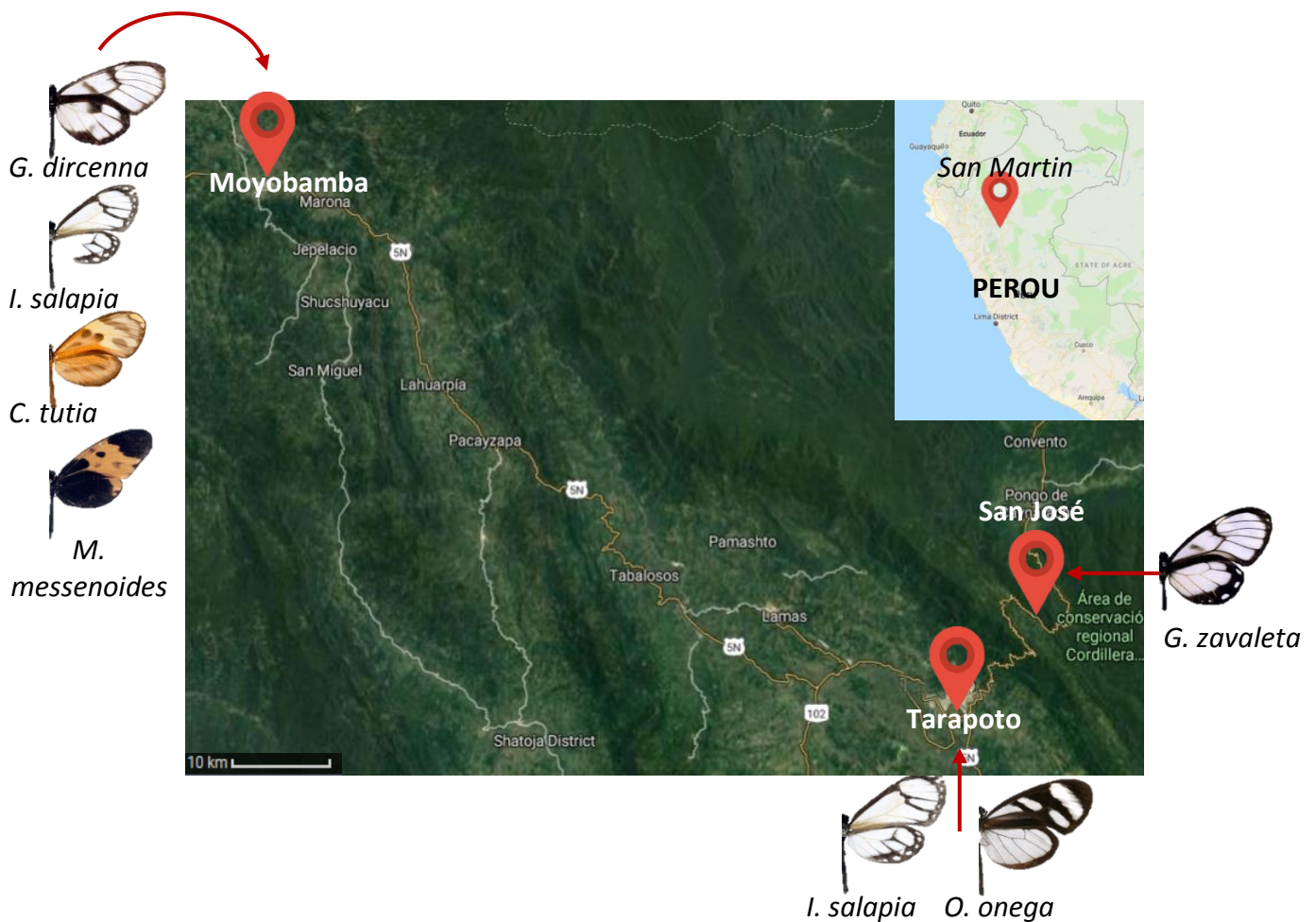


Figure 54 : Localités de collecte des six espèces d'Ithomiini utilisées, dans la région péruvienne de San Martin. Les illustrations de papillons (butterfliesofamerica.com) ne sont pas à l'échelle.

Extractions des alcaloïdes pyrrolizidiniques

Chaque papillon adulte entier est pesé puis broyé dans un mortier en verre avec de l'azote liquide. La poudre de papillon est transférée individuellement dans un tube à essai en verre où sont ajoutés 2 mL de méthanol pur de haute qualité compatible avec des analyses d'UHPLC-MS/MS. L'extraction se fait sous agitation, pendant une heure à température ambiante. L'extrait de papillon est centrifugé pendant 20 minutes à 1600 rpm et filtré en utilisant une pipette pasteur en verre de 7 mm de diamètre et du coton. Les filtrats sont conservés au congélateur à -20°C avant les analyses.

Optimisation de la séparation et fragmentation des molécules candidates en LC-MS/MS

Les analyses des échantillons biologiques en chromatographie liquide à ultra haute pression couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) sont menées sur la plateforme de spectrométrie de masse bio-organique du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (UMR 7245, Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes). La plateforme est équipée d'un système UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse Maxis II ETD-QTOF (Bruker). Ce sont des appareils extrêmement performants ayant une très haute résolution des rapports masse sur charge (m/z) des ions. Cette grande précision est un facteur essentiel pour permettre l'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques puisqu'elle est en partie basée sur ce rapport.

Le protocole de LC-MS/MS a été affiné en utilisant un mélange des deux standards commerciaux disponibles d'alcaloïdes pyrrolizidiniques : la crotaline à 0,65 µg/µL et la retrorcine à 1,2 µg/µL, et un mélange d'extraits bruts d'Ithomiini (*Ceratinia tutia*, *Hypothyris mansuetus*, *Ithomia salapia*, *Mechanitis lysimnia*, *Mechanitis polymnia*, *Melinea messenoides* et *Oleria onega*). Un mélange de ce type maximise la présence et la diversité des molécules d'intérêt, afin d'élaborer le protocole le plus optimal possible dans l'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Le protocole de LC-MS/MS optimisé se déroule comme suit. La colonne chromatographique est une Acclaim Rslc Polar Advantage C₁₈ (100 mm X 2,1 µm ; taille des particules de 2,2 µm) maintenue à 25 ° C. Les phases mobiles d'éluion sont A) de l'eau déionisée supplémentée de 0,1% d'acide formique, et B) de l'acétonitrile plus 0,08 % d'acide formique. Le gradient utilisé au cours du temps est de : 1 – 5 min, linéaire 1% de phase B ; 5,0 – 7,5 min, linéaire 15% B ;

7,5 – 10,0 min, linéaire 25% B ; 10,0 – 12,5 min, linéaire 30% B ; 12,5 – 13,5 min, linéaire 90% B ; 13,5 – 14,5 min, isocratique 90% B ; 14,5 – 15,0 min linéaire 1% B ; 15,0 – 16,0 min , linéaire 1% B. Le débit est maintenu à 0,3 mL/min. Avant l'injection, les échantillons bruts sont vortexés et dilués à 1/10 dans de l'eau déionisée. Le volume injecté par échantillon est de 3µL.

Le spectromètre de masse est équipé d'une interface d'électronébulisation comme source d'ionisation, d'un piège à ions quadripôle et d'un analyseur à temps de vol (Q-TOF : Quadrupole Time of Flight). Les enregistrements de données spectrales se font en mode positif avec une gaine gazeuse de diazote (N₂) ayant un débit de 8 L/min. L'énergie de collision permettant de fragmenter les ions varie entre 25 et 55 eV. La puissance adéquate est calculée automatiquement par le logiciel car elle dépend du rapport m/z des ions. la température du gaz de séchage (N₂) est fixée à 200°C, l'énergie potentielle du capillaire est de 3500 V, et 2,4 bar est la pression du gaz nébuliseur.

Pour optimiser le protocole de UHPLC-MS/MS, les rapports m/z correspondant aux alcaloïdes pyrrolizidiniques et dérivés candidats sont recherchés dans les échantillons servant à mettre au point la méthode (mélange de standards commerciaux d'alcaloïdes pyrrolizidiniques et d'extraits brutes d'Ithomiini), avec le logiciel Data Analysis (Bruker). Les molécules sont identifiées sur la base de leur ions fragments (présence des couples « d'ions signatures » 118-136 et 120-138) et le temps de rétention de la molécule est relevé. Une fois les données spectrales en MS², les rapports m/z et le temps de rétention établis pour un maximum de molécules candidates, les analyses des échantillons des six espèces (décrites dans la section précédente) débutent et chacun des 18 individus est analysés individuellement. Les données brutes de UHPLC-MS/MS sont enregistrées au format .bbCID pour le TASQ et au format .raw pour le réseau moléculaire.

Variations qualitatives des alcaloïdes pyrrolizidiniques entre les espèces d'Ithomiini

Les données spectrales MS² au format .bbCID sont analysées avec le logiciel Target Analysis for Screening and Quantitation (TASQ), développé par Bruker. Ce logiciel est spécialement conçu pour exploiter des données spectrales de très haute résolution et discriminer la présence ou l'absence de composés dans un mélange complexe. Il faut fournir au logiciel la liste des formules brutes des molécules candidates ainsi que leur temps de rétention. Le

logiciel scanne ensuite toutes les données spectrales et relève les molécules d'intérêt. Cette méthode permet de déterminer les molécules présentes dans les échantillons.

Un réseau moléculaire pour explorer la diversité des défenses chimiques

Le principe et le protocole de construction d'un réseau moléculaire sont décrit dans le chapitre IV (Matériels et méthodes > Construction du réseau moléculaire, page 147). Les données spectrales en MS² des six espèces analysées sont stockées sur le serveur MASSIVE sous la référence MSV000082666. Le réseau moléculaire élaboré par la plateforme GNPS est téléchargé et mis en forme avec le logiciel Cytoscape 3.7.1.

RESULTATS ET DISCUSSION

Quels alcaloïdes pyrrolizidiniques et dérivés peuvent être séquestrés par les Ithomiini ?

Chez les Ithomiini, il a été décrit jusqu'à présent 28 alcaloïdes pyrrolizidiniques et 8 dérivés (Tab. 8) (Freitas *et al.*, 1996; Trigo, Brown, Henriques, *et al.*, 1996; Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996; Nishida, 2002; Schulz *et al.*, 2004; Stamm *et al.*, 2019). Il y a beaucoup de variabilité qualitative entre les espèces. Certaines n'ont pas ou peu d'alcaloïde pyrrolizidinique, et/ou quelques dérivés. *Placidina euryanassa* et *Miraleria cymothoe* présentent des défenses chimiques autant diversifiées que les espèces de la tribu Tithoreina séquestrant des alcaloïdes pyrrolizidiniques à l'état larvaire ; *Aeria olena* et *Tithorea harmonia*. La très grande majorité des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont de type retronecine, décrits avec une activité toxique dans la littérature. Seulement deux alcaloïdes pyrrolizidiniques de type platynecine, supposés non toxiques pour les vertébrés, ont été catalogués chez *Miraleria cymothoe* et *Placidina euryanassa*.

La liste des molécules candidates (Tab. 9) comprend ces 36 molécules plus leurs stéréoisomères et leurs formes N-oxydées ainsi que d'autres alcaloïdes pyrrolizidiniques structuralement proches. Dans la liste finale il y a 78 molécules candidates : 70 alcaloïdes pyrrolizidiniques et 8 dérivés, dont les données de MS² ont été listées à partir de la littérature (Roeder, 1990; Freitas *et al.*, 1996; Trigo, Brown, Henriques, *et al.*, 1996; Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996; Beales *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2004; Wuilloud *et al.*, 2004; Joosten *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2012; Griffin *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2015; van de Schans *et al.*, 2017). Pour 11 stéréoisomères d'alcaloïdes pyrrolizidiniques et les huit dérivés, les données spectrales MS² n'ont pu être trouvées dans la littérature.

Ces données bibliographiques sont le socle des recherches présentées ici. La formule brute, la masse des molécules et le rapport masse sur charge des ions (m/z) couplés aux données MS² de la littérature permettent d'identifier les alcaloïdes pyrrolizidiniques potentiellement présents dans les échantillons de papillons. Une fois identifié en UHPLC-MS/MS, les temps de rétention des alcaloïdes pyrrolizidiniques et leurs dérivés sont relevés (Tab. 9). En effet, le temps de rétention est un paramètre qui doit être nécessairement connu pour pouvoir utiliser la méthode TASQ qui détecte la présence ou l'absence d'une molécule.

Espèces d'Ithomiini	Alcaloïdes pyrrolizidiniques et dérivés
<i>Aeria olena</i>	Amabiline, Echinatine, hydroxydanaïdal, Indicine, Intermedine, Intermedine-N-oxyde, Lycopsamine, Lycopsamine-N-oxyde, Retrorcine-N-oxyde, Rinderine, Supinine
<i>Aethria stipata</i>	Acide viridiflorique
<i>Callithomia hezia</i>	Ithomiolide A
<i>Ceratinia neso</i>	Lycopsamine
<i>Ceratinia tutia</i>	1-O-acetylithomiolide A, Ithomiolide A
<i>Episcada carcinia</i>	Danaïdal, Hydroxydanaïdal, Methylhydroxydanaïdoate
<i>Episcada clausina</i>	Methylhydroxydanaïdoate, Ithomiolide A, Ithomiolide B
<i>Epityches eupompe</i>	Hydroxydanaïdal, Methylhydroxydanaïdoate
<i>Garsauritis xanthostola</i>	Hydroxydanaïdal
<i>Godyris kedema</i>	Acide viridiflorique
<i>Godyris zavaleta</i>	Ithomiolide A
<i>Heterosais edessa</i>	Ithomiolide A, Ithomiolide B
<i>Hymenitis andromica</i>	Heliotrine
<i>Hymenitis dercetis</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique
<i>Hypoleria proxima</i>	Methylhydroxydanaïdoate
<i>Hypothyris anastasia acreana</i>	Hydroxydanaïdal
<i>Hypothyris euclea</i>	Hydroxydanaïdal
<i>Hypothyris moebiusi</i>	Ithomiolide A
<i>Hypothyris ninonia daeta</i>	Danaïdone, Hydroxydanaïdal
<i>Ithomia iphianassa</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique, Ithomiolide A
<i>Ithomia salapia salapia</i>	Ithomiolide A
<i>Mcclungia salonina</i>	Hydroxydanaïdal, Methylhydroxydanaïdoate
<i>Mechanitis isthmia veritabilis</i>	Methylhydroxydanaïdoate
<i>Mechanitis lysimnia</i>	Hydroxydanaïdal
<i>Melinaea menophilus orestes</i>	Hydroxydanaïdal, Viridiflorine β -lactone
<i>Miraleria cymothoe</i>	1,2-dihydrointermedine-N-oxyde, Amabiline-N-oxyde, Intermedine-N-oxyde, Lycopsamine, Lycopsamine-N-oxyde, Rinderine-N-oxyde, Viridiflorine-N-oxyde
<i>Napeogenes inachia</i>	Hydroxydanaïdal
<i>Napeogenes sylphis caucayaensis</i>	9-méthoxydanaïdone, 9-O-méthylhydroxydanaïdol, 9-O-méthylretronecin, Danaïdone
<i>Oleria makrena</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique

Espèce d'Ithomiini	Alcaloïdes pyrrolizidiniques et dérivés
<i>Oleria onega</i>	Lycopsamine
<i>Oleria phemonoe</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique
<i>Placidina euryanassa</i>	1,2-dihydrointermediate-N-oxyde, Amabiline-N-oxyde, Intermediate-N-oxyde, Lycopsamine, Lycopsamine-N-oxyde, Methylhydroxydanaïdoate, Rinderine-N-oxyde, Viridiflorine-N-oxyde
<i>Prittwitzia hymenaea</i>	Methylhydroxydanaïdoate, Ithomiolide A, Ithomiolide B
<i>Pseudoscada erruca</i>	Ithomiolide A
<i>Pseudoscada timna timna</i>	Ithomiolide A
<i>Pteronymia asopo</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique
<i>Pteronymia beebei</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique
<i>Pteronymia nubivaga</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique
<i>Pteronymia veia</i>	Heliotrine, Acide viridiflorique
<i>Pteronymia vestilla</i>	1-O-acetylithomiolide A, Ithomiolide A
<i>Scada kusa kusa</i>	Viridiflorine β -lactone
<i>Thyridia psidii</i>	Hydroxydanaïdal, Oxodanaïdal, Methylhydroxydanaïdoate
<i>Tithorea harmonia</i>	Amabiline, Echinatine, Indicine, Intermediate, Intermediate-N-oxyde, Lycopsamine, Lycopsamine-N-oxyde, Methylhydroxydanaïdoate, Retrocine-N-oxyde, Rinderine, Supinine

Tableau 8 : Liste des alcaloïdes pyrrolizidiniques décrits dans la littérature et présents chez les Ithomiini. Les molécules en italiques sont des dérivés des alcaloïdes pyrrolizidiniques et en rouge les alcaloïdes pyrrolizidiniques de type platynecine décrits comme sans activité toxique dans la littérature.

Alcaloïde pyrrolizidinique	Formule	Masse monoisotopique	TR (min)	MS m/z	MS/MS m/z	MS/MS m/z ₂	MS/MS m/z ₃	MS/MS m/z ₄	MS/MS m/z ₅	MS/MS m/z ₆	MS/MS m/z ₇	MS/MS m/z ₈	MS/MS m/z ₉
1,2-dihydrointermedine Viridiflorine-N-oxyde	C ₁₅ H ₂₇ NO ₅	301,189	4,7/5,6	302,196	283	268	258	257	158	140	120	122	114
1,2-dihydrointermedine-N-oxyde	C ₁₅ H ₂₇ NO ₆	317,000	4,6/5,7	318,007									
3-O-acetylechinate 3-O-acetylindicine 3-O-acetylintermedine 3-O-acetyllycopsamine 3-O-acetylrinderine 7-acetylintermedine 7-acetyllycopsamine Acetylindicine Monocrotaline-N-oxyde	C ₁₇ H ₂₇ NO ₆	341,184	4,3	342,191	324	282	214	198	180	162	138	137	121
3-O-acetylheliospathine-like	C ₁₈ H ₂₉ NO ₆	355,199	?	356,207	140	138	120						
3-O-acetylsupinine-like Monocrotaline	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	325,153	2,1	326,160	237	236	137	136	118	120	93	80	43
7-acetylintermedine-N-oxyde 7-acetyllycopsamine-N-oxyde	C ₁₇ H ₂₇ NO ₇	357,179	5,1/6,7/7,1	358,186	314	214	197	180	137	120	101		
7-angeloylretronecine 9-angeloylretronecine 7-senecionylretronecine 9-senecionylheliotridine 9-senecionylretronecine 9-tigloylretronecine	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	237,136	5,4	238,144	222	140	138	120	118				
7-angeloylplatynecine 9-angeloylplatynecine 9-tigloylplatynecine	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239,152	?	240,159	221	220	215						
9-methoxydanaïdone	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,079	2,6	166,086									
9-O-methylhydroxydanaïdol	C ₉ H ₁₃ NO ₂	167,095	?	168,102									
9-O-methylretronecin	C ₉ H ₁₅ NO ₂	169,110	9,8	170,118									

Alcaloïde pyrrolizidinique	Formule	Masse monoisotopique	TR (min)	MS m/z	MS/MS m/z	MS/MS m/z ₂	MS/MS m/z ₃	MS/MS m/z ₄	MS/MS m/z ₅	MS/MS m/z ₆	MS/MS m/z ₇	MS/MS m/z ₈	MS/MS m/z ₉
Amabiline Supinine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄	283,178	5,4	284,186	268	239	140	124	123	122	121	120	93
Amabiline-N-oxyde Echinatine Indicine Intermedine Iso-lycopsamine-like Lycopsamine Rinderine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299,173	3,5/4,2	300,181									
Callimorphine Isocallimorphine	C ₁₅ H ₂₃ NO ₅	297,158	4,3	298,165	140	138							
Coromandaline Viridiflorine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	285,194	5,0	286,201	240	142	138	126	124	122			
Danaïdal Danaïdone	C ₈ H ₉ NO	135,068	1,7/4,5/5,5/7	136,076									
Echimidine	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇	397,210	10,5	398,217	380	336	220	120					
Echinatine-N-oxyde Indicine-N-oxyde Intermedine-N-oxyde Lycopsamine-N-oxyde Rinderine-N-oxyde	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	315,168	?	316,175	272	172	156	138	136	120	111	94	
Heliospathine-like Heliotrine	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅	313,189	5,3/7,6	314,196	256	156	138	120	96	94			
Heliotrine-N-oxyde	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆	329,184	6,3/6,8	330,191	172	138							
Heterophylline	?	453,000	?	454,000	140	138	120						
Hydroxydanaïdal Loroquine	C ₈ H ₉ NO ₂	151,063	1,9	152,071									
Integerrimine Senecionine	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	335,173	7,2/7,4	336,181	308	290	200	153	138	120	108	94	

Alcaloïde pyrrolizidinique	Formule	Masse monoisotopique	TR (min)	MS m/z	MS/MS m/z	MS/MS m/z ₂	MS/MS m/z ₃	MS/MS m/z ₄	MS/MS m/z ₅	MS/MS m/z ₆	MS/MS m/z ₇	MS/MS m/z ₈	MS/MS m/z ₉
Integerrimine-N-oxyde Retrorsine Senecionine-N-oxyde Usaramine	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351,168	4,4	352,175	220,2	154,1	138,1	136,1	120,1	119	118	94,1	
Methyloxodanaïdoate	C ₉ H ₇ NO ₃	177,043	1,9	178,050									
Methylhydroxydanaïdoate	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,074	1,7	182,081									
Neoplathyphylline Plathyphylline	C ₁₈ H ₂₇ NO ₅	337,189	7,7	338,196	310,3	292,3	240,3	153,2	140,2	122,1	93,1		
Oxodanaïdal	C ₈ H ₇ NO ₂	149,048	4,8/6,2	150,055									
Parsonine	C ₂₂ H ₃₃ NO ₈	439,221	3,9/6,0/8,3	440,228	140	138	120						
Parsonsine-N-oxyde	C ₂₂ H ₃₃ NO ₉	455,216	8,8	456,223									
Plathyphylline-N-oxyde	C ₁₈ H ₂₇ NO ₆	353,184	6,7	354,191	336,3	290,3	256,2	211,2	156,1	140,2	138,2	122,1	120,1
Retrorsine-N-oxyde	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	367,163	2,3/5,0/6,2	368,170	220,2	154,1	138,1	136,1	118,1	94,1			
Dérivé d'alcaloïde pyrrolizidinique	Formule	Masse monoisotopique	TR (min)	MS m/z	MS/MS m/z	MS/MS m/z ₂	MS/MS m/z ₃	MS/MS m/z ₄	MS/MS m/z ₅	MS/MS m/z ₆	MS/MS m/z ₇	MS/MS m/z ₈	MS/MS m/z ₉
1-O-acetylithomiolide A	C ₉ H ₁₄ O ₅	202,084	?	203,091									
Acide viridiflorique	C ₇ H ₁₄ O ₄	162,089	?	163,096									
Calystegine A3	C ₇ H ₁₃ NO ₃	159,090	0,8	160,097									
Calystegine B2	C ₇ H ₁₃ NO ₄	175,084	0,9	176,092									
Isopelletierine	C ₈ H ₁₅ NO	141,115	9,8	142,123									
Ithomiolide A	C ₇ H ₁₂ O ₄	160,074	?	161,081									
Ithomiolide B	C ₇ H ₁₀ O ₄	158,058	10,1	159,065									
Viridiflorine β-lactone	C ₇ H ₁₂ O ₃	144,079	?	145,086									

Tableau 9 : Liste des alcaloïdes pyrrolizidiniques et de leur dérivés candidats. Les molécules décrites dans la littérature chez les Ithomiini sont en gras et en rouge les alcaloïdes pyrrolizidiniques de type platynecine décrits comme sans activité toxique dans la littérature. Plusieurs temps de rétention pour une même molécule suggèrent que celle-ci a des stéréoisomères potentiellement inconnus

Quelles sont les variations qualitatives des alcaloïdes pyrrolizidiniques entre les espèces d'Ithomiini ?

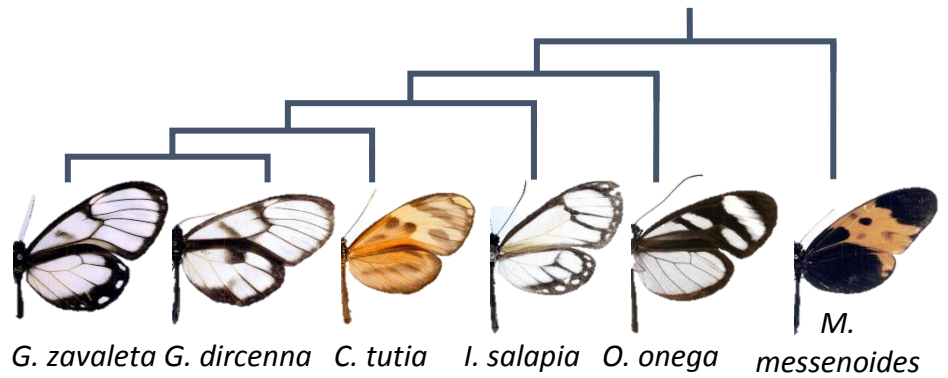
La méthode de chimie analytique TASQ a pu mettre en évidence quatre dérivés d'alcaloïdes pyrrolizidiniques et 16 alcaloïdes pyrrolizidiniques (Fig. 55). Parmi ces 16 alcaloïdes pyrrolizidiniques, 8 ont de nombreux stéréoisomères, ce qui empêche de déterminer avec certitude l'identité du stéréoisomère détecté dans les échantillons. Cependant, au moins quatre alcaloïdes pyrrolizidiniques ont pu être mis en évidence pour la première fois chez les Ithomiini, la 7-angeloylretronecine ou un de ses stéréoisomères, la coromandaline ou la viridiflorine (type platynecine non toxique), l'échimidine et l'héliotrine-N-oxyde. Certains alcaloïdes pyrrolizidiniques sont communs aux six espèces tels que le 9-methoxydanaïdone, le 9-O-methylretronecine et le methylhydroxydanaïdoate. Des quatre dérivés détectés, l'acide viridiflorique semble être le plus commun chez ces espèces (présent dans quatre espèces sur six). Malgré ces ressemblances qualitatives entre les espèces, les variations quantitatives sont inaccessibles ici.

Ces résultats constituent les premières données de défenses chimiques pour les espèces *Godyris dircenna* et *Mechanitis messenoides*. Cette analyse permet d'étoffer les données publiées dans la littérature, puisque n'étaient alors connus chez *G. zavaleta* que l'ithomiolide A, chez *C. tutia* que l'1-O-acetylithomiolide A et l'ithomiolide A, chez *I. salapia* que l'ithomiolide A et chez *O. onega* que la lycopsamine. Si ces molécules n'ont pas été détectées dans les échantillons, c'est qu'elles étaient soit absentes soit indétectables selon les conditions expérimentales utilisées.

Quatre alcaloïdes pyrrolizidiniques et un dérivé ont été mis en évidence chez *O. onega* (3 individus), dont la danaïdone ou la danaïdal et l'acide viridiflorique faisant classiquement partie du bouquet phéromonal des Ithomiini. Ceci contredit la littérature décrivant *O. onega* dépourvu d'alcaloïde pyrrolizidinique à l'exception de la lycopsamine, et qui semblerait dépendre d'acides gras oxydés et non d'alcaloïdes pyrrolizidiniques pour synthétiser ses phéromones sexuelles (Stamm *et al.*, 2019). Néanmoins, cette étude focalise ses analyses sur la région des poils androconiaux (émetteur des phéromones), alors que les résultats présentés ici sont basés sur des extraits de papillons entiers. Aussi, il existe environ 12 sous-espèces d'*O. onega* pouvant certainement différer chimiquement. En effet, les défenses chimiques sont

variables au sein d'une même espèce, ce qui a été démontré chez les Heliconiini (Chap. II, page 94). D'autres espèces du même genre, *O. makrena* et *O. phemonoe* peuvent aussi séquestrer de l'acide viridiflorique (Pliske *et al.*, 1976). *O. onega* ne semble donc pas avoir perdu secondairement la capacité de séquestration des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Ces six espèces de papillons ne séquestrent pas d'alcaloïde pyrrolizidinique à l'état larvaire. Les composés détectés ont donc été collectés au stade adulte et leur occurrence dépend du métabolome des plantes au moment de la visite du papillon. Les Ithomiini sont des papillons très généralistes au stade adulte et visitent une grande diversité d'espèces florales. Ces origines végétales variées, les capacités de séquestration et de métabolisation des alcaloïdes pyrrolizidiniques par les papillons peuvent être à l'origine des grandes variations de profils chimiques entre les espèces. Provenant de localités différentes (Fig. 54), les papillons n'ont pas forcément accès aux mêmes plantes, un paramètre qui peut amplifier la diversité des molécules rencontrées.



ALCALOÏDES PYRROLIZIDIQUES						
1,2-dihydrointermediate-N-Oxyde						
1,2-dihydrointermediate ou Viridiflorine-N-oxyde						
7-angeloylretronecine ou 9-angeloylretronecine ou 7-senecionylretronecine ou 9-senecionylheliotridine ou 9-senecionylretronecine ou 9-tigloylretronecine ou						
9-methoxydanaïdone						
9-O-methylretronecine						
Amabiline-N-oxyde ou Echinatine ou Indicine ou Intermedine ou Lycopsamine Iso-lycopsamine-like ou Rinderine						
Amabiline ou Supinine						
Coromandaline ou Viridiflorine						
Danaïdal ou Danaïdone						
Echimidine						
Heliotrine-N-Oxyde						
Hydroxydanaïdal ou Loroquinine						
Echinatine-N-oxyde ou Indicine-N-oxyde ou Intermedine-N-oxyde ou Lycopsamine-N-oxyde ou Rinderine-N-oxyde						
Methylhydroxydanaïdoate						
Methyloxodanaïdoate						
Oxodanaïdal						
DERIVES D'ALCALOÏDES PYRROLIZIDIQUES						
Acide viridiflorique						
Calystegine A3						
Calystegine B2						
Ithomiolide B						

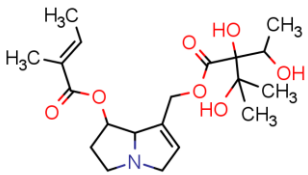
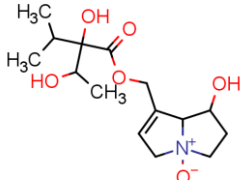
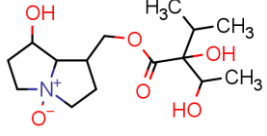
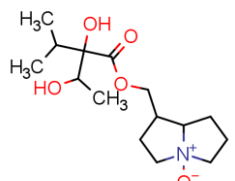
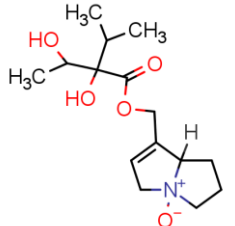
Figure 55 : Variations qualitatives des alcaloïdes pyrrolizidiniques et leurs dérivés. Les molécules déjà connues chez les Ithomiini selon la littérature sont écrites en gras. Les molécules de type platynecine non toxiques sont écrites en rouge. Les relations phylogénétiques, entre les six espèces d'Ithomiini étudiées sont représentées extrêmement simplifiées. Une case grisée traduit la présence et une case blanche traduit l'absence de la molécule au sein de l'espèce. Les photographies de papillons (disponibles sur le site butterfliesofamerica.com) ne sont pas à l'échelle.

Est-il possible de mettre en évidence de nouvelles molécules séquestrées par les Ithomiini grâce au réseau moléculaire ?

Le réseau moléculaire permet de visualiser les données des ions moléculaires fragmentés issus d'un mélange complexe, en se basant sur la similarité de leurs données spectrales (Nothias-Scaglia *et al.*, 2015). Au total, ce réseau moléculaire a permis d'inventorier 11 alcaloïdes pyrrolizidiniques chez les Ithomiini adultes (Fig. 56, Tab. 10). Dans quatre des six espèces d'Ithomiini analysées la plateforme GNPS a permis l'annotation automatique d'une unique molécule par comparaison de ses données spectrales avec celles enregistrées dans les bases de données : un alcaloïde pyrrolizidinique de type platynecine, l'heliocurassavicine-N-oxyde (numéro 4 sur la Fig. 56 et dans le Tab. 10). Cette molécule ne faisait pas partie de la liste d'alcaloïdes pyrrolizidiniques candidats, mais sa détection est cohérente puisque qu'elle est notamment synthétisée par *Heliotropium curassavicum* (Boraginaceae), une plante visitée des Ithomiini. Si 10 autres alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été mis en évidence manuellement, aucun dérivé n'a été mesuré. A un même rapport m/z peut correspondre plusieurs stéréoisomères, qu'il n'est pas possible de discriminer ici puisqu'ils engendrent les mêmes données spectrales (mais sont représentés par des nœuds différents). Ces alcaloïdes pyrrolizidiniques sont plus ou moins partagés entre les espèces testées, 73% des molécules (soit 8/11) sont partagées par au moins la moitié des espèces, alors que 18% des molécules (soit 2/11) ne sont présentes que chez une seule espèce. En effet, l'echimidine n'est mesurée que chez *C. tutia* alors que l'intermedine-N-oxyde ou un de ses stéréoisomères est présent dans cinq espèces. Certains alcaloïdes pyrrolizidiniques avaient déjà été rapportés chez les Ithomiini (en gras dans le Tab. 10), pour d'autres c'est une première comme, l'heliocurassavicine-N-oxyde, l'heliotrine-N-oxyde, l'echimidine et la monocrotaline ou la 3-O-acetylsupinine-like. Le composé numéro 5 pourrait être la lycopsamine qui fut souvent décrit comme l'alcaloïde pyrrolizidinique le plus répandu chez les Ithomiini. Le danaïdal ou la danaïdone est le seul alcaloïde pyrrolizidinique détecté entrant dans la composition des phéromones sexuelles volatiles (Edgar, 1982; Schulz *et al.*, 1987). Sa différence de poids moléculaire et son profil de fragmentation différent font qu'il est isolé des autres alcaloïdes pyrrolizidiniques détectés. La danaïdal ou la danaïdone est structuralement proche d'un ion de $m/z = 137,046$, peut-être sa forme $M+2H^+$ ou une molécule inconnue. A l'exception du danaïdal ou de la danaïdone, les alcaloïdes pyrrolizidiniques détectés par le réseau

moléculaire sont tous regroupés dans le même cluster. Les molécules non identifiées de ce cluster sont donc structurellement très proches et très probablement des alcaloïdes pyrrolizidiniques encore à découvrir.

Dans les extraits d'*Oleria onega*, seule le danaidal ou la danaidone a été mesurée et ce pour la première fois. A première vue, ce résultat semble corroborer la littérature décrivant *O. onega* dépourvue d'alcaloïde pyrrolizidinique à l'exception de la lycopsamine (Stamm *et al.*, 2019).

Numéro	Rapport m/z	Nom(s)	Espèces	Formule développée
1	398,217 M + H ⁺	Echimidine	<i>C. tutia</i>	
2 et 2'	316,176 M + H ⁺	Intermedine-N-oxyde (ci-contre) ou Lycopsamine-N-oxyde ou Rinderine-N-oxyde ou Echinatine-N-oxyde ou Indicine-N-oxyde	<i>C. tutia</i> <i>G. dircena</i> <i>G. zavaleta</i> <i>I. salapia</i> <i>M. polymnia</i>	
3	318,191 M + H ⁺	1,2-dihydrointermedine-N-oxyde	<i>M. polymnia</i>	
4	302,197 M + H ⁺	Heliocurassavicine-N-oxyde	<i>G. dircena</i> <i>I. salapia</i> <i>M. polymnia</i>	
5	300,181 M + H ⁺	Amabiline-N-oxyde (ci-contre) ou Echinatine ou Indicine ou Intermedine ou Iso-Lycopsamine-like ou Lycopsamine ou Rinderine	<i>C. tutia</i> <i>G. dircena</i> <i>G. zavaleta</i> <i>I. salapia</i> <i>M. polymnia</i>	

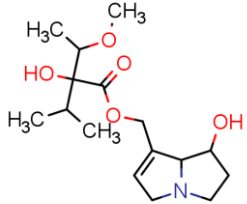
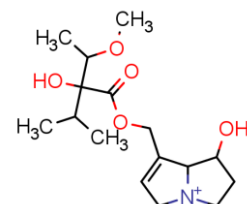
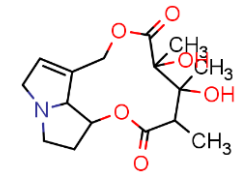
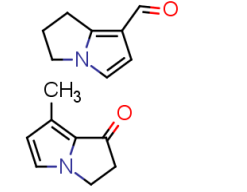
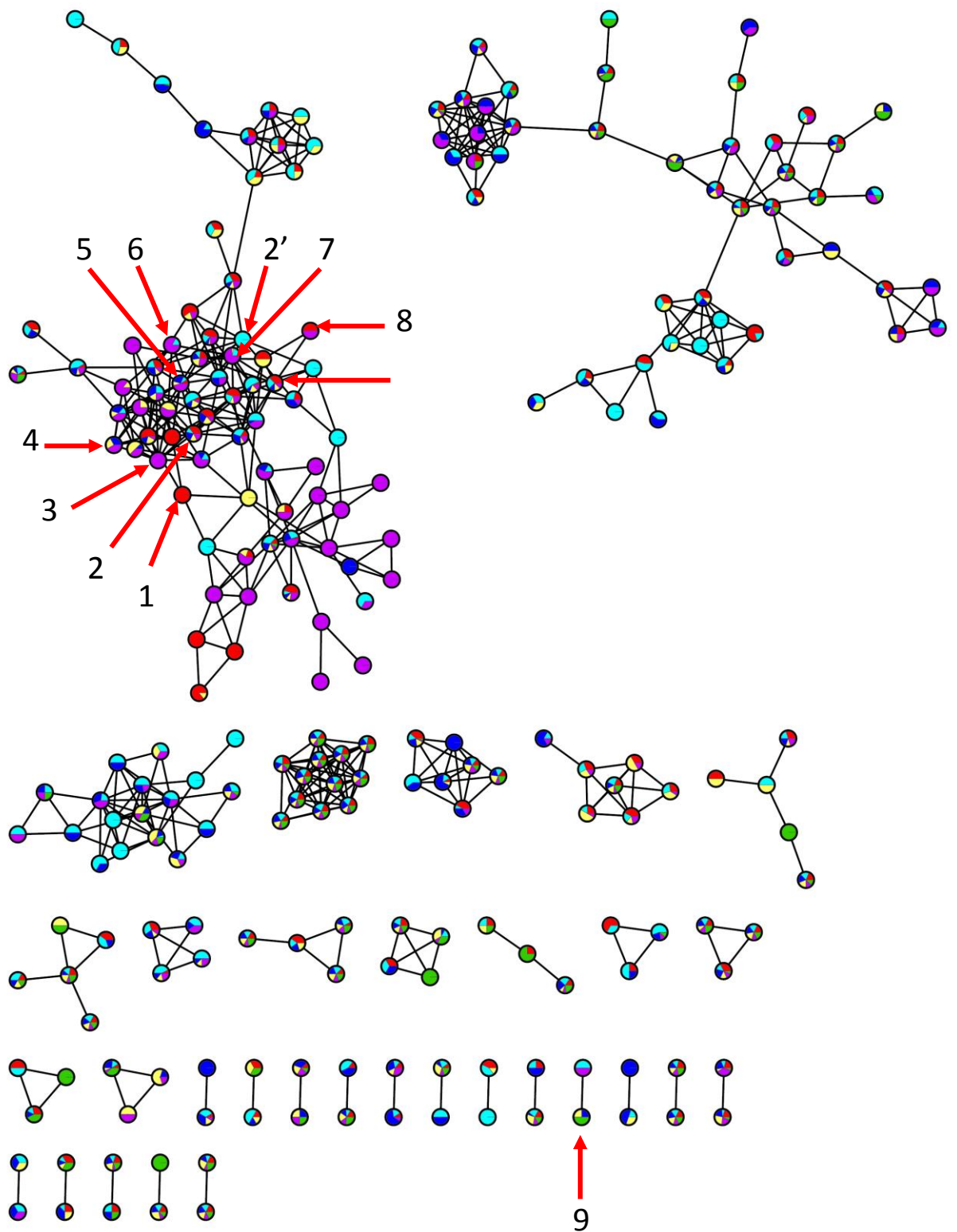
6	314,196 M + H ⁺	Heliospathine-like ou Heliotrine (ci-contre)	<i>G. dircena</i> <i>M. polymnia</i>	
7	330,191 M + H ⁺	Heliotrine-N-oxyde	<i>G. dircena</i> <i>I. salapia</i> <i>M. polymnia</i>	
8 et 8'	343,186 M + NH ₄ ⁺	Monocrotaline (ci-contre) ou 3-O-acetylsupinine-like	<i>C. tutia</i> <i>G. dircena</i> <i>G. zavaleta</i> <i>I. salapia</i> <i>M. polymnia</i>	
9	136,076 M + H ⁺	Danaidal ou Danaidone	<i>G. zavaleta</i> <i>I. salapia</i> <i>O. onega</i>	

Tableau 10 : Description des alcaloïdes pyrrolizidiniques détectés dans le réseau moléculaire. Les numéros correspondent à la position de la molécule dans le réseau moléculaire. Les molécules connues chez les Ithomiini sont en gras, les autres sont détectées pour la première fois. Les noms en rouge sont les alcaloïdes pyrrolizidiniques de type platynecine non toxiques.

Figure 56 (ci-contre) : Visualisation globale du réseau moléculaire construit à partir de six espèces d'Ithomiini. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques détectés sont indiqués par des numéros et reportés dans le tableau 10. Deux paires de stéréoisomères sont détectées : 2 & 2' et 8 & 8'. L'origine des molécules est codée par une couleur et le pourcentage de chaque couleur reflète la proportion relative dans les échantillons biologiques. Un nœud multicolore indique qu'une même molécule est présente dans plusieurs espèces.



PERSPECTIVES

La méthode TASQ permet de détecter facilement des molécules dans un extrait mais implique de connaître impérativement à l'avance les caractéristiques des molécules recherchées. Le réseau moléculaire a identifié une seule molécule automatiquement, les autres molécules inconnues n'étant peut-être pas encore répertoriées dans les bases de données. Le nombre d'alcaloïdes pyrrolizidiniques réellement présent dans les échantillons est donc sûrement sous-estimé. Ces deux méthodes n'ont pas détecté les mêmes molécules, ainsi leur utilisation complémentaire rend l'exploration d'un métabolome plus efficace.

Dans l'ensemble des six espèces étudiées, j'ai pu mettre en évidence 16 alcaloïdes pyrrolizidiniques, dont 4 pour la première fois chez les Ithomiini et également 4 dérivés. L'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques reste incertaine de par leurs très nombreux stéréoisomères. Bien que basées sur un nombre restreint d'individus et d'espèces (6 espèces sur 393 !), ces résultats préliminaires permettent i) d'étoffer les connaissances sur les composés séquestrés par les Ithomiini, ii) d'appuyer la littérature sur la grande variation qualitative des défenses chimiques entre espèces, iii) de reconsidérer le cas d'*O. onega* car ces résultats remettent en cause la vision qu'il soit dépourvu d'alcaloïde pyrrolizidinique. Pour certaines espèces d'Ithomiini, les alcaloïdes pyrrolizidiniques constituent des défenses chimiques efficaces contre les araignées qui les rejettent la majorité du temps (Drummond, 1976; Brown, 1984; Masters, 1990). Les araignées du genre *Nephila* (Fig. 57) rejettent presque tout le temps les Ithomiini pris dans leur toiles alors que les Heliconiinae, Acraeinae ou encore Pieridae sont très souvent consommés (Vasconcellos-Neto & Lewinsohn, 1984). Néanmoins, ces araignées mangent les *Mechanitis polymnia* fraîchement émergées et donc encore dépourvues d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996). Les Ithomiini non comestibles pris dans la toile peuvent être libérés et relâchés intègres par l'araignée (Vasconcellos-Neto & Lewinsohn, 1984; Trigo, Brown, Witte, *et al.*, 1996). Contrairement aux prédateurs aviaires, les araignées ne se basent pas sur le patron de coloration des papillons, mais uniquement sur des signaux chimiques et leur comportement immobile dans la toile (Vasconcellos-Neto & Lewinsohn, 1984). Certains papillons sont aussi parfois délaissés des mantes religieuses (Trigo *et al.*, 1994).



Figure 57 : Prédateurs d'Ithomiini. A-B) Araignées du genre *Nephila*. C) Femelle *Mechanitis polymnia* mangée par une mante religieuse. Crédits photos : Ombeline Sculfort.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques ont un goût amer et peuvent moduler l'activité des neurorécepteurs 5-HT de la sérotonine et induire une répulsion immédiate des prédateurs pour les Ithomiini (Schmeller *et al.*, 1997; Wink *et al.*, 1998). Tous comme les Heliconiini, les Ithomiini ont une cuticule plutôt épaisse et résistante leur permettant de survivre à une attaque d'oiseau (Chai, 1986b; Brown, 1987). Bien que les Ithomiini soient chimiquement défendus, les oiseaux tel que les Thraupidae ou Momotidae en sont d'importants prédateurs (Bates, 1862; Brower & Brower, 1964; Cardoso, 1997). Certains oiseaux consomment les Ithomiini mais de façon particulière, se prémunissant ainsi des défenses chimiques. Au Brésil, les *Pipraeidea melanonota* (Thraupidae) pressent les Ithomiini adultes et n'en mangent que la partie la moins concentrée en alcaloïdes pyrrolizidiniques, c'est-à-dire l'abdomen (Brown & Neto, 1976). Les défenses chimiques différentes entre Heliconiini et Ithomiini partageant un patron de coloration, pourraient encore plus renforcer les interactions positives entre les espèces co-mimes. En effet les individus protégés par différentes classes de métabolites secondaires, seraient mieux défendus car la diversité de leurs goûts et leurs effets perçus par les prédateurs, stimulent l'apprentissage (Skelhorn & Rowe, 2005).

Il existe une très grande diversité des alcaloïdes pyrrolizidiniques susceptibles d'engendrer des réponses comportementales contrastées chez les prédateurs. Cependant l'effet de chaque molécule sur des prédateurs potentiels est inconnu. Des expériences de comportement sont maintenant nécessaires afin d'évaluer les effets de molécule isolée ou en mélange sur les prédateurs des Ithomiini.

Des défenses chimiques aux phéromones sexuelles mâles

En plus d'avoir un rôle prépondérant de défense chimique envers les prédateurs, les alcaloïdes pyrrolizidiniques détournés des plantes constituent des précurseurs de phéromones sexuelles volatiles cruciales pour l'attractivité des mâles adultes. Chez les Ithomiini, mais aussi toute la famille des Danainae, les principales molécules du bouquet phéromonal des mâles sont synthétisées à partir de la base nécine des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Ainsi l'hydroxydanaïdal, le danaïdal et la danaïdone font parties de la composition des phéromones sexuelles volatiles (Schulz, 1998; Hartmann & Ober, 2000; Schulz *et al.*, 2004). Des dérivés des alcaloïdes pyrrolizidiniques, comme des lactones, composent également le bouquet phéromonal des mâles. Par exemple, l'acide libéré du clivage de la lycopsamine est cyclisé en viridiflorine β -lactone ou métabolisé en ithomiolide A ou B (Fig. 58A–B) (Schulz & Hötling, 2015). Les phéromones sexuelles volatiles sont émises par des soies modifiées et érectiles caractéristiques des mâles ; les poils androconiaux (Fig. 58C) (Brown & D'Almeida, 1970; Eisner & Meinwald, 1995). Les phéromones sexuelles mâles étant dépendantes de l'identité et de la quantité des alcaloïdes pyrrolizidiniques ingérés, le bouquet phéromonal est susceptible d'être extrêmement variable entre et au sein des espèces. Les phéromones mâles pourraient donc être interprétées comme un signal honnête de la qualité du mâle par les femelles et ainsi les orienter leur choix de partenaire.

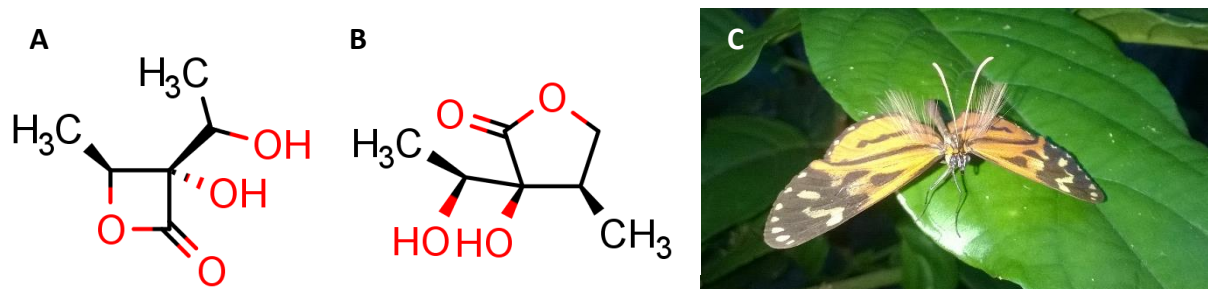


Figure 58 : A) Mâle *Hypothyris ninonia* dressant ses poils androconiaux et émettant ses phéromones sexuelles volatiles dans l'optique de trouver une partenaire. B) Viridiflorine β -lactone et C) ithomiolide A, dérivés d'alcaloïdes pyrrolizidiniques. Crédit photos : Ombeline Sculfort.

Dans quelle mesure les défenses chimiques et les phéromones, soit l'attractivité des mâles, sont corrélées n'est pas encore bien établi.

i) L'adaptation à un panel de sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques défini par les fleurs disponibles localement pourrait sous-tendre l'évolution des bouquets phéromonaux au sein des espèces. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant la similarité entre le profil chimique phéromonal d'une espèce de papillon et le profil chimique des sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques majoritairement visitées. Le calcul du signal phylogénétique des profils chimiques et des bouquets phéromonaux pourraient renseigner l'impact des relations phylogénétiques et de l'histoire évolutive de la tribu sur l'évolution des défenses chimiques et des phéromones entre les espèces.

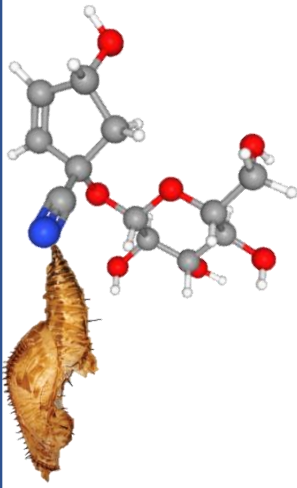
ii) Les réponses comportementales et les préférences des femelles aux bouquets phéromonaux des mâles, pourraient exercer une pression de sélection sur le comportement de pharmacophagie des mâles et ainsi induire des changements de sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques visitées entre les espèces. Des expériences comportementales testant le succès d'accouplement de mâles dont les sources en alcaloïdes pyrrolizidiniques sont contrôlées, permettraient d'évaluer les préférences des femelles. Je m'attendrais à ce que les mâles ayant été privé d'alcaloïdes pyrrolizidiniques ne soient pas ou peu attractifs pour les femelles de leur espèce.

iii) Les croisements hybrides entre espèces proches et mimétiques ont un coût, puisque les descendants ne sont pas forcément viables et un patron de coloration intermédiaire en très faible fréquence dans la population offre une protection réduite vis-à-vis des prédateurs (Mallet & Barton, 1989; Arias, Le Poul, *et al.*, 2016; Chouteau *et al.*, 2016). Il est donc envisageable de s'attendre à une évolution différente des bouquets phéromonaux (ayant des compositions très différentes ou ayant les mêmes composés en concentrations opposées) entre espèces proches vivant en sympatrie. Pour tester l'isolement reproducteur des espèces mimétiques proches par les phéromones de communication sexuelle, des expériences de comportement pour le choix de partenaires sexuels peuvent être mises en place. Un mâle peut être proposé à une femelle d'une autre espèce, dans un premier temps seul, puis en présence d'un mâle de la même espèce que la femelle. Si les deux mâles sont présentés ensemble dès le début, je m'attends plus à ce que la femelle s'accouple avec le mâle de son

espèce mais cela ne signifierait pas que l'autre mâle n'a aucun pouvoir attractif. Ajouter un mâle de la même espèce que la femelle servirait de contrôle pour déterminer si celle-ci est bien réceptive et à la recherche d'un partenaire. En effet, un mâle d'une autre espèce pourrait être attirant mais si la femelle n'est pas prête ou ne cherche pas à s'accoupler, cela biaiserait l'expérience.

Une différence frappante avec les Heliconiini est la grande diversité de composés de défense chez les Ithomiini, mais aussi que l'origine des défenses chimiques repose sur des mécanismes comportementaux et physiologiques très éloignés entre les deux tribus. Ce chapitre exploratoire alliant questions de biologie évolutive et chimie analytique des substances naturelles souligne cette grande diversité et devrait motiver de futures études sur les défenses chimiques des papillons mimétiques.





Discussion

générale



Au cours de cette thèse j'ai étudié l'évolution des défenses chimiques dans un clade de papillons mimétiques emblématiques en utilisant différentes méthodologies afin de mieux comprendre les mécanismes évolutifs impliqués.

L'évolution des défenses chimiques dépend-elle des motifs de coloration ?

Les papillons aposématifs ont généralement des couleurs chatoyantes très contrastées et détectables par les prédateurs potentiels associées à leurs défenses. Comment les défenses chimiques évoluent avec les motifs de coloration associé est une question largement débattue (Sherratt, 2008; Speed, Ruxton, *et al.*, 2010). Les motifs contrastés évoluent-ils fréquemment dans les espèces possédant des défenses ? Au contraire, les défenses évoluent-elles chez des espèces cryptiques ou mimant d'autres espèces défendues ? Puisque l'apprentissage par les prédateurs des motifs aposématifs génère une sélection fréquence dépendante, l'abondance du patron de coloration pourrait moduler la force de la sélection agissant sur les défenses chimiques : ainsi, dans les populations où les individus arborent un signal peu abondant, la sélection sur des niveaux de défenses fortes pourrait être plus importante. Ainsi, chez les mimes Müllérien, les défenses chimiques évoluent-elles en fonction de l'abondance des cercles mimétiques ? Chez les Heliconiini, des ailes vivement colorées sont associées à un signal de défenses chimiques plus ou moins fort. De fortes teneurs en glucosides cyanogènes ont été mesurées chez *Heliconius chartithonia vazquzae* ou *H. sara magdalena* (Chap. II), dans des populations où leurs cercles mimétiques sont relativement peu abondants. Au contraire, la répartition et la concentration des glucosides cyanogènes sont extrêmement variables chez *H. erato favorinus* avec des individus notamment dépourvus de ces molécules (Chap. II), tandis que ce cercle mimétique présente de fortes abondances. Si des différences de concentrations en glucosides cyanogènes ont été détectées entre cercles mimétiques dans notre étude (Chap. II), elles semblent largement expliquées par les relations d'apparement plus étroites entre espèces au sein des cercles mimétiques. Les estimations d'abondance par espèce étant des données difficiles à acquérir sur le terrain, les données actuelles ne permettent pas de tester de manière fiable l'hypothèse d'un lien entre niveau de défenses et abondance locale d'un cercle mimétique à l'échelle des Heliconiini.

Cependant, dans le cercle mimétique « postman » composés notamment d'*H. erato* et *H. melpomene* (des papillons noirs avec une tache rouge sur les ailes antérieures et une bande blanche sur les ailes postérieures rappelant l'uniforme des postiers de Trinidad), j'ai détecté des variations importantes concernant les défenses chimiques en fonction de leurs distributions géographiques (Chapitre II). Au Panama ce cercle mimétique regroupe les sous-espèces *H. erato demophoon* et *H. melpomene rosina*, et au Pérou/Equateur il regroupe *H. erato favorinus* et *H. melpomene amaryllis*. Ainsi un cercle mimétique où les individus partagent un même patron de coloration peut être présent dans des localités très éloignées sans se superposer. Ce qui est intéressant ici est que ce sont les mêmes espèces et le même patron de coloration partagés entre le Panama et le Pérou/Equateur. Pourtant les individus panaméens ont été caractérisés comme beaucoup plus défendus chimiquement par rapport à leurs sous-espèces péruviennes. Il serait intéressant de finement analyser l'effet du cercle mimétique et de la localité géographique pour des papillons partageant un même patron de coloration mais dans des localités différentes. Par exemple échantillonner soigneusement les cercles mimétiques « postman » et « bleu » au Pérou/Equateur, Panama et Brésil pour comprendre comment varient les profils chimiques entre les localités indépendamment du motif de coloration. En focalisant une étude sur un nombre restreint de cercles mimétiques et donc de sous-espèces, il serait possible d'égaleme nt acquérir des données d'abondance des papillons et de répartition des plantes hôtes.

Le niveau de défense a également fréquemment été relié à la force du signal aposématique (Bezzerides *et al.*, 2007; Maan & Cummings, 2012; María Arenas *et al.*, 2015), cette hypothèse du signal « honnête » a été remis en cause par des preuves théoriques (Blount *et al.*, 2009) et des observations empiriques (Darst & Cummings, 2006; Briolat *et al.*, 2019). Le chapitre I de cette thèse a notamment fait la lumière sur l'influence positive du mimétisme sur l'évolution de l'aposématisme, permettant à des signaux plus détectables d'émerger malgré le coût initial lié à la prédation. Ce modèle a également permis de montrer que des signaux faiblement détectables pouvaient se maintenir dans des populations mimétiques présentant des défenses chimiques. Ces résultats théoriques expliquent en partie l'émergence répétée et le maintien de motifs transparents chez les Ithomiini. Les Ithomiini peuvent avoir des patrons de coloration vifs et opaques, mais la grande majorité des espèces ont des couleurs subtiles et des ailes plus ou moins transparentes dues à des écailles modifiées, qui ne recouvrent plus

totale de la membrane de l'aile (Beccaloni, 1997; Willmott & Freitas, 2006). Les espèces avec des ailes transparentes sont aposématiquement et mimétiquement comme toutes les espèces d'Ithomiini mais peuvent paraître camouflées ou iridescentes selon les conditions lumineuses (Fig. 59) (Binetti *et al.*, 2009). La détectabilité des papillons est donc variable entre les espèces transparentes et colorées (Arias *et al.*, 2019; McClure *et al.*, 2019). Plusieurs hypothèses existent sur l'évolution conjointe de la transparence et des défenses chimiques chez les Ithomiini ; i) les espèces aux ailes transparentes seraient moins détectables par les prédateurs et investiraient moins dans les défenses chimiques, ii) les espèces transparentes compenseraient leur faible mémorabilité pour les prédateurs dû à l'absence de couleurs vives, par de fortes doses de défenses chimiques. Des expériences en conditions semi-naturelles ont montré que les Ithomiini transparents sont effectivement moins détectables par les prédateurs aviaires (Arias *et al.*, 2019) mais qu'ils sont autant voire plus défendus chimiquement que les espèces où les motifs colorés se maintiennent (McClure *et al.*, 2019). Cela pourrait être expliqué par le fait que i) les pressions de sélection pour l'augmentation des défenses chimiques seraient plus fortes chez les espèces transparentes pour balancer leur patron de coloration moins mémorable pour les prédateurs, ou ii) de fortes quantités de défenses chimiques accélèrent l'apprentissage des prédateurs dans l'évitement des proies aposématiquement (Skelhorn & Rowe, 2006; Rowland *et al.*, 2007) et pourrait relâcher les pressions de sélection sur le patron de coloration vif. Ce phénomène de compromis entre de fortes défenses chimiques et un signal d'alerte plus terne a déjà été démontré chez des grenouilles dendrobates (Wang, 2011). Mes résultats théoriques (Chapitre I) comme empiriques (Chapitre II) suggèrent une influence possible des motifs de colorations sur l'évolution des défenses chimiques mais soulignent également l'influence d'autres facteurs tels que l'adaptation aux variations locales en plantes hôtes et le signal phylogénétique.



Figure 59 : Accouplement d'*Ithomia agnosia*. Ces papillons ont des ailes partiellement transparentes. Suivant l'angle d'incidence de la lumière, les ailes sont iridescentes (papillon de gauche) ou non (papillon de droite). Crédit photo : Ombeline Sculfort

De la phylogénie à l'adaptation locale : une histoire évolutive complexe des glucosides cyanogènes chez les Heliconiini

Les recherches décrites dans le deuxième chapitre, constituent la première étude à grande échelle de caractérisation des défenses chimiques chez des papillons sauvages. Ces analyses précises de la nature et de la concentration de chacun des glucosides cyanogènes ont permis de mettre en évidence deux nouveaux composés présent chez les Heliconiini, l'épilotaustraline probablement synthétisée en même temps que son stéréoisomère lotaustraline et un stéréoisomère de la tétraphylline A qui est très probablement la deidacline. Les résultats de ces analyses, mais également les données d'élevage du troisième chapitre, attestent de l'importance de la synthèse dans la teneur en glucosides cyanogènes totaux. Les espèces basales du genre *Eueides* ont les plus fortes concentrations de linamarine, mettant ainsi en lumière de fortes capacités de synthèse des glucosides cyanogènes dans ce genre. En termes de glucosides cyanogènes, ce sont les espèces du genre *Eueides* qui sont les plus défendues, (malgré un fort biais d'échantillonnage en faveur des *Heliconius*), ce qui bouscule l'hypothèse classique que le genre *Heliconius*, le plus dérivé, est aussi le plus chimiquement défendu.

Toutes les espèces d'Heliconiini sont en mesure de synthétiser eux-mêmes leurs glucosides cyanogènes. Ce caractère commun se reflète dans le signal phylogénétique calculé à l'échelle de la tribu, qui atteste que les profils chimiques des espèces sont grandement contrôlés par les relations phylogénétiques et l'histoire évolutive de ces papillons (Chapitre II). Les résultats de mes expériences d'élevage de papillons dans laquelle l'accès aux plantes hôtes était contrôlé, ont également suggéré un contrôle génétique au moins partiel des profils chimiques (Chapitre III). Cependant, des sous-espèces géographiquement séparées ont des profils chimiques différents, surtout concernant les molécules séquestrées des plantes hôtes, suggérant également des adaptations locales à la disponibilité en plantes hôtes. Ainsi, *H. erato* peut exploiter *P. auriculata* et *P. bicornis* en Amérique Centrale et *P. actinia* et *P. alata* dans l'Est du bassin Amazonien (Jiggins, 2016). L'adaptation aux plantes hôtes est donc variable entre les localités ce qui suggère une évolution intraspécifique et/ou de la plasticité pour l'utilisation des plantes hôtes. De par les variations de la répartition des espèces de passiflores, les papillons sont susceptibles de ne pas avoir accès aux mêmes glucosides cyanogènes potentiels à séquestrer suivant les localités. Si les plantes hôtes varient localement, c'est également le cas des communautés de prédateurs, qui n'ont pas forcément les mêmes sensibilités aux défenses chimiques des papillons. Ainsi, localement, des capacités de synthèse différentielles pourraient être sélectionnées chez les Heliconiini sous la pression de sélection exercée par les prédateurs. La différence de communautés de plantes hôtes et de prédateurs peut donc conduire à des variations importantes de glucosides cyanogènes entre les localités et donc entre les cercles mimétiques.

Quant à savoir quel caractère entre le patron de coloration mimétique et les défenses chimiques a émergé en premier, il n'est pas possible de conclure sans ambiguïté ici. Deux hypothèses alternatives peuvent cependant être proposées :

- 1) Les ancêtres des Heliconiini étaient très colorés, sans défenses chimiques mais mimes Batésiens d'autres espèces chimiquement défendues. Puis, par apparition et acquisition de glucosides cyanogènes par synthèse et/ou par séquestration de par leur adaptation aux passiflores, les défenses chimiques auraient pu évoluer chez les Heliconiini, favorisant l'émergence d'un mimétisme Müllerien. Il est très probable que l'ancêtre commun des Heliconiini fut aposématique car les espèces de la famille des Heliconiinae sont très colorées

et chimiquement défendues. En effet, les espèces aposématiques du genre *Cethosia*, vivant en Asie et en Océanie, présentent les glucosides cyanogènes linamarine et lotaustraline (Nahrstedt & Davis, 1981). Comme les Heliconiini en Amérique du Sud, les chenilles de *Cethosia* se nourrissent de plantes de la famille des Passifloraceae, du genre *Adenia* (et non du genre *Passiflora* absent des continents africain et océanien) (Parsons, 1999; Vane-Wright & Jong, 2003). Au sein des Acraeini, la tribu sœur des Heliconiini, la linamarine et la lotaustraline sont exprimées chez des espèces des genres *Acraea* (Afrique, Océanie) et *Actinote* (Amérique du Sud, Afrique et Océanie) (Nahrstedt & Davis, 1981; Francini & Penz, 2006; Silva-Brandão *et al.*, 2008). En plus de synthétiser des glucosides cyanogènes tout au long de leur vie, les *Actinote* d'Amérique du Sud séquestrent de grandes quantités d'alcaloïdes pyrrolizidiniques à partir d'Asteraceae, comme les Ithomiini (Francini, 1989; Brown & Francini, 1990).

2) Les ancêtres des Heliconiini avaient des patrons de couleur cryptique. Suite à l'apparition de la synthèse et/ou au détournement des glucosides cyanogènes des passiflores, ils auraient acquis des défenses chimiques contre les prédateurs. Des mutations pour des motifs de coloration aposématiques auraient pu plus facilement être sélectionnées dans ces populations défendues chimiquement. Sous cette deuxième hypothèse, le mimétisme envers d'autres espèces défendues aurait également pu faciliter l'évolution de motifs aposématiques dans des populations cryptiques (Chapitre I). Ainsi, il en découle l'intérêt d'étudier l'évolution des défenses chimiques des espèces co-mimes telles que les Ithomiini pour comparer l'origine et l'histoire évolutive des défenses chimiques. Les recherches des chapitres IV et V ont pu amorcer cette thématique d'exploration et de distribution des défenses chimiques. Les premiers résultats chez les Ithomiini montrent une grande diversité et complexité des alcaloïdes pyrrolizidiniques, bien que l'obstacle principal soit de définir un protocole d'identification robuste et discriminant à large spectre aux vues des nombreuses molécules candidates. Étendre les recherches sur l'origine, la nature et les variations des composés chimiques de défenses à tous les Heliconiinae d'Amérique du Sud, mais aussi des Ithomiini, permettraient de mieux comprendre l'évolution des défenses chimiques chez les espèces mimétiques.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOURASHED, E.A., VANDERPLANK, J., & KHAN, I.A. (2003) High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants – II. Application to Harman Alkaloids of Genus *Passiflora*. *Pharmaceutical Biology*, **41**, 100–106.
- ADAMS, D.C. (2014) A Generalized K Statistic for Estimating Phylogenetic Signal from Shape and Other High-Dimensional Multivariate Data. *Syst Biol*, **63**, 685–697.
- ALCOCK, J. (1970a) Punishment levels and the response of black-capped chickadees (*Parus atricapillus*) to three kinds of artificial seeds. *Animal Behaviour*, **18**, 592–599.
- ALCOCK, J. (1970b) Punishment levels and the response of white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*) to three kinds of artificial models and mimics. *Animal Behaviour*, **18**, 733–739.
- ALDRICH, J.R., CARROLL, S.P., LUSBY, W.R., THOMPSON, M.J., KOCHANSKY, J.P., & WATERS, R.M. (1990) Sapindaceae, cyanolipids, and bugs. *J Chem Ecol*, **16**, 199–210.
- ALEXANDROU, M.A., OLIVEIRA, C., MAILLARD, M., MCGILL, R.A.R., NEWTON, J., CREER, S., & TAYLOR, M.I. (2011) Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. *Nature*, **469**, 84–88.
- ANDERSEN, L., ADSERSEN, A., & JAROSZEWSKI, J. (1998) Cyanogenesis of *Passiflora foetida*. *Phytochemistry*, **47**, 1049–1050.
- ARIAS, M., LE POUL, Y., CHOUTEAU, M., BOISSEAU, R., ROSSER, N., THERY, M., & LLAURENS, V. (2016) Crossing fitness valleys: empirical estimation of a fitness landscape associated with polymorphic mimicry. *Proc. R. Soc. B*, **283**, 20160391.
- ARIAS, M., MAPPES, J., DESBOIS, C., GORDON, S., MCCLURE, M., ELIAS, M., NOKELAINEN, O., & GOMEZ, D. (2019) Transparency reduces predator detection in mimetic clearwing butterflies. *Functional Ecology*, **0**.
- ARIAS, M., MEICHANETZOGLOU, A., ELIAS, M., ROSSER, N., DE-SILVA, D.L., NAY, B., & LLAURENS, V. (2016) Variation in cyanogenic compounds concentration within a *Heliconius* butterfly community: does mimicry explain everything? *BMC Evolutionary Biology*, **16**, 272.
- ASKELAND, R.A. & MORRISON, S.M. (1983) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, **45**, 1802–1807.
- AUBIER, T.G. & SHERRATT, T.N. (2015) Diversity in Müllerian mimicry: The optimal predator sampling strategy explains both local and regional polymorphism in prey. *Evolution*, **69**, 2831–2845.
- BAK, S., KAHN, R.A., NIELSEN, H.L., MØLLER, B.L., & HALKIER, B.A. (1998) Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol Biol*, **36**, 393–405.
- BAK, S., PAQUETTE, S.M., MORANT, M., MORANT, A.V., SAITO, S., BJARNHOLT, N., ZAGROBELNY, M., JØRGENSEN, K., OSMANI, S., SIMONSEN, H.T., PEREZ, R.S., VAN HEESWIJCK, T.B., JØRGENSEN, B., & MØLLER, B.L. (2006) Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochemistry Reviews*, **5**, 309–329.
- BARBEHENN, R.V. & CONSTABEL, P.C. (2011) Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry, Plant-Insect Interactions*, **72**, 1551–1565.

- BARBEHENN, R.V., WALKER, A.C., & UDDIN, F. (2003) Antioxidants in the Midgut Fluids of a Tannin-Tolerant and a Tannin-Sensitive Caterpillar: Effects of Seasonal Changes in Tree Leaves. *J Chem Ecol*, **29**, 1099–1116.
- BATES, H.W. (1862) Contributions to an Insect Fauna of the Amazon Valley. Lepidoptera: Heliconidae. *Transactions of the Linnean Society of London*, **23**, 495–566.
- BATES, H.W. (1863) *The Naturalist on the River Amazon: A Record of Adventures, Habits of Animals, Sketches of Brazilian and Indian Life, and Aspects of Nature under the Equator, during Eleven Years of Travel*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- BATES, H.W. (1981) Contributions to an insect fauna of the Amazon valley (Lepidoptera: Heliconidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **16**, 41–54.
- BEALES, K.A., BETTERIDGE, K., COLEGATE, S.M., & EDGAR, J.A. (2004) Solid-Phase Extraction and LC–MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in Honeys. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6664–6672.
- BECCALONI, G.W. (1997) Ecology, natural history and behaviour of Ithomiine butterflies and their mimics in Ecuador (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Tropical Lepidoptera Research*, **8**, 103–124.
- BENNETT, R.N. & WALLSGROVE, R.M. (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, **127**, 617–633.
- BENSON, W.W. (1972) Natural Selection for Müllerian Mimicry in *Heliconius erato* in Costa Rica. *Science*, **176**, 936–939.
- BENSON, W.W. (1978) Resource Partitioning in Passion Vine Butterflies. *Evolution*, **32**, 493–518.
- BENSON, W.W., BROWN, K.S., & GILBERT, L.E. (1975) Coevolution of Plants and Herbivores: Passion Flower Butterflies. *Evolution*, **29**, 659–680.
- BENTLEY, B.L. (1977) Extrafloral Nectaries and Protection by Pugnacious Bodyguards. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **8**, 407–427.
- BERENBAUM, M. (1980) Adaptive Significance of Midgut pH in Larval Lepidoptera. *The American Naturalist*, **115**, 138–146.
- BERNAYS, E.A., CHAPMAN, R.F., LEATHER, E.M., MCCAFFERY, A.R., & MODDER, W.W.D. (1977) The relationship of *Zonocerus variegatus* (L.) (Acridoidea: Pyrgomorphidae) with cassava (*Manihot esculenta*). *Bulletin of Entomological Research*, **67**, 391–404.
- BEZZERIDES, A.L., MCGRAW, K.J., PARKER, R.S., & HUSSEINI, J. (2007) Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behav Ecol Sociobiol*, **61**, 1401–1408.
- BILLINGTON, H.L., THOMAS, C.D., & GILBERT, L.E. (1990) Variation in Stage-Specific Mortality Patterns of a Specialist Herbivore on Different Host Plant Clones. *Functional Ecology*, **4**, 721.
- BINETTI, V.R., SCHIFFMAN, J.D., LEAFFER, O.D., SPANIER, J.E., & SCHAUER, C.L. (2009) The natural transparency and piezoelectric response of the Greta oto butterfly wing. *Int Bio (Cam)*, **1**, 324–329.
- BJARNHOLT, N. & MØLLER, B.L. (2008) Hydroxynitrile glucosides. *Phytochemistry*, **69**, 1947–1961.
- BLOMBERG, S.P., GARLAND, T., & IVES, A.R. (2003) Testing for Phylogenetic Signal in Comparative Data: Behavioral Traits Are More Labile. *Evolution*, **57**, 717–745.
- BLOUNT, J.D., SPEED, M.P., RUXTON, G.D., & STEPHENS, P.A. (2009) Warning displays may function as honest signals of toxicity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, 871–877.
- BOIÇA JUNIOR, A.L., ANGELINI, M.R., & OLIVEIRA, J.C. de (2008) Biological aspects of *Dione juno juno* (cramer) (Lepidoptera: nymphalidae) on passion fruit genotypes. *Biological aspects of*

- Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) on passion fruit genotypes, 101–105.
- BOLARINWA, I.F., OKE, M.O., OLANIYAN, S.A., & AJALA, A.S. (2016) A Review of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants. *Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum*, DOI: 10.5772/64886.
- BOND, E.J. (1961) The action of fumigants on insects. III. The fate of hydrogen cyanide in *Sitophilus granarius* (L.). *Can J Biochem Physiol*, **39**, 1793–1802.
- BOPPRE, M. (1984) Chemically mediated interactions between butterflies. *The biology of butterflies* (Vane-Wright, R.I. & Ackery, P.R. eds). London: Academic Press.
- BORDO, D. (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. *EMBO Reports*, **3**, 741–746.
- BOYDEN, T.C. (1976) Butterfly Palatability and Mimicry: Experiments with Ameiva Lizards. *Evolution*, **30**, 73–81.
- BRABY, M.F., EASTWOOD, R., & MURRAY, N. (2012) The subspecies concept in butterflies: has its application in taxonomy and conservation biology outlived its usefulness? *Biol J Linn Soc*, **106**, 699–716.
- BRAGLIA, L., GAVAZZI, F., GIOVANNINI, A., NICOLETTI, F., DE BENEDETTI, L., & BREVIARIO, D. (2014) TBP-assisted species and hybrid identification in the genus *Passiflora*. *Molecular Breeding*, **33**, 209–219.
- BRATTSTEN, L.B., SAMUELIAN, J.H., LONG, K.Y., KINCAID, S.A., & EVANS, C.K. (1983) Cyanide as a feeding stimulant for the southern army worm, *Spodoptera eridania*. *Ecological Entomology*, **8**, 125–132.
- BRIOLAT, E.S., ZAGROBELNY, M., OLSEN, C.E., BLOUNT, J.D., & STEVENS, M. (2019) No evidence of quantitative signal honesty across species of aposematic burnet moths (Lepidoptera: Zygaenidae). *Journal of Evolutionary Biology*, **32**, 31–48.
- BRISCOE, A.D., BYBEE, S.M., BERNARD, G.D., YUAN, F., SISON-MANGUS, M.P., REED, R.D., WARREN, A.D., LLORENTE-BOUSQUETS, J., & CHIAO, C.-C. (2010) Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 3628–3633.
- BRISCOE, A.D. & CHITTKA, L. (2001) The evolution of color vision in insects. *Annual review of entomology*, **46**, 471–510.
- BRISCOE, A.D., MACIAS-MUÑOZ, A., KOZAK, K.M., WALTERS, J.R., YUAN, F., JAMIE, G.A., MARTIN, S.H., DASMAHAPATRA, K.K., FERGUSON, L.C., MALLET, J., JACQUIN-JOLY, E., & JIGGINS, C.D. (2013) Female Behaviour Drives Expression and Evolution of Gustatory Receptors in Butterflies. *PLOS Genetics*, **9**, e1003620.
- BROOM, M., RUXTON, G.D., & SPEED, M.P. (2008) Evolutionarily stable investment in anti-predatory defences and aposematic signalling. *Mathematical modeling of biological systems, Volume II*. Springer, pp. 37–48.
- BROOM, M., SPEED, M.P., & RUXTON, G.D. (2006) Evolutionarily stable defence and signalling of that defence. *Journal of Theoretical Biology*, **242**, 32–43.
- BROWER, L.P. & BROWER, J.V.Z. (1964) Birds, butterflies and plant poisons: a study in ecological chemistry. *Zoologica, N.Y.*, **49**, 137–159.
- BROWER, L.P., MCEVOY, P.B., WILLIAMSON, K.L., & FLANNERY, M.A. (1972) Variation in Cardiac Glycoside Content of Monarch Butterflies from Natural Populations in Eastern North America. *Science*, **177**, 426–429.
- BROWER, L.P., VAN BROWER, J., & CORVINO, J.M. (1967) Plant poisons in a terrestrial food chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **57**, 893–898.

- BROWN, K.S. (1972) The Heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part III. Ecology and biology of {*Heliconius nattereri*}, a key primitive species near extinction and comments on the evolutionary development of {*Heliconius*} and {*Eueides*}. *Zoologica, N.Y.*, **57**, 41–69.
- BROWN, K.S. (1981) The Biology of *Heliconius* and Related Genera. *Annual Review of Entomology*, **26**, 427–457.
- BROWN, K.S. (1984) Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiine butterflies against a spider predator. *Nature*, **309**, 707–709.
- BROWN, K.S. (1987) Chemistry at the Solanaceae/Ithomiinae Interface. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **74**, 359–397.
- BROWN, K.S. & BENSON, W.W. (1974) Adaptive Polymorphism Associated with Multiple Mullerian Mimicry in *Heliconius numata* (Lepid. Nymph.). *Biotropica*, **6**, 205.
- BROWN, K.S. & D'ALMEIDA, R.F. (1970) The Ithomiinae of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). II. A New Genus and Species of Ithomiinae with Comments on the Tribe Dircennini D'Almeida. *Transactions of the American Entomological Society (1890-)*, **96**, 1–18.
- BROWN, K.S. & FRANCINI, R.B. (1990) Evolutionary strategies of chemical defense in aposematic butterflies: Cyanogenesis in Asteraceae-feeding American Acraeinae. *Chemoecology*, **1**, 52–56.
- BROWN, K.S. & NETO, J.V. (1976) Predation on Aposematic Ithomiine Butterflies by Tanagers (*Pipraeidea melanonota*). *Biotropica*, **8**, 136.
- BRÜCKMANN, M., TRIGO, J.R., FOGGIO, M.A., & HARTMANN, T. (2000) Storage and metabolism of radioactively labeled pyrrolizidine alkaloids by butterflies and larvae of *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae, Ithomiinae). *Chemoecology*, **10**, 25–32.
- BRÜCKNER, A., RASPOTNIG, G., WEHNER, K., MEUSINGER, R., NORTON, R.A., & HEETHOFF, M. (2017) Storage and release of hydrogen cyanide in a chelicerate (*Oribatula tibialis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, 3469–3472.
- BRUES, C.T. (1924) The Specificity of Food-Plants in the Evolution of Phytophagous Insects. *The American Naturalist*, **58**, 127–144.
- BUNCH, A.W. & KNOWLES, C.J. (1982) Production of the Secondary Metabolite Cyanide by Extracts of *Chromobacterium violaceum*. *Microbiology*, **128**, 2675–2680.
- BYBEE, S.M., YUAN, F., RAMSTETTER, M.D., LLORENTE-BOUSQUETS, J., REED, R.D., OSORIO, D., & BRISCOE, A.D. (2012) UV Photoreceptors and UV-Yellow Wing Pigments in *Heliconius* Butterflies Allow a Color Signal to Serve both Mimicry and Intraspecific Communication. *The American Naturalist*, **179**, 38–51.
- CARDOSO, M.Z. (1997) Testing chemical defence based on pyrrolizidine alkaloids. *Animal Behaviour*, **54**, 985–991.
- CARDOSO, M.Z. (2008) Herbivore handling of a Plants trichome: the case of *Heliconius charithonia* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Passiflora lobata* (Killip) Hutch. (Passifloraceae). *Neotropical Entomology*, **37**, 247–252.
- CARDOSO, M.Z. (2019) The effect of insect cyanoglucosides on predation by domestic chicks. *bioRxiv*, DOI: 10.1101/662288.
- CARDOSO, M.Z. & GILBERT, L. (2006) A male gift to its partner? Cyanogenic glycosides in the spermatophore of longwing butterflies (*Heliconius*). *Naturwissenschaften*, **94**, 39–42.
- CARDOSO, M.Z. & GILBERT, L.E. (2013) Pollen feeding, resource allocation and the evolution of chemical defence in passion vine butterflies. *J. Evol. Biol.*, **26**, 1254–1260.
- CAVIN, J.C. & BRADLEY, T. (1988) Adaptation to ingestion of β -carboline alkaloids by Heliconiini butterflies. *Journal of Insect Physiology*, **34**, 1071–1075.

- CAVIN, J.C. & RODRIGUEZ, E. (1988) The influence of dietary β -carboline alkaloids on growth rate, food consumption, and food utilization of larvae of *Spodoptera exigua* (Hubner). *J Chem Ecol*, **14**, 475–484.
- CHAI, P. (1986a) Field observations and feeding experiments on the responses of rufous-tailed jacamars, *Galbula ruficauda*, to free-flying butterflies in a tropical rainforest. *Biol. J. Linn. Soc.*, **29**, 166–189.
- CHAI, P. (1986b) Field observations and feeding experiments on the responses of rufous-tailed jacamars (*Galbula ruficauda*) to free-flying butterflies in a tropical rainforest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **29**, 161–189.
- CHAI, P. (1996) Butterfly visual characteristics and ontogeny of responses to butterflies by a specialized tropical bird. *Biological Journal of the Linnean Society*, **59**, 37–67.
- CHANTAWEE, A. & SOONWERA, M. (2018) Efficacies of four plant essential oils as larvicide, pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **8**, 217.
- CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. (1975) Theoretical genetics of batesian mimicry I. Single-locus models. *Journal of Theoretical Biology*, **55**, 283–303.
- CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. (2011) Mimicry: The Hunting of the Supergene. *Current Biology*, **21**, R846–R848.
- CHASSAGNE, D., CROUZET, J.C., BAYONOVE, C.L., & BAUMES, R.L. (1996) Identification and Quantification of Passion Fruit Cyanogenic Glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3817–3820.
- CHAUHAN, R., JONES, R., WILKINSON, P., PAUCHET, Y., & FFRENCH-CONSTANT, R. (2013) Cytochrome P450-encoding genes from the *Heliconius* genome as candidates for cyanogenesis. *Insect Mol Biol*, **22**, 532–540.
- CHAZOT, N., WAHLBERG, N., FREITAS, A.V.L., MITTER, C., LABANDEIRA, C., SOHN, J.C., SAHOO, R.K., SERAPHIM, N., DE JONG, R., & HEIKKILÄ, M. (2019) Priors and Posteriors in Bayesian Timing of Divergence Analyses : The Age of Butterflies Revisited. *Systematic Biology*, **68**, 797–813.
- CHAZOT, N., WILLMOTT, K.R., FREITAS, A.V.L., DE SILVA, D.L., PELLENS, R., & ELIAS, M. (2016) Patterns of Species, Phylogenetic and Mimicry Diversity of Clearwing Butterflies in the Neotropics. *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics*, vol. 14 (Pellens, R. & Grandcolas, P. eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 333–354.
- CHAZOT, N., WILLMOTT, K.R., LAMAS, G., FREITAS, A.V.L., PIRON-PRUNIER, F., ARIAS, C.F., MALLET, J., DE-SILVA, D.L., & ELIAS, M. (2019) Renewed diversification following Miocene landscape turnover in a Neotropical butterfly radiation. *Global Ecology and Biogeography*, **28**, 1118–1132.
- CHAZOT, N., WILLMOTT, K.R., SANTACRUZ ENDARA, P.G., TOPOROV, A., HILL, R.I., JIGGINS, C.D., ELIAS, M., SCHMITZ, A.E.O.J., & BRONSTEIN, E.J.L. (2014) Mutualistic Mimicry and Filtering by Altitude Shape the Structure of Andean Butterfly Communities. *The American Naturalist*, **183**, 26–39.
- CHOUTEAU, M. & ANGERS, B. (2011) The Role of Predators in Maintaining the Geographic Organization of Aposematic Signals. *The American Naturalist*, **178**, 810–817.
- CHOUTEAU, M., ARIAS, M., & JORON, M. (2016) Warning signals are under positive frequency-dependent selection in nature. *PNAS*, **113**, 2164–2169.
- CHOUTEAU, M., DEZEURE, J., SHERRATT, T.N., LLAURENS, V., & JORON, M. (2019) Similar predator aversion for natural prey with diverse toxicity levels. *Animal Behaviour*, **153**, 49–59.

- CONN, E.E. (1978) Cyanogenesis, the production of hydrogen cyanide, by plants. *Effects of Poisonous Plants on Livestock* (Keeler, R.F., Van kampen, K.R., & James, L.F. eds). Academic Press, pp. 301–310.
- CONN, E.E. (1980) Cyanogenic Compounds. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**, 433–451.
- CONTAM, E.P. on C. in the F.C., SCHRENK, D., BIGNAMI, M., BODIN, L., CHIPMAN, J.K., DEL MAZO, J., GRASL-KRAUPP, B., HOGSTRAND, C., HOOGENBOOM, L. (Ron), LEBLANC, J.-C., NEBBIA, C.S., NIELSEN, E., NTZANI, E., PETERSEN, A., SAND, S., VLEMINCKX, C., WALLACE, H., BENFORD, D., BRIMER, L., MANCINI, F.R., METZLER, M., VIVIANI, B., ALTIERI, A., ARCELLA, D., STEINKELLNER, H., & SCHWERDTLE, T. (2019) Evaluation of the health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in foods other than raw apricot kernels. *EFSA Journal*, **17**, e05662.
- COOPER-DRIVER, G.A. & SWAIN, T. (1976) Cyanogenic polymorphism in bracken in relation to herbivore predation. *Nature*, **260**, 604–604.
- CORTESI, F. & CHENEY, K.L. (2010) Conspicuousness is correlated with toxicity in marine opisthobranchs. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 1509–1518.
- CRANE, J. (1955) Imaginal behavior of a Trinidad butterfly, *Heliconius erato hydara* Hewitson, with special reference to the social use of color. *Zoologica : scientific contributions of the New York Zoological Society.*, **40**, 167–196.
- Cytoscape (2019) . URL <https://cytoscape.org/>.
- DALISAY, D., KIM, K.W., LEE, C., YANG, H., RÜBEL, O., BOWEN, B., DAVIN, L., & LEWIS, N. (2015) Dirigent protein-mediated lignan and cyanogenic glucoside formation in flax seed: integrated omics and maldi mass spectrometry imaging. *J. Nat. Prod.*, **78**, 1231–1242.
- DARRAGH, K., MONTEJO-KOVACEVICH, G., KOZAK, K.M., MORRISON, C.R., FIGUEIREDO, C.M.E., READY, J.S., SALAZAR, C., LINARES, M., BYERS, K.J.R.P., MERRILL, R.M., McMILLAN, W.O., SCHULZ, S., & JIGGINS, C.D. (2019) Species specificity and intraspecific variation in the chemical profiles of *Heliconius* butterflies across a large geographic range. *bioRxiv*, 573469.
- DARST, C.R. & CUMMINGS, M.E. (2006) Predator learning favours mimicry of a less-toxic model in poison frogs. *Nature*, **440**, 208–211.
- DAVIS, R.H. & NAHRSTEDT, A. (1982) Occurrence and variation of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in species of the zygaenidae (insecta:lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **71**, 329–332.
- DAVIS, R.H. & NAHRSTEDT, A. (1987) Biosynthesis of cyanogenic glucosides in butterflies and moths. *Insect Biochemistry*, **17**, 689–693.
- DE CASTRO, É.C.P., DEMIRTAS, R., ORTEU, A., OLSEN, C.E., MOTAWIE, M.S., ZIKAN CARDOSO, M., ZAGROBELNY, M., & BAK, S. (2019) Sequestration and functional diversification of cyanogenic glucosides in the life cycle of *Heliconius melpomene*. *bioRxiv*, DOI: 10.1101/723973.
- DE CASTRO, É.C.P., ZAGROBELNY, M., CARDOSO, M.Z., & BAK, S. (2017) The arms race between heliconiine butterflies and *Passiflora* plants - new insights on an ancient subject: New insights on an ancient subject. *Biological Reviews*, DOI: 10.1111/brv.12357.
- DE CASTRO, É.C.P., ZAGROBELNY, M., ZURANO, J.P., CARDOSO, M.Z., FEYEREISEN, R., & BAK, S. (2019) Sequestration and biosynthesis of cyanogenic glucosides in passion vine butterflies and consequences for the diversification of their host plants. *Ecology and Evolution*, DOI: 10.1002/ece3.5062.
- DEINERT, E.I., LONGINO, T., GILBERT, L.E., LOBILSKI, R., WITTE, C., ADAMS, F.C., TEISSEDRE, P.L., CABANIS, C., & BOUTRON, C.F. (1994) Mate competition in butterflies, 2.

- DELL'AGLIO, D.D., LOSADA, M.E., & JIGGINS, C.D. (2016) Butterfly Learning and the Diversification of Plant Leaf Shape. *Front. Ecol. Evol.*, **4**.
- DEMENT, W.A. & MOONEY, H.A. (1974) Seasonal variation in the production of tannins and cyanogenic glucosides in the chaparral shrub, *Heteromeles arbutifolia*. *Oecologia*, **15**, 65–76.
- DETZEL, A. & WINK, M. (1993) Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant volatiles, **4**, 11.
- DHAWAN, K., DHAWAN, S., & SHARMA, A. (2004) Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, **94**, 1–23.
- DIAZ-VIVANCOS, P., BERNAL-VICENTE, A., CANTABELLA, D., PETRI, C., & HERNANDEZ, J.A. (2017) Metabolomics and Biochemical Approaches Link Salicylic Acid Biosynthesis to Cyanogenesis in Peach Plants. *Plant Cell Physiol.*, **58**, 2057–2066.
- DONG, D., JONES, G., & ZHANG, S. (2009) Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 12.
- DRUMMOND, B.A. (1976) *Comparative ecology and mimetic relationships of ithomiine butterflies in eastern Ecuador* /.
- DRUMMOND, B.A. & BROWN, K.S. (1987) Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae): Summary of Known Larval Food Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **74**, 341–358.
- DUNLAP-PIANKA, H., BOGGS, C.L., & GILBERT, L.E. (1977) Ovarian Dynamics in Heliconiine Butterflies: Programmed Senescence versus Eternal Youth. *Science*, **197**, 487–490.
- DUNLAP-PIANKA, H.L. (1979) Ovarian dynamics in *Heliconius* butterflies: Correlations among daily oviposition rates, egg weights, and quantitative aspects of oögenesis. *Journal of Insect Physiology*, **25**, 741–749.
- DURKEE, L.T., BAIRD, C.W., & COHEN, P.F. (1984) Light and Electron Microscopy of the Resin Glands of *Passiflora foetida* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, **71**, 596–602.
- ECHEVERRI, F., CARDONA, G., TORRES, F., PELAEZ, C., QUIÑONES, W., & RENTERIA, E. (1991) Ermanin: An insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. *Phytochemistry*, **30**, 153–155.
- EDGAR, J.A. (1982) Pyrrolizidine alkaloids sequestered by Solomon Island Danaine butterflies. The feeding preferences of the Danainae and Ithomiinae. *Journal of Zoology*, **196**, 385–399.
- EDGAR, J.A. (1983) Pyrrolizidine alkaloids in insect-plant co-evolution. *Toxicon*, **21**, 97–100.
- EHRlich, P.R. & GILBERT, L.E. (1973) Population structure and dynamics of the tropical butterfly *Heliconius ethilla*. *Biotropica*, **5**, 69–82.
- EHRlich, P.R. & RAVEN, P.H. (1964) Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution*, **18**, 586–608.
- EISNER, T. & MEINWALD, J. (1995) The chemistry of sexual selection. *PNAS*, **92**, 50–55.
- ELIAS, M., GOMPERT, Z., JIGGINS, C., & WILLMOTT, K. (2008) Mutualistic Interactions Drive Ecological Niche Convergence in a Diverse Butterfly Community. *PLOS Biology*, **6**, e300.
- ELIAS, M. & JORON, M. (2015) Mimicry in *Heliconius* and Ithomiini butterflies: The profound consequences of an adaptation. *BIO Web of Conferences*, **4**, 00008.
- ELIAS, M., JORON, M., WILLMOTT, K., SILVA-BRANDÃO, K.L., KAISER, V., ARIAS, C.F., PIÑEREZ, L.M.G., URIBE, S., BROWER, A.V.Z., FREITAS, A.V.L., & JIGGINS, C.D. (2009) Out of the Andes: patterns of diversification in clearwing butterflies. *Molecular Ecology*, **18**, 1716–1729.
- ENGLER, H. & GILBERT, L.E. (2007) De novo synthesis vs. sequestration: negatively correlated metabolic traits and the evolution of host plant specialization in cyanogenic butterflies. *J Chem Ecol*, **33**, 25–42.

- ENGLER, H., SPENCER, K.C., & GILBERT, L.E. (2000) Insect metabolism: Preventing cyanide release from leaves. *Nature*, **406**, 144–145.
- ESTRADA, C. & JIGGINS, C.D. (2002) Patterns of pollen feeding and habitat preference among *Heliconius* species. *Ecological Entomology*, **27**, 448–456.
- FINKBEINER, S.D., BRISCOE, A.D., & REED, R.D. (2012) The benefit of being a social butterfly: communal roosting deters predation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **279**, 2769–2776.
- FORSLUND, K., MORANT, M., JØRGENSEN, B., OLSEN, C.E., ASAMIZU, E., SATO, S., TABATA, S., & BAK, S. (2004) Biosynthesis of the Nitrile Glucosides Rhodiocyanoside A and D and the Cyanogenic Glucosides Lotaustralin and Linamarin in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*, **135**, 71–84.
- FOURNIER, I. (2007) Développements en Imagerie par Spectrométrie de Masse MALDI et Applications aux Problématiques Biologiques. *Université des Sciences et Technologie de Lille*, 114.
- FRANCINI, R.B. (1989) Biologia e ecologia das borboletas Actinote (Lepidoptera, Nymphalidae, Acraeinae) na transição subtropical no sudeste do Brasil.
- FRANCINI, R.B. & PENZ, C.M. (2006) An illustrated key to male Actinote from Southeastern Brazil (Lepidoptera, Nymphalidae). *Biota Neotropica*, **6**, 0–0.
- FRANZL, S. & NAUMANN, C.M. (1985) Cuticular cavities: Storage chambers for cyanoglucoside-containing defensive secretions in larvae of a zygaenid moth. *Tissue and Cell*, **17**, 267–278.
- FREHNER, M. & CONN, E.E. (1987) The Linamarin β -Glucosidase in Costa Rican Wild Lima Beans (*Phaseolus lunatus* L.) Is Apoplasmic 1. *Plant Physiol*, **84**, 1296–1300.
- FREHNER, M., SCALET, M., & CONN, E.E. (1990) Pattern of the Cyanide-Potential in Developing Fruits: Implications for Plants Accumulating Cyanogenic Monoglucosides (*Phaseolus lunatus*) or Cyanogenic Diglucosides in Their Seeds (*Linum usitatissimum*, *Prunus amygdalus*). *Plant Physiology*, **94**, 28–34.
- FREITAS, A.V.L., TRIGO, J.R., BROWN, K.S., WITTE, L., HARTMANN, T., & BARATA, L.E.S. (1996) Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miralera cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Chemoecology*, **7**, 61–67.
- FUJIMURA, Y. & MIURA, D. (2014) MALDI Mass Spectrometry Imaging for Visualizing In Situ Metabolism of Endogenous Metabolites and Dietary Phytochemicals. *Metabolites*.
- FÜRSTENBERG-HÄGG, J., ZAGROBELNY, M., JØRGENSEN, K., VOGEL, H., MØLLER, B.L., & BAK, S. (2014) Chemical Defense Balanced by Sequestration and De Novo Biosynthesis in a Lepidopteran Specialist. *PLoS ONE*, **9**, e108745.
- GILBERT, L.E. (1971) Butterfly-Plant Coevolution: Has Passiflora adenopoda Won the Selectional Race with Heliconiine Butterflies?, **172**, 585–586.
- GILBERT, L.E. (1972) Pollen Feeding and Reproductive Biology of *Heliconius* Butterflies. *PNAS*, **69**, 1403–1407.
- GILBERT, L.E. (1975) Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. *Coevolution of Animals and Plants* (Gilbert, L.E. & Raven, P.R. eds). Austin, TX: University of Texas Press, pp. 210–240.
- GILBERT, L.E. (1980) Food web organization and the conservation of neotropical diversity. *Conservation Biology: an Evolutionary-Ecological Perspective* (Soul, M.E. & Wilcox, B.A. eds). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, pp. 11–33.
- GILBERT, L.E. (1982) The Coevolution of a Butterfly and a Vine. *Scientific American*, **247**, 110–121.

- GILBERT, L.E. (1991) Biodiversity of a central american Heliconius community: pattern, process, and problems. *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*.
- GITTLEMAN, J.L. & HARVEY, P.H. (1980) Why are distasteful prey not cryptic? *Nature*, **286**, 149–150.
- GLEADOW, R.M. & MØLLER, B.L. (2014) Cyanogenic Glycosides: Synthesis, Physiology, and Phenotypic Plasticity. *Annual Review of Plant Biology*, **65**, 155–185.
- GOLDSTEIN, W.S. & SPENCER, K.C. (1985) Inhibition of Cyanogenesis by tannins. *J Chem Ecol*, **11**, 847–858.
- GOODALE, M.A. & SNEDDON, I. (1977) The effect of distastefulness of the model on the predation of artificial batesian mimics. *Animal Behaviour*, **25**, 660–665.
- GORDON, D.G., ZELAYA, A., ARGANDA-CARRERAS, I., ARGANDA, S., & TRANIELLO, J.F.A. (2019) Division of labor and brain evolution in insect societies: Neurobiology of extreme specialization in the turtle ant *Cephalotes varians*. *PLOS ONE*, **14**, e0213618.
- GREENWOOD, J.J.D., COTTON, P.A., & WILSON, D.M. (1989) Frequency-dependent selection on aposematic prey: some experiments. *Biological Journal of the Linnean Society*, **36**, 213–226.
- GRIFFIN, C.T., DANAHER, M., ELLIOTT, C.T., GLENN KENNEDY, D., & FUREY, A. (2013) Detection of pyrrolizidine alkaloids in commercial honey using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, **136**, 1577–1583.
- GRUHNERT, C., BIEHL, B., & SELMAR, D. (1994) Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. *Planta*, **195**, 36–42.
- GUILFORD, T. (1988) The Evolution of Conspicuous Coloration. *The American Naturalist*, **131**, S7–S21.
- GUILFORD, T., NICOL, C., ROTHSCHILD, M., & MOORE, B.P. (1987) The biological roles of pyrazines: evidence for a warning odour function. *Biological Journal of the Linnean Society*, **31**, 113–128.
- HAHLBROCK, K. & CONN, E.E. (1971) Evidence for the formation of linamarin and lotaustralin in flax seedlings by the same glucosyltransferase. *Phytochemistry*, **10**, 1019–1023.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- HALPIN, C.G., SKELHORN, J., & ROWE, C. (2008) Naïve predators and selection for rare conspicuous defended prey: the initial evolution of aposematism revisited. *Animal Behaviour*, **75**, 771–781.
- HAM, A.D., IHALAINEN, E., LINDSTRÖM, L., & MAPPES, J. (2006) Does colour matter? The importance of colour in avoidance learning, memorability and generalisation. *Behav Ecol Sociobiol*, **60**, 482–491.
- HANSEN, A.K., GILBERT, L.E., SIMPSON, B.B., DOWNIE, S.R., CERVI, A.C., & JANSEN, R.K. (2006) Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. *sbol*, **31**, 138–150.
- HARMON, L.J., WEIR, J.T., BROCK, C.D., GLOR, R.E., & CHALLENGER, W. (2008) GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics*, **24**, 129–131.
- HARPEL, D., CULLEN, D.A., OTT, S.R., JIGGINS, C.D., & WALTERS, J.R. (2015) Pollen feeding proteomics: Salivary proteins of the passion flower butterfly, *Heliconius melpomene*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **63**, 7–13.
- HARTMANN, T. (1999) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, **207**, 483–495.

- HARTMANN, T. & OBER, D. (2000) Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores. *Biosynthesis, Topics in Current Chemistry* (Leeper, F. & Vederas, J. eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 207–243.
- HARTMANN, T. & OBER, D. (2008) Defense by Pyrrolizidine Alkaloids: Developed by Plants and Recruited by Insects. *Induced Plant Resistance to Herbivory* (Schaller, A. ed). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 213–231.
- HAY-ROE, M.M. & NATION, J. (2007) Spectrum of Cyanide Toxicity and Allocation in *Heliconius erato* and Passiflora Host Plants. *J Chem Ecol*, **33**, 319–329.
- HERVE, M. (2019) RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics. *R package version 0.9-72*. URL <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>.
- HILL, G.E. (1996) Redness as a measure of the production cost of ornamental coloration. *Ethology Ecology & Evolution*, **8**, 157–175.
- HINES, H.M., COUNTERMAN, B.A., PAPA, R., MOURA, P.A. de, CARDOSO, M.Z., LINARES, M., MALLET, J., REED, R.D., JIGGINS, C.D., KRONFORST, M.R., & MCMILLAN, W.O. (2011) Wing patterning gene redefines the mimetic history of *Heliconius* butterflies. *PNAS*, **108**, 19666–19671.
- HOSSAERT-MCKEY, M., BAGNERES-URBANY, A.G., BALDY, V., BANAIGS, B., BAUDINO, S., BERTRAND, C., CAISSARD, J.C., CHARPENTIER, M., CORTESERO, A.M., FERNANDEZ, C., GANEN, G., GIRON, D., GRISON, C., GROSJEAN, Y., LA BARRE, S., LEBLANC, C., LUCAS, C., NAGNAN-LE MEILLOUR, P., NAY, B., PEREZ, T., POUPON, E., REBUFFAT, S., THOMAS, O., SCHATZ, B., VIARD, F., BOURDY, G., PAYRI, C., & PETEK, S. (2012) *Ecologie chimique : le langage de la nature*. Paris: Cherche Midi.
- IHALAINEN, E., LINDSTRÖM, L., & MAPPES, J. (2007) Investigating Müllerian mimicry: predator learning and variation in prey defences. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 780–791.
- IMAI, H., SUZUKI, N., ISHIMARU, Y., SAKURAI, T., YIN, L., PAN, W., ABE, K., MISAKA, T., & HIRAI, H. (2012) Functional diversity of bitter taste receptor TAS2R16 in primates. *Biology Letters*, **8**, 652–656.
- INGALE, A.G. & HIVRALE, A.U. (2010) Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. *Afr. J. Plant Sci.*, **10**.
- JANZ, N., NYLIN, S., & WAHLBERG, N. (2006) Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. *BMC Evolutionary Biology*, **6**, 4.
- JANZEN, D.H. (1983) *Erblichia odorata* Seem. (Turneraceae) is a larval hostplant of *Eueides procula vulgiformis* (Nymphalidae: Heliconiini) in Santa Rosa National Park, Costa Rica. *J. Lepid. Soc.*, **37**, 70–77.
- JAROSZEWSKI, J., OLAFSDOTTIR, E., WELLENDORPH, P., CHRISTENSEN, J., FRANZYK, H., SOMANADHAN, B., BUDNIK, B., BOLT JØRGENSEN, L., & CLAUSEN, V. (2002) Cyanohydrin glycosides of *Passiflora*: distribution pattern, a saturated cyclopentane derivative from *P. guatemalensis*, and formation of pseudocyanogenic α -hydroxyamides as isolation artefacts. *Phytochemistry*, **59**, 501–511.
- JENSEN, N.B., ZAGROBELNY, M., HJERNØ, K., OLSEN, C.E., HOUGHTON-LARSEN, J., BORCH, J., MØLLER, B.L., & BAK, S. (2011) Convergent evolution in biosynthesis of cyanogenic defence compounds in plants and insects. *Nature Communications*, **2**, 273.
- JIGGINS, C.D. (2016) *The Ecology and Evolution of Heliconius Butterflies*. Oxford University Press.
- JIGGINS, C.D., MALLARINO, R., WILLMOTT, K.R., BERMINGHAM, E., & FUNK, D. (2006) The phylogenetic pattern of speciation and wing pattern change in neotropical ithomia butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution*, **60**, 1454–1466.

- JONES, P.L., PETSCHENKA, G., FLACHT, L., & AGRAWAL, A.A. (2019) Cardenolide Intake, Sequestration, and Excretion by the Monarch Butterfly along Gradients of Plant Toxicity and Larval Ontogeny. *J Chem Ecol*, DOI: 10.1007/s10886-019-01055-7.
- JONES, R.S., DAVIS, S.C., & SPEED, M.P. (2013) Defence Cheats Can Degrade Protection of Chemically Defended Prey. *Ethology*, **119**, 52–57.
- JOOSTEN, L., MULDER, P.P.J., VRIELING, K., VAN VEEN, J.A., & KLINKHAMER, P.G.L. (2010) The analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Jacobaea vulgaris*; a comparison of extraction and detection methods. *Phytochem. Anal.*, **21**, 197–204.
- JORON, M. (2009) Chapter 10 - Aposematic Coloration. *Encyclopedia of Insects (Second Edition)* (Resh, V.H. & Cardé, R.T. eds). San Diego: Academic Press, pp. 33–38.
- JORON, M., FREZAL, L., JONES, R., CHAMBERLAIN, N., LEE, S., HAAG, C., WHIBLEY, A., BECUWE, M., BAXTER, S., FERGUSON, L., WILKINSON, P., SALAZAR, C., DAVIDSON, C., CLARK, R., QUAIL, M., BEASLEY, H., GLITHERO, R., LLOYD, C., SIMS, S., JONES, M., ROGERS, J., JIGGINS, C., & FRENCH-CONSTANT, R. (2011) Chromosomal rearrangements maintain a polymorphic supergene controlling butterfly mimicry. *Nature*, **477**, 203–206.
- JORON, M. & IWASA, Y. (2005) The evolution of a Müllerian mimic in a spatially distributed community. *Journal of Theoretical Biology*, **237**, 87–103.
- JORON, M. & MALLET, J. (1998a) Diversity in mimicry: paradox or paradigm? *Trends in Ecology & Evolution*, **13**, 461–466.
- JORON, M. & MALLET, J.L.B. (1998b) Diversity in mimicry: paradox or paradigm? *Trends in Ecology & Evolution*, **13**, 461–466.
- JOSSE, J. & HUSSON, F. (2016) missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, **70**.
- KAHN, R.A., BAK, S., SVENDSEN, I., HALKIER, B.A., & MØLLER, B.L. (1997) Isolation and reconstitution of cytochrome P450ox and in vitro reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from sorghum. *Plant Physiol*, **115**, 1661–1670.
- KAKES, P. (1985) Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* L. leaves. *Planta*, **166**, 156–160.
- KAROWE, D.N. (1989) Differential effect of tannic acid on two tree-feeding Lepidoptera: implications for theories of plant anti-herbivore chemistry. *Oecologia*, **80**, 507–512.
- KETUDAT CAIRNS, J.R. & ESEN, A. (2010) β -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3389–3405.
- KILLIP, E.P. (1938) The American species of Passifloraceae. *The American species of Passifloraceae*.
- KNAPP, S. & MALLET, J. (1998) A New Species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Ecuador with Notes on the Natural History of Its Herbivore, *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae: *Heliconiini*). *Novon*, **8**, 162.
- KNOWLES, C.J. (1976) Microorganisms and cyanide. *Bacteriol Rev*, **40**, 652–680.
- KOZAK, K.M. (2016) Macroevolution and phylogenomics in the adaptive radiation of *Heliconiini* butterflies (Thesis).
- KOZAK, K.M., WAHLBERG, N., NEILD, A.F.E., DASMAHAPATRA, K.K., MALLET, J., & JIGGINS, C.D. (2015) Multilocus Species Trees Show the Recent Adaptive Radiation of the Mimetic *Heliconius* Butterflies. *Syst Biol*, DOI: 10.1093/sysbio/syv007.
- KRENN, H.W. & PENZ, C.M. (1998) Mouthparts of *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a search for anatomical adaptations to pollen-feeding behavior. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **27**, 301–309.
- KRISTENSEN, N.P. (1999) Handbuch der Zoologie Handbook of Zoology. *New York*, 504.

- KROSINICK, S.E., PORTER-UTLEY, K.E., MACDOUGAL, J.M., JØRGENSEN, P.M., & MCDADE, L.A. (2013) New Insights into the Evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic Relationships and Morphological Synapomorphies. *sbot*, **38**, 692–713.
- LABEYRIE, E., PASCAL, L., DELABIE, J., ORIVEL, J., DEJEAN, A., & HOSSAERT-MCKEY, M. (2001) Protection-of-*Passiflora-glandulosa*-Passifloraceae-against-herbivory-Impact-of-ants-exploiting-extrafloral-nectaries.pdf. *Sociobiology*, **38**.
- LAMAS, G. & PEREZ, E. (1981) Dananae e ithomiinae (lepidoptera, nymphalidae) atraídos por heliotropium (bora-ginaceae) en madre de dios, peru. *Revista Peruana de Entomología*, **24**, 59–62.
- LANGHAM, G.M. (2004) Specialized Avian Predators Repeatedly Attack Novel Color Morphs of *Heliconius* Butterflies. *Evolution*, **58**, 2783–2787.
- LE POUL, Y., WHIBLEY, A., CHOUTEAU, M., PRUNIER, F., LLAURENS, V., & JORON, M. (2014) Evolution of dominance mechanisms at a butterfly mimicry supergene. *Nature Communications*, **5**, 5644.
- LE, S., JOSSE, J., & HUSSON, F. (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, **25**.
- LEIMAR, O., ENQUIST, M., & SILLEN-TULLBERG, B. (1986) Evolutionary Stability of Aposematic Coloration and Prey Unprofitability: A Theoretical Analysis. *The American Naturalist*, **128**, 469–490.
- LEV-YADUN, S. (2009) Ant mimicry by *Passiflora* flowers?, **39**, 6.
- LEV-YADUN, S. (2016) *Defensive (anti-herbivory) Coloration in Land Plants*. Cham: Springer International Publishing.
- LEV-YADUN, S. (2018) Defensive (anti-herbivory) Batesian mimicry in plants. *Israel Journal of Plant Sciences*, **1**, 1–18.
- LI, D. & ZHANG, J. (2014) Diet Shapes the Evolution of the Vertebrate Bitter Taste Receptor Gene Repertoire. *Mol Biol Evol*, **31**, 303–309.
- LI, G. & ISHIKAWA, Y. (2006) Leaf Epicuticular Wax Chemicals of the Japanese Knotweed *Fallopia japonica* as Oviposition Stimulants for *Ostrinia latipennis*. *J Chem Ecol*, **32**, 595–604.
- LIEBEKE, M., STRITTMATTER, N., FEARN, S., MORGAN, A.J., KILLE, P., FUCHSER, J., WALLIS, D., PALCHYKOV, V., ROBERTSON, J., LAHIVE, E., SPURGEON, D.J., MCPHAIL, D., TAKATS, Z., & BUNDY, J.G. (2015) Unique metabolites protect earthworms against plant polyphenols. *Nature Communications*, **6**, 7869.
- LIEBEREI, R., SELMAR, D., & BIEHL, B. (1985) Metabolization of cyanogenic glucosides in *Hevea brasiliensis*. *Pl Syst Evol*, **150**, 49–63.
- LINDSTRÖM, L., ALATALO, R.V., LYTTINEN, A., & MAPPES, J. (2001) Predator experience on cryptic prey affects the survival of conspicuous aposematic prey. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **268**, 357–361.
- LINDSTROM, L., ALATALO, R.V., LYTTINEN, A., & MAPPES, J. (2001) Strong antiapostatic selection against novel rare aposematic prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 9181–9184.
- LINDSTRÖM, L., LYTTINEN, A., MAPPES, J., & OJALA, K. (2006) Relative importance of taste and visual appearance for predator education in Müllerian mimicry. *Animal Behaviour*, **72**, 323–333.
- LINDSTRÖM, L., ROWE, C., & GUILFORD, T. (2001) Pyrazine odour makes visually conspicuous prey aversive. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **268**, 159–162.

- LONDON-SHAFIR, I., SHAFIR, S., & EISIKOWITCH, D. (2003) Amygdalin in almond nectar and pollen – facts and possible roles. *Plant Systematics and Evolution*, **238**, 87–95.
- MAAN, M.E. & CUMMINGS, M.E. (2012) Poison Frog Colors Are Honest Signals of Toxicity, Particularly for Bird Predators. *The American Naturalist*, **179**, E1–E14.
- MACDOUGAL, J.M. (1994) Revision of Passiflora Subgenus Decaloba Section Pseudodysosmia (Passifloraceae). *Systematic Botany Monographs*, **41**, 1.
- MALLET, J. (2010) Shift happens! Shifting balance and the evolution of diversity in warning colour and mimicry. *Ecological Entomology*, **35**, 90–104.
- MALLET, J. & BARTON, N.H. (1989) Strong Natural Selection in a Warning-Color Hybrid Zone. *Evolution*, **43**, 421–431.
- MALLET, J. & GILBERT, L.E. (1995) Why are there so many mimicry rings? Correlations between habitat, behaviour and mimicry in Heliconius butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, **55**, 159–180.
- MALLET, J., LONGINO, J.T., MURAWSKI, D., MURAWSKI, A., & DEGAMBOA, A.S. (1987) Handling Effects in Heliconius - Where Do All the Butterflies Go. *Journal of Animal Ecology*, **56**, 377–386.
- MAPPE, J., KOKKO, H., OJALA, K., & LINDSTRÖM, L. (2014) Seasonal changes in predator community switch the direction of selection for prey defences. *Nature Communications*, **5**, 5016.
- MARIA ARENAS, L., WALTER, D., & STEVENS, M. (2015) Signal honesty and predation risk among a closely related group of aposematic species. *Scientific Reports*, **5**, 11021.
- MARPLES, N.M. & KELLY, D.J. (1999) Neophobia and Dietary Conservatism: Two Distinct Processes? *Evolutionary Ecology*, **13**, 641–653.
- MARPLES, N.M., KELLY, D.J., THOMAS, R.J., & HARRISON, R. (2005) Perspective: the evolution of warning coloration is not paradoxical. *Evolution*, **59**, 933–940.
- MARSHALL, A.G., HENDRICKSON, C.L., & JACKSON, G.S. (1998) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*, **17**, 1–35.
- MARSHALL, G.A.K. (1908) On Diaposematism, with reference to some limitations of the Müllerian Hypothesis of Mimicry. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, **56**, 93–142.
- MASSIVE (2019) *Center for Computational Mass Spectrometry*. URL <https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp>.
- MASTERS, A.R. (1990) Pyrrolizidine Alkaloids in Artificial Nectar Protect Adult Ithomiine Butterflies from a Spider Predator. *Biotropica*, **22**, 298–304.
- MCCLURE, M., CLERC, C., DESBOIS, C., MEICHANETZOGLOU, A., CAU, M., BASTIN-HELINE, L., BACIGALUPO, J., HOUSSIN, C., PINNA, C., NAY, B., LLAURENS, V., BERTHIER, S., ANDRAUD, C., GOMEZ, D., & ELIAS, M. (2019) Why has transparency evolved in aposematic butterflies? Insights from the largest radiation of aposematic butterflies, the Ithomiini. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **286**, 20182769.
- MCDONNELL, L.A. & HEEREN, R.M.A. (2007) Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **26**, 606–643.
- MCGRAW, K.J., HILL, G.E., & PARKER, R.S. (2005) The physiological costs of being colourful: nutritional control of carotenoid utilization in the American goldfinch, *Carduelis tristis*. *Animal Behaviour*, **69**, 653–660.
- MCKEY, D., CAVAGNARO, T.R., CLIFF, J., & GLEADOW, R. (2010) Chemical ecology in coupled human and natural systems: people, manioc, multitrophic interactions and global change. *Chemoecology*, **20**, 109–133.

- McSWEENEY, C.S., PALMER, B., McNEILL, D.M., & KRAUSE, D.O. (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, Tannins: Analysis and Biological Effects in Ruminant Feeds, **91**, 83–93.
- MEGA, N.O. & DE ARAUJO, A.M. (2008) Do caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae) show evidence of adaptive behaviour to avoid predation by ants? *Journal of Natural History*, **42**, 129–137.
- MERIAN, M.S. (1705) *Metamorphosis insectorum Surinamensium: in qua erucæ ac vermes Surinamenses, cum omnibus suis transformationibus, ad vivum delineantur et describuntur ...* London: Pion.
- MERILAITA, S. & TULLBERG, B.S. (2005) Constrained Camouflage Facilitates the Evolution of Conspicuous Warning Coloration. *Evolution*, **59**, 38–45.
- MERRILL, R.M., DASMAHAPATRA, K.K., DAVEY, J.W., DELL'AGLIO, D.D., HANLY, J.J., HUBER, B., JIGGINS, C.D., JORON, M., KOZAK, K.M., LLAURENS, V., MARTIN, S.H., MONTGOMERY, S.H., MORRIS, J., NADEAU, N.J., PINHARANDA, A.L., ROSSER, N., THOMPSON, M.J., VANJARI, S., WALLBANK, R.W.R., & YU, Q. (2015) The diversification of Heliconius butterflies: what have we learned in 150 years? *J. Evol. Biol.*, **28**, 1417–1438.
- MEYERS, D.M. & AHMAD, S. (1991) Link between l-3-cyanoalanine synthase activity and differential cyanide sensitivity of insects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1075**, 195–197.
- MILLAN, C., BORGES, S.S., RODRIGUES, D., & MOREIRA, G.R.P. (2013) Behavioral and life-history evidence for interspecific competition in the larvae of two heliconian butterflies. *Naturwissenschaften*, **100**, 901–911.
- MØLLER, B.L., OLSEN, C.E., & MOTAWIA, M.S. (2016) General and Stereocontrolled Approach to the Chemical Synthesis of Naturally Occurring Cyanogenic Glucosides. *J. Nat. Prod.*, **79**, 1198–1202.
- MONTGOMERY, S.H., MERRILL, R.M., & OTT, S.R. (2016) Brain composition in *Heliconius* butterflies, posteclosion growth and experience-dependent neuropil plasticity: Anatomy and plasticity of *heliconius* brains. *Journal of Comparative Neurology*, **524**, 1747–1769.
- MOORE, B.P., BROWN, W.V., & ROTHSCHILD, M. (1990) Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their hostplants and mimics. *Chemoecology*, **1**, 43–51.
- MORA, C., TITTENSOR, D.P., ADL, S., SIMPSON, A.G.B., & WORM, B. (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLOS Biology*, **9**, e1001127.
- MORANT, A.V., JØRGENSEN, K., JØRGENSEN, C., PAQUETTE, S.M., SANCHEZ-PEREZ, R., MØLLER, B.L., & BAK, S. (2008) β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, **69**, 1795–1813.
- MOWAT, D.J. & CLAWSON, S. (1996) Oviposition and hatching of the clover weevil *Sitona lepidus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae). *Grass and Forage Science*, **51**, 418–423.
- MUGRABI-OLIVEIRA, E. & MOREIRA, G.R.P. (1996a) Size of and damage on shoots of *Passiflora suberosa* (passifloraceae) influence oviposition site selection of *Heliconius erato phyllis* (fabricius) (lepidoptera, nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **13**, 939–953.
- MUGRABI-OLIVEIRA, E. & MOREIRA, G.R.P. (1996b) Conspecific mimics and low host plant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (fabricius) (lepidoptera, nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **13**, 929–937.
- MÜLLER, E. & NAHRSTEDT, A. (1990) Purification and Characterization of an α -Hydroxynitrile Lyase from the Haemolymph of the Larvae of *Zygaena trifolii*. *Planta Medica*, **56**, 611–611.

- MÜLLER, F. (1879a) Ituna and Thyridia; a remarkable case of Mimicry in Butterflies. *Kosmos*, **100**.
- MÜLLER, F. (1879b) Ituna and Thyridia; a remarkable case of mimicry in butterflies (transl. by Ralph Meldola from the original German article in *Kosmos*, May 1879, 100). *Transactions of the Entomological Society of London*.
- NAHRSTEDT, A. (1979) Cyanogenesis in the Zygaenidae (Lepidoptera): a review of the state of the art, **13**.
- NAHRSTEDT, A. (1989) The Significance of Secondary Metabolites for Interactions between Plants and Insects. *Planta Med*, **55**, 333–338.
- NAHRSTEDT, A. & DAVIS, R.H. (1981) The occurrence of the cyanoglucosides, linamarin and lotaustralin, in *Acraea* and *Heliconius* butterflies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **68**, 575–577.
- NAHRSTEDT, A. & DAVIS, R.H. (1983) Occurrence, variation and biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in species of the Heliconiini (Insecta: Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **75**, 65–73.
- NAHRSTEDT, A. & DAVIS, R.H. (1985) Biosynthesis and quantitative relationships of the cyanogenic glucosides, linamarin and lotaustralin, in genera of the Heliconiini (Insecta: Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **82**, 745–749.
- NAHRSTEDT, A., SATTAR, E.A., & M.H. EL-ZALABANI, S. (1990) Amygdalin acyl derivatives, cyanogenic glycosides from the seeds of *Merremia dissecta*. *Phytochemistry*, **29**, 1179–1181.
- NAKAMURA, S., LI, X., MATSUDA, H., NINOMIYA, K., MORIKAWA, T., YAMAGUTI, K., & YOSHIKAWA, M. (2007) Bioactive Constituents from Chinese Natural Medicines. XXVI. Chemical Structures and Hepatoprotective Effects of Constituents from Roots of *Rhodiola sachalinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **55**, 1505–1511.
- NEILSON, E.H., GOODGER, J.Q.D., WOODROW, I.E., & MØLLER, B.L. (2013) Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science*, **18**, 250–258.
- NELSON, L. (2006) Acute Cyanide Toxicity: Mechanisms and Manifestations. *Journal of Emergency Nursing*, **32**, S8–S11.
- NEWTON, G.W., SCHMIDT, E.S., LEWIS, J.P., LAWRENCE, R., & CONN, E. (1981) Amygdalin Toxicity Studies in Rats Predict Chronic Cyanide Poisoning in Humans. *West J Med*, **134**, 97–103.
- NISHIDA, R. (2002) Sequestration of Defensive Substances from Plants by Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, **47**, 57–92.
- NISHIDA, R. & FUKAMI, H. (1990) Sequestration of distasteful compounds by some pharmacophagous insects. *J Chem Ecol*, **16**, 151–164.
- NISIUS, A. (1988) The stromacentre in *Avena* plastids: an aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta*, **173**, 474–481.
- NOTHIAS-SCAGLIA, L.-F., ESPOSITO, M., COSTA, J., PAOLINI, J., TOUBOUL, D., & LITAUDON, M. (2015) Molecular networks, a bioinformatic tool for tandem mass spectrometry data interpretation. *Spectra Analyse*, **307**, 73–78.
- OBA, K., CONN, E.E., CANUT, H., & BOUDET, A.M. (1981) Subcellular Localization of 2-(β -d-Glucosyloxy)-Cinnamic Acids and the Related β -glucosidase in Leaves of *Melilotus alba* Desr. *Plant Physiology*, **68**, 1359–1363.

- O'BRIEN, D.M., BOGGS, C.L., & FOGEL, M.L. (2003) Pollen feeding in the butterfly *Heliconius charitonia*: isotopic evidence for essential amino acid transfer from pollen to eggs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**, 2631–2636.
- OLAFSDOTTIR, E.S., ANDERSEN, J.V., & JAROSZEWSKI, J.W. (1989) Cyanohydrin glycosides of passifloraceae. *Phytochemistry*, **28**, 127–132.
- OLAFSDOTTIR, E.S., CORNETT, C., JAROSZEWSKI, J.W., SONGSTAD, J., LÖNNBERG, H., COLACIO, E., MULICHAK, A.M., ALMINGER, T., ERICKSON, M., GRUNDEVIK, I., HAGIN, I., HOFFMAN, K.-J., JOHANSSON, S., LARSSON, S., LÖFBERG, I., OHLSON, K., PERSSON, B., SKÅNBERG, I., & TEKENBERGS-HJELTE, L. (1989) Cyclopentenoid Cyanohydrin Glycosides with Unusual Sugar Residues. *Acta Chemica Scandinavica*, **43**, 51–55.
- OTT, S.R. (2008) Confocal microscopy in large insect brains: Zinc–formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *Journal of Neuroscience Methods*, **172**, 220–230.
- PARADIS, E. (2011) *Analysis of Phylogenetics and Evolution with R*. Springer Science & Business Media.
- PARSONS, M. (1999) Review of The Butterflies of Papua New Guinea: Their Systematics and Biology. *Journal of the New York Entomological Society*, **107**, 409–413.
- PAYNE, W.W. (1978) A glossary of plant hair terminology. *Brittonia*, **30**, 239–255.
- PENTZOLD, S., KRYGER, J.M., MATTHES, A., OLSEN, C.E., PETERSEN, B.L., CLAUSEN, H., MØLLER, B.L., BAK, S., & ZAGROBELNY, M. (2017) Spatial separation of the cyanogenic β -glucosidase ZfBGD2 and cyanogenic glucosides in the haemolymph of *Zygaena* larvae facilitates cyanide release. *Royal Society Open Science*, **4**, 170262.
- PENTZOLD, S., ZAGROBELNY, M., BJARNHOLT, N., KROYMANN, J., VOGEL, H., OLSEN, C.E., MØLLER, B.L., & BAK, S. (2015) Metabolism, excretion and avoidance of cyanogenic glucosides in insects with different feeding specialisations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **66**, 119–128.
- PENTZOLD, S., ZAGROBELNY, M., KHAKIMOV, B., ENGELSEN, S.B., CLAUSEN, H., PETERSEN, B.L., BORCH, J., MØLLER, B.L., & BAK, S. (2016) Lepidopteran defence droplets - a composite physical and chemical weapon against potential predators. *Scientific Reports*, **6**.
- PENTZOLD, S., ZAGROBELNY, M., ROOK, F., & BAK, S. (2014) How insects overcome two-component plant chemical defence: plant β -glucosidases as the main target for herbivore adaptation: Insect adaptations to plant chemical defence. *Biological Reviews*, **89**, 531–551.
- PENZ, C.M. & PEGGIE, D. (2003) Phylogenetic relationships among Heliconiinae genera based on morphology (Lepidoptera: Nymphalidae). *Systematic Entomology*, **28**, 451–479.
- PETIVER, J. (1705) *Gazophylacium naturae et artis*.
- PINHEIRO, C. (2003) Does müllerian mimicry work in nature? Experiments with butterflies and birds (tyrannidae)1. *Biotropica*, **35**, 356–364.
- PINHEIRO, C.E.G. & CAMPOS, V.C. (2019) The responses of wild jacamars (*Galbula ruficauda*, Galbulidae) to aposematic, aposematic and cryptic, and cryptic butterflies in central Brazil. *Ecological Entomology*, **0**.
- PINHEIRO, C.E.G. & CINTRA, R. (2017) Butterfly Predators in the Neotropics: Which Birds are Involved? *Journal of the Lepidopterists' Society*, **71**, 109–114.
- PLISKE, T.E. (1975) Attraction of Lepidoptera to Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids. *Environ Entomol*, **4**, 455–473.

- PLISKE, T.E., EDGAR, J.A., & CULVENOR, C.C.J. (1976) The chemical basis of attraction of ithomiine butterflies to plants containing pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chemical Ecology*, **2**, 255–262.
- POULTON, E.B. (1890) The colours of animals: their meaning and use especially considered in the case of insects. *London: Kegan Paul, Trench, Trubner and Co. Ltd.*
- POULTON, J.E. (1990) Cyanogenesis in Plants. *Plant Physiology*, **94**, 401–405.
- POULTON, J.E. & LI, C.P. (1994) Tissue Level Compartmentation of (R)-Amygdalin and Amygdalin Hydrolase Prevents Large-Scale Cyanogenesis in Undamaged Prunus Seeds. *Plant Physiology*, **104**, 29–35.
- ProteoWizard (2019) . URL <http://proteowizard.sourceforge.net/>.
- PRUDIC, K.L., KHERA, S., SOLYOM, A., & TIMMERMANN, B.N. (2007) Isolation, Identification, and Quantification of Potential Defensive Compounds in the Viceroy Butterfly and its Larval Host-Plant, Carolina Willow. *J Chem Ecol*, **33**, 1149–1159.
- PRUDIC, K.L., TIMMERMANN, B.N., PAPAJ, D.R., RITLAND, D.B., & OLIVER, J.C. (2019) Mimicry in viceroy butterflies is dependent on abundance of the model queen butterfly. *Communications Biology*, **2**, 68.
- PUURTINEN, M. & KAITALA, V. (2006) Conditions for the spread of conspicuous warning signals: a numerical model with novel insights. *Evolution*, **60**, 2246–2256.
- Python Release Python 3.6.5 (2018) *Python.org*. URL <https://www.python.org/downloads/release/python-365/>.
- R CORE TEAM (2017) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. URL <https://www.R-project.org/>.
- R: The R Project for Statistical Computing (2019) . URL <https://www.r-project.org/>.
- RADHAMANI, T.R., SUDARSHANA, L., & KRISHNAN, R. (1995) Defense and carnivory: Dual role of bracts in *Passiflora foetida*. *J. Biosci.*, **20**, 657–664.
- REEVES, J.L. (2011) Vision Should not be Overlooked as an Important Sensory Modality for Finding Host Plants. *enve*, **40**, 855–863.
- REGINATTO, F.H., GOSMANN, G., SCHRIPEMA, J., & SCHENKEL, E.P. (2004) Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. *Phytochemical Analysis*, **15**, 195–197.
- REGINATTO, F.H., KAUFFMANN, C., SCHRIPEMA, J., GUILLAUME, D., GOSMANN, G., & SCHENKEL, E.P. (2001) Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **12**, 32–36.
- REVELL, L.J. (2012) phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 217–223.
- RIMAL, S. & LEE, Y. (2018) The multidimensional ionotropic receptors of *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, **27**, 1–7.
- RITLAND, D.B. (1991) Palatability of aposematic queen butterflies (*Danaus gilippus*) feeding on *Sarcostemma clausum* (Asclepiadaceae) in Florida. *J Chem Ecol*, **17**, 1593–1610.
- RITLAND, D.B. (1994) Variation in Palatability of Queen Butterflies (*Danaus Gilippus*) and Implications Regarding Mimicry. *Ecology*, **75**, 732–746.
- RIZWAN-UL-HAQ, M., HU, Q.B., HU, M.Y., LIN, Q.S., & ZHANG, W.L. (2009) Biological impact of harmaline, ricinine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, **82**, 327–334.
- ROBINSON, G.S., ACKERY, P.R., KITCHING, I.J., BECCALONI, G., & HERNANDEZ, L.M. (2010) HOSTS - A Database of the World's Lepidopteran Hostplants. *Natural History Museum, London*. URL <http://www.nhm.ac.uk/hosts>.

- ROBINSON, M.E. (1930) Cyanogenesis in Plants. *Biological Reviews*, **5**, 126–141.
- ROEDER, E. (1990) Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, **29**, 11–29.
- ROJAS, B., MAPPES, J., & BURDFIELD-STEEL, E. (2019) Multiple modalities in insect warning displays have additive effects against wild avian predators. *Behav Ecol Sociobiol*, **73**, 37.
- ROPER, T.J. & REDSTON, S. (1987) Conspicuousness of distasteful prey affects the strength and durability of one-trial avoidance learning. *Animal Behaviour*, **35**, 739–747.
- ROSA, Y.B.C.J. & DORNELAS, M.C. (2012) In vitro plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **108**, 91–99.
- ROSSER, N., PHILLIMORE, A.B., HUERTAS, B., WILLMOTT, K.R., & MALLET, J. (2012) Testing historical explanations for gradients in species richness in heliconiine butterflies of tropical America: Diversification of Butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, **105**, 479–497.
- ROWE, C. & GUILFORD, T. (1996) Hidden colour aversions in domestic chicks triggered by pyrazine odours of insect warning displays. *Nature*, **383**, 520–522.
- ROWLAND, H., IHALAINEN, E., LINDSTRÖM, L., MAPPES, J., & SPEED, M. (2007) Co-mimics have a mutualistic relationship despite unequal defences. *Nature*, **448**, 64–67.
- ROWLAND, H., MAPPES, J., RUXTON, G.D., & SPEED, M.P. (2010) Mimicry between unequally defended prey can be parasitic: evidence for quasi-Batesian mimicry. *Ecology Letters*, **13**, 1494–1502.
- RStudio (2019) *RStudio*. URL <https://www.rstudio.com/products/rstudio/>.
- RUAN, J., LI, N., XIA, Q., FU, P., PENG, S., YE, Y., & LIN, G. (2012) Characteristic ion clusters as determinants for the identification of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in pyrrolizidine alkaloid-containing natural products using HPLC–MS analysis. *J. Mass. Spectrom.*, **47**, 331–337.
- RUXTON, G.D. (2019) Defensive Coloration. *Encyclopedia of Animal Behavior (Second Edition)* (Choe, J.C. ed). Oxford: Academic Press, pp. 298–303.
- SADER, M.A., AMORIM, B.S., COSTA, L., SOUZA, G., & PEDROSA-HARAND, A. (2019) The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Systematics and Biodiversity*, **17**, 7–21.
- SANCHEZ-PEREZ, R., JØRGENSEN, K., OLSEN, C.E., DICENTA, F., & MØLLER, B.L. (2008) Bitterness in Almonds. *Plant Physiology*, **146**, 1040–1052.
- SANTOS, J.C. & CANNATELLA, D.C. (2011) Phenotypic integration emerges from aposematism and scale in poison frogs. *PNAS*, **108**, 6175–6180.
- SARAVANAN, S., ARUNACHALAM, K., & PARIMELAZHAGAN, T. (2014) Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. *Industrial Crops and Products*, **54**, 272–280.
- SAUNDERS, J.A., CONN, E.E., LIN, C.H., & STOCKING, C.R. (1977) Subcellular Localization of the Cyanogenic Glucoside of Sorghum by Autoradiography 1. *Plant Physiol*, **59**, 647–652.
- SCHMELLER, T., EL-SHAZLY, A., & WINK, M. (1997) Allelochemical Activities of Pyrrolizidine Alkaloids: Interactions with Neuroreceptors and Acetylcholine Related Enzymes. *J Chem Ecol*, **23**, 399–416.
- SCHULZ, S. (1992) Absolute Configuration and Synthesis of 2-Hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-3-methyl- γ -butyrolactone, a Presumed Pheromone of Ithomiine Butterflies. *Liebigs Annalen der Chemie*, **1992**, 829–834.

- SCHULZ, S. (1998) Insect-Plant Interactions – Metabolism of Plant Compounds to Pheromones and Allomones by Lepidoptera and Leaf Beetles. *European Journal of Organic Chemistry*, **1998**, 13–20.
- SCHULZ, S., BECCALONI, G., BROWN JR., K.S., BOPPRE, M., FREITAS, A.V.L., OCKENFELS, P., & TRIGO, J.R. (2004) Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**, 699–713.
- SCHULZ, S., ESTRADA, C., YILDIZHAN, S., BOPPRE, M., & GILBERT, L.E. (2008) An Antiaphrodisiac in *Heliconius melpomene* Butterflies. *J Chem Ecol*, **34**, 82–93.
- SCHULZ, S., FRANCKE, W., EDGAR, J., & SCHNEIDER, D. (1987) Volatile compounds from androconial organs of danaine and ithomiine butterflies. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **43**, 99–104.
- SCHULZ, S. & HÖTLING, S. (2015) The use of the lactone motif in chemical communication. *Natural Product Reports*, **32**, 1042–1066.
- SCHWARZ, B., WRAY, V., & PROKSCH, P. (1996) A cyanogenic glycoside from *Canthium schimperianum*. *Phytochemistry*, **42**, 633–636.
- SCIGELOVA, M., HORNSHAW, M., GIANNAKOPOULOS, A., & MAKAROV, A. (2011) Fourier Transform Mass Spectrometry. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, **19**.
- SEIGLER, D.S., SPENCER, K.C., STATLER, W.S., CONN, E.E., & DUNN, J.E. (1982) Tetraphyllin B and epitetraphyllin B sulphates: Novel cyanogenic glucosides from *Passiflora caerulea* and *P. alata-caerulea*. *Phytochemistry*, **21**, 2277–2285.
- SELMAR, D., LIEBEREI, R., & BIEHL, B. (1988) Mobilization and Utilization of Cyanogenic Glycosides: The Linustatin Pathway. *Plant Physiology*, **86**, 711–716.
- SHEAR, W.A. (2015) The chemical defenses of millipedes (diplopoda): Biochemistry, physiology and ecology. *Biochemical Systematics and Ecology*, **61**, 78–117.
- SHERRATT, T.N. (2002) The coevolution of warning signals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **269**, 741–746.
- SHERRATT, T.N. (2008) The evolution of Müllerian mimicry. *Naturwissenschaften*, **95**, 681.
- SIDDALL, E.C. & MARPLES, N.M. (2008) Better to be bimodal: the interaction of color and odor on learning and memory. *Behav Ecol*, **19**, 425–432.
- SIDDALL, E.C. & MARPLES, N.M. (2011) The effect of pyrazine odor on avoidance learning and memory in wild robins *Erithacus rubecula*. *Curr Zool*, **57**, 208–214.
- SIDLAUSKAS, B. (2008) Continuous and Arrested Morphological Diversification in Sister Clades of Characiform Fishes: A Phylomorphospace Approach. *Evolution*, **62**, 3135–3156.
- SILLEN-TULLBERG, B. (1985) Higher survival of an aposematic than of a cryptic form of a distasteful bug. *Oecologia*, **67**, 411–415.
- SILVA, D.S., BARP, E.A., KUCHARSKI, L.C.R., & MOREIRA, G.R.P. (2018) Sensing the Plant Surface Prior to Feeding and Oviposition: Differences in External Ultrastructure and Function Among Tarsi of *Heliconius erato*. *Neotrop Entomol*, **47**, 85–95.
- SILVA-BRANDÃO, K.L., WAHLBERG, N., FRANCINI, R.B., AZEREDO-ESPIN, A.M.L., BROWN, K.S., PALUCH, M., LEES, D.C., & FREITAS, A.V.L. (2008) Phylogenetic relationships of butterflies of the tribe Acraeini (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) and the evolution of host plant use. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**, 515–531.
- SKELHORN, J. & ROWE, C. (2005) Tasting the difference: do multiple defence chemicals interact in Mullerian mimicry? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 339–345.

- SKELHORN, J. & ROWE, C. (2006) Prey palatability influences predator learning and memory. *Animal Behaviour*, **71**, 1111–1118.
- SLIFER, E.H. (1970) The Structure of Arthropod Chemoreceptors. *Annual Review of Entomology*, **15**, 121–142.
- SMILEY, J. (1978) Plant Chemistry and the Evolution of Host Specificity: New Evidence from *Heliconius* and *Passiflora*. *Science*, **201**, 745–747.
- SMILEY, J. (1986) Ant Constancy at *Passiflora* Extrafloral Nectaries: Effects on Caterpillar Survival. *Ecology*, **67**, 516–521.
- SMILEY, J.T. (1982) The herbivores of *Passiflora*: comparison of monophyletic and polyphyletic feeding guilds. *Proceedings of the 5th International Symposium on Insect-Plant Relationships*.
- SMILEY, J.T. (1985) *Heliconius* Caterpillar Mortality during Establishment on Plants With and Without Attending Ants. *Ecology*, **66**, 845–849.
- SMILEY, J.T. & WISDOM, C.S. (1985) Determinants of growth rate on chemically heterogeneous host plants by specialist insects. *Biochemical Systematics and Ecology*, **13**, 305–312.
- SOLTAU, U., DÖTTERL, S., & LIEDE-SCHUMANN, S. (2009) Leaf variegation in *Caladium steudneriifolium* (Araceae): a case of mimicry? *Evol Ecol*, **23**, 503–512.
- SPEED, M.P. (1993) Muellierian mimicry and the psychology of predation. *Animal Behaviour*, **45**, 571–580.
- SPEED, M.P., ALDERSON, A.N., HARDMAN, C., & RUXTON, G.D. (2000) Testing Müllerian mimicry: an experiment with wild birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **267**, 725–731.
- SPEED, M.P., BROCKHURST, M.A., & RUXTON, G.D. (2010) The Dual Benefits of Aposematism: Predator Avoidance and Enhanced Resource Collection. *Evolution*, **64**, 1622–1633.
- SPEED, M.P. & RUXTON, G.D. (2005a) Warning Displays in Spiny Animals: One (more) Evolutionary Route to Aposematism. *Evolution*, **59**, 2499–2508.
- SPEED, M.P. & RUXTON, G.D. (2005b) Aposematism: what should our starting point be? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 431–438.
- SPEED, M.P. & RUXTON, G.D. (2007) How bright and how nasty: explaining diversity in warning signal strength. *Evolution*, **61**, 623–635.
- SPEED, M.P., RUXTON, G.D., BLOUNT, J.D., & STEPHENS, P.A. (2010) Diversification of honest signals in a predator–prey system. *Ecology Letters*, **13**, 744–753.
- SPEED, M.P., RUXTON, G.D., MAPPES, J., & SHERRATT, T.N. (2012) Why are defensive toxins so variable? An evolutionary perspective. *Biological Reviews*, **87**, 874–884.
- SPENCER, K.C. (1988) Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora* - *Heliconius* interaction. *Chemical Mediation of Coevolution* (Spencer, K.C. ed). San Diego: Academic Press, pp. 167–240.
- SPENCER, K.C. & SEIGLER, D.S. (1987) Passisuberosin and epipassisuberosin: Two cyclopentenoid cyanogenic glycosides from *Passiflora suberosa*. *Phytochemistry*, **26**, 1665–1667.
- SPENCER, K.C., SEIGLER, D.S., & DOMINGO, J.L. (1983) Tetraphyllins A and B, deidaclin and epitetraphyllin B from *Tetraphyllina tetrandra* (Passifloraceae). *Phytochemistry*, **22**, 1815–1816.
- SPENCER, K.C., SEIGLER, D.S., & NAHRSTEDT, A. (1986) Linamarin, lotaustralin, linustatin and neolinustatin from *Passiflora* species. *Phytochemistry*, **25**, 645–647.
- STAMM, P., MANN, F., MCCLURE, M., ELIAS, M., & SCHULZ, S. (2019) Chemistry of the Androconial Secretion of the Ithomiine Butterfly *Oleria onega*. *J Chem Ecol*, DOI: 10.1007/s10886-019-01100-5.

- STENOIEN, C.M., MEYER, R.A., NAIL, K.R., ZALUCKI, M.P., & OBERHAUSER, K.S. (2019) Does chemistry make a difference? Milkweed butterfly sequestered cardenolides as a defense against parasitoid wasps. *Arthropod-Plant Interactions*, 1–18.
- SUMMERS, K. & CLOUGH, M.E. (2001) The evolution of coloration and toxicity in the poison frog family (Dendrobatidae). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6227–6232.
- SWAIN, E., LI, C.P., & POULTON, J.E. (1992) Tissue and Subcellular Localization of Enzymes Catabolizing (R)-Amygdalin in Mature *Prunus serotina* Seeds 1. *Plant Physiol*, **100**, 291–300.
- THAYER, S.S. & CONN, E.E. (1981) Subcellular Localization of Dhurrin β -Glucosidase and Hydroxynitrile Lyase in the Mesophyll Cells of Sorghum Leaf Blades 1. *Plant Physiol*, **67**, 617–622.
- THE HELICONIUS GENOME CONSORTIUM, DASMAHAPATRA, K.K., WALTERS, J.R., BRISCOE, A.D., DAVEY, J.W., WHIBLEY, A., NADEAU, N.J., ZIMIN, A.V., HUGHES, D.S.T., FERGUSON, L.C., MARTIN, S.H., SALAZAR, C., LEWIS, J.J., ADLER, S., AHN, S.-J., BAKER, D.A., BAXTER, S.W., CHAMBERLAIN, N.L., CHAUHAN, R., COUNTERMAN, B.A., DALMAY, T., GILBERT, L.E., GORDON, K., HECKEL, D.G., HINES, H.M., HOFF, K.J., HOLLAND, P.W.H., JACQUIN-JOLY, E., JIGGINS, F.M., JONES, R.T., KAPAN, D.D., KERSEY, P., LAMAS, G., LAWSON, D., MAPLESON, D., MAROJA, L.S., MARTIN, A., MOXON, S., PALMER, W.J., PAPA, R., PAPANICOLAOU, A., PAUCHET, Y., RAY, D.A., ROSSER, N., SALZBERG, S.L., SUPPLE, M.A., SURRIDGE, A., TENGER-TROLANDER, A., VOGEL, H., WILKINSON, P.A., WILSON, D., YORKE, J.A., YUAN, F., BALMUTH, A.L., ELAND, C., GHARBI, K., THOMSON, M., GIBBS, R.A., HAN, Y., JAYASEELAN, J.C., KOVAR, C., MATHEW, T., MUZNY, D.M., ONGERI, F., PU, L.-L., QU, J., THORNTON, R.L., WORLEY, K.C., WU, Y.-Q., LINARES, M., BLAXTER, M.L., FFRENCH-CONSTANT, R.H., JORON, M., KRONFORST, M.R., MULLEN, S.P., REED, R.D., SCHERER, S.E., RICHARDS, S., MALLET, J., OWEN McMILLAN, W., & JIGGINS, C.D. (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*, **487**, 94–98.
- THORSØE, K.S., BAK, S., OLSEN, C.E., IMBERTY, A., BRETON, C., & MØLLER, B.L. (2005) Determination of Catalytic Key Amino Acids and UDP Sugar Donor Specificity of the Cyanohydrin Glycosyltransferase UGT85B1 from *Sorghum bicolor*. Molecular Modeling Substantiated by Site-Specific Mutagenesis and Biochemical Analyses. *Plant Physiol*, **139**, 664–673.
- THURMAN, T.J., BRODIE, E., EVANS, E., & McMILLAN, W.O. (2018) Facultative pupal mating in *Heliconius erato*: Implications for mate choice, female preference, and speciation. *Ecology and Evolution*, **8**, 1882–1889.
- TISSIER, A. (2012) Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? *The Plant Journal*, **70**, 51–68.
- TOBER, I. & CONN, E.E. (1985) Cyclopentenylglycine, a precursor of deidaclin in *Turnera ulmifolia*. *Phytochemistry*, **24**, 1215–1218.
- TRIGO, J.R. (2010) Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochem Rev*, **10**, 83–98.
- TRIGO, J.R., BARATA, L.E.S., & BROWN, K.S. (1994) Stereochemical inversion of pyrrolizidine alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae): specificity and evolutionary significance. *Journal of chemical ecology*, **20**, 2883–2899.
- TRIGO, J.R. & BROWN, K.S. (1990) Variation of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae: A comparative study between species feeding on Apocynaceae and Solanaceae. *Chemoecology*, **1**, 22–29.

- TRIGO, J.R., BROWN, K.S., HENRIQUES, S.A., & BARATA, L.E.S. (1996) Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in ithomiinae butterflies. *Biochemical Systematics and Ecology*, **24**, 181–188.
- TRIGO, J.R., BROWN, K.S., WITTE, L., HARTMANN, T., ERNST, L., & BARATA, L.E.S. (1996) Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 99–123.
- TULLBERG, B.S., MERILAITA, S., & WIKLUND, C. (2005) Aposematism and crypsis combined as a result of distance dependence: functional versatility of the colour pattern in the swallowtail butterfly larva. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 1315–1321.
- TURNER, J.R.G. (1967) Some early works on heliconiine butterflies and their biology (Lepidoptera, Nymphalidae). *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, **46**, 255–266.
- TURNER, J.R.G. (1981) Adaptation and Evolution in *Heliconius*: A Defense of NeoDarwinism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **12**, 99–121.
- TURNER, J.R.G. (1984) Mimicry: the palatability spectrum and its consequences. *The Biology of Butterflies, Symposia of the Royal Entomological Society of London* (Vane-Wright, R.I. & Ackery, P.R. eds). London: Academic Press, pp. 141–161.
- VAN DE SCHANS, M.G.M., BLOKLAND, M.H., ZOONTJES, P.W., MULDER, P.P.J., & NIELEN, M.W.F. (2017) Multiple heart-cutting two dimensional liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chromatography A*, **1503**, 38–48.
- VAN VALEN, L. (1973) A new evolutionary law. *Evol Theory*, **1**, 1–30.
- VANE-WRIGHT, R.I. & JONG, R. de (2003) *The butterflies of Sulawesi: annotated checklist for a critical island fauna.*, Zoologische Verhandelingen. Leiden: Nationaal Natuurhistorisch Museum.
- VASCONCELLOS-NETO, J. & LEWINSOHN, T.M. (1984) Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a neotropical orb-weaving spider. *Ecological Entomology*, **9**, 337–344.
- VERDAN, M.H. & STEFANELLO, M.É.A. (2012) Secondary Metabolites and Biological Properties of Gesneriaceae Species. *Chemistry & Biodiversity*, **9**, 2701–2731.
- VIDAL-CORDERO, J.M., MORENO-RUEDA, G., LOPEZ-ORTA, A., MARFIL-DAZA, C., ROS-SANTAELLA, J.L., & ORTIZ-SANCHEZ, F.J. (2012) Brighter-colored paper wasps (*Polistes dominula*) have larger poison glands. *Frontiers in Zoology*, **9**, 20.
- WAAGE, J.K., SMILEY, J.T., & GILBERT, L.E. (1981) The *Passiflora* problem in Hawaii; prospects and problems of controlling the forest weed *P. Mollissima* [Passifloraceae] with heliconiine butterflies. *Entomophaga*, **26**, 275–284.
- WALLACE, A.R. (1867) Mimicry and other protective resemblances among animals. *Westminster and Foreign Quarterly Review*, **32**, 1–43.
- WANG, I.J. (2011) Inversely Related Aposematic Traits: Reduced Conspicuousness Evolves with Increased Toxicity in a Polymorphic Poison-Dart Frog. *Evolution*, **65**, 1637–1649.
- WANG, K. & ZHAO, H. (2015) Birds Generally Carry a Small Repertoire of Bitter Taste Receptor Genes. *Genome Biol Evol*, **7**, 2705–2715.
- WANG, M., CARVER, J.J., PHELAN, V.V., SANCHEZ, L.M., GARG, N., PENG, Y., NGUYEN, D.D., WATROUS, J., KAPONO, C.A., LUZZATTO-KNAAN, T., PORTO, C., BOUSLIMANI, A., MELNIK, A.V., MEEHAN, M.J., LIU, W.-T., CRÜSEMANN, M., BOUDREAU, P.D., ESQUENAZI, E., SANDOVAL-CALDERON, M.,

- KERSTEN, R.D., PACE, L.A., QUINN, R.A., DUNCAN, K.R., HSU, C.-C., FLOROS, D.J., GAVILAN, R.G., KLEIGREWE, K., NORTHEN, T., DUTTON, R.J., PARROT, D., CARLSON, E.E., AIGLE, B., MICHELSEN, C.F., JELSBAK, L., SOHLENKAMP, C., PEVZNER, P., EDLUND, A., MCLEAN, J., PIEL, J., MURPHY, B.T., GERWICK, L., LIAW, C.-C., YANG, Y.-L., HUMPF, H.-U., MAANSSON, M., KEYZERS, R.A., SIMS, A.C., JOHNSON, A.R., SIDEBOTTOM, A.M., SEDIO, B.E., KLITGAARD, A., LARSON, C.B., BOYA P, C.A., TORRES-MENDOZA, D., GONZALEZ, D.J., SILVA, D.B., MARQUES, L.M., DEMARQUE, D.P., POCIUTE, E., O'NEILL, E.C., BRIAND, E., HELFRICH, E.J.N., GRANATOSKY, E.A., GLUKHOV, E., RYFFEL, F., HOUSON, H., MOHIMANI, H., KHARBUSH, J.J., ZENG, Y., VORHOLT, J.A., KURITA, K.L., CHARUSANTI, P., MCPHAIL, K.L., NIELSEN, K.F., VUONG, L., ELFEKI, M., TRAXLER, M.F., ENGENE, N., KOYAMA, N., VINING, O.B., BARIC, R., SILVA, R.R., MASCUCH, S.J., TOMASI, S., JENKINS, S., MACHERLA, V., HOFFMAN, T., AGARWAL, V., WILLIAMS, P.G., DAI, J., NEUPANE, R., GURR, J., RODRIGUEZ, A.M.C., LAMSA, A., ZHANG, C., DORRESTEIN, K., DUGGAN, B.M., ALMALITI, J., ALLARD, P.-M., PHAPALE, P., NOTHIAS, L.-F., ALEXANDROV, T., LITAUDON, M., WOLFENDER, J.-L., KYLE, J.E., METZ, T.O., PERVEA, T., NGUYEN, D.-T., VANLEER, D., SHINN, P., JADHAV, A., MÜLLER, R., WATERS, K.M., SHI, W., LIU, X., ZHANG, L., KNIGHT, R., JENSEN, P.R., PALSSON, B.Ø., POGLIANO, K., LININGTON, R.G., GUTIERREZ, M., LOPES, N.P., GERWICK, W.H., MOORE, B.S., DORRESTEIN, P.C., & BANDEIRA, N. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, **34**, 828–837.
- WICKHAM, H., CHANG, W., HENRY, L., PEDERSEN, T.L., TAKAHASHI, K., WILKE, C., WOO, K., YUTANI, H., & RSTUDIO (2019) *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics*.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1958) The Distribution of Esterase in the Nervous System and other Tissues of the Insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Cell Science*, **s3-99**, 441–450.
- WILLIAMS, K.S. & GILBERT, L.E. (1981) Insects as Selective Agents on Plant Vegetative Morphology: Egg Mimicry Reduces Egg Laying by Butterflies. *Science*, **212**, 467–469.
- WILLMOTT, K. & FREITAS, A. (2006) Higher-level phylogeny of the Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae): classification, patterns of larval hostplant colonization and diversification. *Cladistics*, **22**, 297–368.
- WILLMOTT, K.R. & MALLET, J. (2004) Correlations between adult mimicry and larval host plants in ithomiine butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **271**, S266–S269.
- WILLMOTT, K.R., ROBINSON WILLMOTT, J.C., ELIAS, M., & JIGGINS, C.D. (2017) Maintaining mimicry diversity: optimal warning colour patterns differ among microhabitats in Amazonian clearwing butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **284**, 20170744.
- WINK, M., SCHMELLER, T., & LATZ-BRÜNING, B. (1998) Modes of Action of Allelochemical Alkaloids: Interaction with Neuroreceptors, DNA, and Other Molecular Targets. *J Chem Ecol*, **24**, 1881–1937.
- WINTERS, A.E., WILSON, N.G., BERG, C.P. van den, HOW, M.J., ENDLER, J.A., MARSHALL, N.J., WHITE, A.M., GARSON, M.J., & CHENEY, K.L. (2018) Toxicity and taste: unequal chemical defences in a mimicry ring. *Proc. R. Soc. B*, **285**, 20180457.
- WITTHOHN, K. & NAUMANN, C.M. (1987a) Cyanogenesis—a general phenomenon in the lepidoptera? *J Chem Ecol*, **13**, 1789–1809.
- WITTHOHN, K. & NAUMANN, C.M. (1987b) Active Cyanogenesis — in Zygaenids and Other Lepidoptera. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **42**, 1319–1322.

- WOSCH, L., IMIG, D.C., CERVI, A.C., MOURA, B.B., BUDEL, J.M., & DE MORAES SANTOS, C.A. (2015) Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **25**, 328–343.
- WRAY, V., DAVIS, R.H., & NAHRSTEDT, A. (1983) Biosynthesis of Cyanogenic Glycosides in Butterflies and Moths: Incorporation of Valine and Isoleucine into Linamarin and Lotaustralin by *Zygaena* and *Heliconius* Species (Lepidoptera). *Zeitschrift für Naturforschung C*, **38**, 583–588.
- WUILLOUD, J.C.A., GRATZ, S.R., GAMBLE, B.M., & WOLNIK, K.A. (2004) Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. *The Analyst*, **129**, 150.
- WYBOUW, N., DERMAUW, W., TIRRY, L., STEVENS, C., GRBIC, M., FEYEREISEN, R., & VAN LEEUWEN, T. (2014) A gene horizontally transferred from bacteria protects arthropods from host plant cyanide poisoning. *eLife*, **3**.
- YANG, J.Y., SANCHEZ, L.M., RATH, C.M., LIU, X., BOUDREAU, P.D., BRUNS, N., GLUKHOV, E., WODTKE, A., DE FELICIO, R., FENNER, A., WONG, W.R., LININGTON, R.G., ZHANG, L., DEBONSI, H.M., GERWICK, W.H., & DORRESTEIN, P.C. (2013) Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod.*, **76**, 1686–1699.
- YOON, S.H., KIM, M.-S., KIM, S.H., PARK, H.M., PYO, H., LEE, Y.M., LEE, K.-T., & HONG, J. (2015) Effective application of freezing lipid precipitation and SCX-SPE for determination of pyrrolizidine alkaloids in high lipid foodstuffs by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, **992**, 56–66.
- YOSHIKAWA, K., KATSUTA, S., MIZUMORI, J., & ARIHARA, S. (2000) Four Cycloartane Triterpenoids and Six Related Saponins from *Passiflora edulis*. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1229–1234.
- YOUNG, A.M. & YOUNG, A.M. (1975) Observations on the life cycle of *Heliconius hecale zuleika* (Hewitson) in Costa Rica. *The Pan-Pacific entomologist.*, **51**, 76–85.
- YU, G., SMITH, D.K., ZHU, H., GUAN, Y., & LAM, T.T.-Y. (2017) ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, **8**, 28–36.
- YUAN, F., BERNARD, G.D., LE, J., & BRISCOE, A.D. (2010) Contrasting Modes of Evolution of the Visual Pigments in *Heliconius* Butterflies. *Mol Biol Evol*, **27**, 2392–2405.
- ZAGROBELNY, M., BAK, S., & MØLLER, B.L. (2008) Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry*, **69**, 1457–1468.
- ZAGROBELNY, M., BAK, S., OLSEN, C.E., & MØLLER, B.L. (2007) Intimate roles for cyanogenic glucosides in the life cycle of *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera, Zygaenidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **37**, 1189–1197.
- ZAGROBELNY, M., BAK, S., RASMUSSEN, A.V., JØRGENSEN, B., NAUMANN, C., & LINDBERG MØLLER, B. (2004) Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, **65**, 293–306.
- ZAGROBELNY, M., BAK, S., THORN EKSTRØM, C., ERIK OLSEN, C., & LINDBERG MØLLER, B. (2007) The cyanogenic glucoside composition of *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera: Zygaenidae) as effected by feeding on wild-type and transgenic lotus populations with variable cyanogenic glucoside profiles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **37**, 10–18.
- ZAGROBELNY, M., DE CASTRO, É.C.P., MØLLER, B.L., & BAK, S. (2018) Cyanogenesis in Arthropods: From Chemical Warfare to Nuptial Gifts. *Insects*, **9**, 51.
- ZAGROBELNY, M., JENSEN, M.K., VOGEL, H., FEYEREISEN, R., & BAK, S. (2018) Evolution of the Biosynthetic Pathway for Cyanogenic Glucosides in Lepidoptera. *J Mol Evol*, **86**, 379–394.

- ZAGROBELNY, M. & MØLLER, B.L. (2011) Cyanogenic glucosides in the biological warfare between plants and insects: The Burnet moth-Birdsfoot trefoil model system. *Phytochemistry, Plant-Insect Interactions*, **72**, 1585–1592.
- ZAGROBELNY, M., OLSEN, C.E., PENTZOLD, S., FÜRSTENBERG-HÄGG, J., JØRGENSEN, K., BAK, S., MØLLER, B.L., & MOTAWIA, M.S. (2014) Sequestration, tissue distribution and developmental transmission of cyanogenic glucosides in a specialist insect herbivore. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **44**, 44–53.
- ZAGROBELNY, M., SIMONSEN, H.T., OLSEN, C.E., BAK, S., & MØLLER, B.L. (2015) Volatiles from the burnet moth *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera) and associated flowers, and their involvement in mating communication: Mating communication in burnet moth. *Physiological Entomology*, **40**, 284–295.
- ZHOU, Y., LI, N., CHOI, F.F.-K., QIAO, C.-F., SONG, J.-Z., LI, S.-L., LIU, X., CAI, Z.-W., FU, P.P., LIN, G., & XU, H.-X. (2010) A new approach for simultaneous screening and quantification of toxic pyrrolizidine alkaloids in some potential pyrrolizidine alkaloid-containing plants by using ultra performance liquid chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **681**, 33–40.