

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École doctorale Sciences de la vie et de la santé

Faculté de Médecine

Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale

**Les espèces de *Culicoides* du sous-genre *Avaritia*  
(Diptera : Ceratopogonidae) dans le monde :**

Révision systématique et taxonomique des espèces  
d'intérêt dans la transmission d'*Orbivirus*

Par Bruno MATHIEU



Thèse de doctorat des Sciences du Vivant

Présentée et soutenue publiquement le 9 Décembre 2011

Devant un jury composé de :

Mme. Sylvie MANGUIN

M. Alexander MATHIS

Mme. Nathalie BOULANGER

Mme. Catherine CÊTRE-SOSSAH

M. Jean-Claude DELÉCOLLE

M. Ermanno CANDOLFI

Directeur de Recherche, IRD, Montpellier, Rapporteur externe

Professeur, Université de Zurich, Suisse, Rapporteur externe

Maitre de Conférences, Université de Strasbourg, Rapporteur interne

Chercheur, CIRAD, Montpellier, Examineur externe

Chercheur, Université de Strasbourg, Examineur interne

Professeur, Université de Strasbourg, Directeur de thèse



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École doctorale Sciences de la vie et de la santé

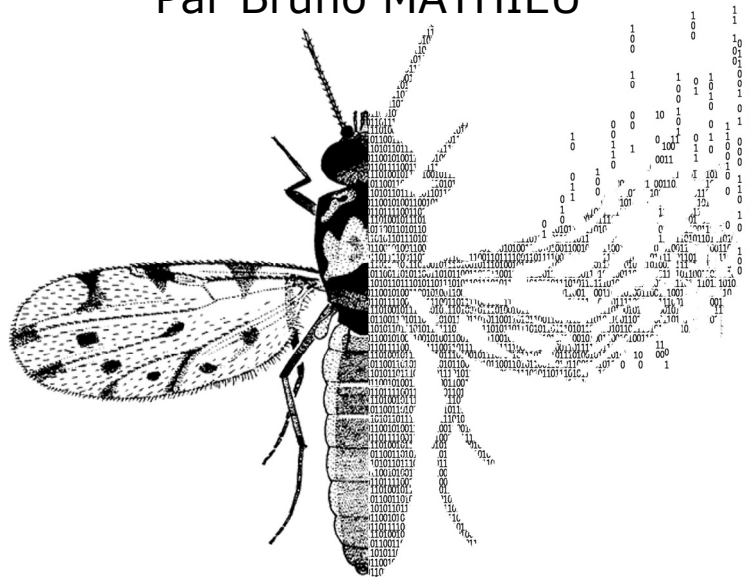
Faculté de Médecine

Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale

**Les espèces de *Culicoides* du sous-genre *Avaritia*  
(Diptera : Ceratopogonidae) dans le monde :**

Révision systématique et taxonomique des espèces  
d'intérêt dans la transmission d'*Orbivirus*

Par Bruno MATHIEU



Thèse de doctorat des Sciences du Vivant

Présentée et soutenue publiquement le 9 Décembre 2011

Devant un jury composé de :

Mme. Sylvie MANGUIN

M. Alexander MATHIS

Mme. Nathalie BOULANGER

Mme. Catherine CÊTRE-SOSSAH

M. Jean-Claude DELÉCOLLE

M. Ermanno CANDOLFI

Directeur de Recherche, IRD, Montpellier, Rapporteur externe

Professeur, Université de Zurich, Suisse, Rapporteur externe

Maitre de Conférences, Université de Strasbourg, Rapporteur interne

Chercheur, CIRAD, Montpellier, Examineur externe

Chercheur, Université de Strasbourg, Examineur interne

Professeur, Université de Strasbourg, Directeur de thèse

*Illustration de couverture par Frédéric BAUTIAS,  
d'après un dessin de Jean-Claude DELÉCOLLE.*



# Remerciements

La rédaction de ces quelques lignes de remerciements est un exercice au combien important au vu du contexte dans lequel se sont déroulées ces trois années de recherche. Ces quelques lignes me permettent également de remercier les différentes personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse.

En poste au sein du laboratoire de l'EID Méditerranée depuis 2000, je remercie tout d'abord à remercier son Président Mr Christian Jean et son Directeur Général Mr Didier Amadou pour avoir répondu favorablement à ma demande de disponibilité pour convenance personnelle.

J'exprime ma reconnaissance au Pr. Ermanno Candolfi, Directeur de l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (IPPTS), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour avoir accepté de diriger cette thèse.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements au Dr. Dominique Martinez, Directeur de l'unité UMR15 CIRAD-INRA Contrôle des maladies, pour renouveler avec confiance depuis une dizaine d'années l'étroite collaboration entretenue avec l'IPPTS. Cette thèse a été financée par la convention CIRAD-IPPTS, elle-même était liée à la convention cadre entre le CIRAD et le Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire. Le projet européen Med\_Reo\_Net (SSPE-CT-2006-044285) a également financé une partie du développement de mes travaux, notamment le développement de la clé d'identification.

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Au terme de ce doctorat, c'est un honneur et un plaisir pour moi de pouvoir remercier ici les personnes dont l'aide, le soutien et les conseils m'ont été si précieux tout au long de la rédaction de cette thèse. En tout premier, il m'est tout naturel de remercier Jean-Claude Delécolle. Cher ami et Maître, que de temps écoulés et de chemins parcourus depuis notre rencontre il y a dix ans. Tu as toujours distillé ton savoir sans retenue et je suis très fier et très heureux d'avoir reçu ton enseignement. Nul doute que nous aurons encore de ces belles discussions taxonomiques qui nous conduisent aux insomnies.

Déjà encadrante au cours de mon DEA, j'ai eu la chance et l'honneur de pouvoir bénéficier une nouvelle fois du soutien sans faille de Catherine Cêtre-Sossah. Tu m'as tant aidé pour

entre autres : collecter des spécimens par tous les moyens, pour dépasser les problèmes techniques rencontrés en n'hésitant pas à aller faire des manips toi-même, pour les diverses rédactions et j'en passe. Nos points du vendredi me manqueront, Catherine je te remercie du fond du cœur. Je salue la souplesse et l'ouverture d'esprits de mes deux encadrants, ils ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'ensemble de l'équipe vecteur de l'UMR15 du CIRAD et plus particulièrement à Claire Garros et Thomas Balenghien. Claire, tu as pris tes fonctions au démarrage de cette thèse et tout naturellement tu t'es intéressée à ces travaux. Rapide et efficace, tu m'as apporté beaucoup d'aide pour la collecte des spécimens, de précieux conseils dans tous les domaines et pour la rédaction du manuscrit. Claire je te remercie très sincèrement.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements aux personnes qui ont réalisé le protocole de validation de la clé d'identification : J. Barber, E. Denison, J. B. Ferre, L. Gardès, K. Huber et M. L. Setier-Rio.

J'aimerais spécialement présenter ma reconnaissance infinie à toutes les personnes aux quatre coins du monde qui m'ont permis de rassembler les spécimens indispensables à ces travaux et sans qui cette thèse n'aurait eu aucun sens. Pour leur gentillesse et générosité, qu'ils soient spécialistes de ces moucheron, techniciens, doctorants, chercheurs dans d'autres disciplines, enfants des dits chercheurs expatriés, voisins, parents d'élèves, et qu'ils aient identifié, collecté ou même transporté des échantillons, leurs aides m'ont été très précieuses, mes plus vifs remerciements s'adressent à : X. Allène, J. Anderson, T. Baldet, D. Babary, G. Bellis, F. Biteau-Coroller, P. Boland, N. Brodskaja, M. Carrasquilla, C. Cottaux, M. David, A. Desvars, M. Djerbal, P. Dominiak, I. Dusfour, V. Glukhova, M. Goffredo, N. Grillet, N. Hunt, M. Keane, K. Labuschagne, C. Paupy, Le Duc Do, F. Le Pont, J. C. Lien, R. Meiswinkel, C. Ninio, N. Pagès, F. Pagès, M. Patakakis, A. Przhiboro, N. Rahola, V. Robert, F. Schaffner, M. L. Setier-Rio, F. Simard, D. A. Swanson, R. Szadziewski, M. H. Weng et L. Tantely.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier mes amis, ma famille et ma belle famille qui m'ont toujours soutenu et qui ont été présents dans les bons et les moins bons moments.

Je suis particulièrement fier et heureux d'avoir su mener de front, vie professionnelle et vie personnelle, pour preuve la petite famille qui m'entoure au quotidien qui m'a permis de me ressourcer et me remotiver. Lucie, Lilie et Antoine, je vous aime tout simplement...

## RÉSUMÉ

Autrefois, la systématique se limitait à une approche classificatoire de la diversité, les rangs reflétant des rapprochements morphologiques. Actuellement, la systématique cherche à expliciter les raisons de cette diversité, c'est à dire l'évolution des espèces dans l'espace et dans le temps. Dans un contexte de maladie vectorielle émergente, les espèces du sous-genre *Avaritia* (Diptera : Ceratopogonidae, genre *Culicoides*), sont particulièrement impliquées dans la transmission de certains virus (Reoviridae : *Orbivirus*). Nous proposons ici une révision systématique et taxonomique des espèces du sous-genre *Avaritia* à l'échelle mondiale aboutissant à un schéma de classification basé sur l'évolution de l'histoire de vie de ces espèces, ainsi que le développement des outils morphologiques et moléculaires permettant leurs identifications.

Une clé d'identification interactive des espèces de *Culicoides* de la région Ouest paléarctique (IIKC) richement illustrée, a été développée sur une centaine de taxons et validée par six utilisateurs. Un site internet dédié <http://www.iikculicoides.net/> permet de naviguer dans la base de données illustrée, d'identifier en ligne, et de télécharger gratuitement l'application. La limitation de ce type d'outil inhérente à la morphologie même des espèces cryptiques, nous a conduit à développer et valider une PCR quantitative capable d'estimer simultanément avec précision l'abondance relative de deux espèces cryptiques, *C. (Avaritia) obsoletus* et *C. (A.) scoticus*, pouvant être présentes ensemble dans des lots de spécimens mélangés. L'approche mondiale et la base multi-marqueurs de la phylogénie moléculaire réalisées ont permis, (1) de démontrer la monophylie du sous-genre *Avaritia*, (2) de mettre en évidence la présence de quatre clades monophylétiques correspondants aux groupes d'espèces : *Obsoletus*, *Grahami*, *Boophagus* et *Imicola*, (3) de réviser la taxonomie et les caractères discriminants des espèces au sein de ces groupes et, (4) de poser clairement une hypothèse évolutive quant à la position des espèces du groupe *Orientalis* dans ce schéma phylogénétique.

Adaptés à une utilisation en routine à l'échelle d'un réseau de surveillance entomologique, les outils morphologiques et moléculaires développés permettent d'évaluer la dynamique spatio-temporelle des vecteurs. Cette thèse constitue une contribution à la révision systématique et taxonomique du genre *Culicoides* dans son ensemble, révision qui demeure nécessaire et incontournable pour la compréhension de la biologie des espèces et notamment des espèces vectrices de pathogènes.

[Systématique, taxonomie, *Culicoides*, *Avaritia*, clé, identification, interactive, PCR quantitative, phylogénie]

---

## The *Culicoides* species of the subgenus *Avaritia* (Diptera: Ceratopogonidae): Systematic and taxonomic revision of the world fauna species of interest in *Orbivirus* transmission

### ABSTRACT

In the past, systematics was limited to a classificatory approach of diversity, ranks being based on a close morphology. Nowadays, systematics aims to understand the reasons for this diversity, *i.e.* to species evolution in space and time. Talking about vector transmitted emerging diseases, the species belonging to the subgenus *Avaritia* (Diptera: Ceratopogonidae, genus *Culicoides*), are particularly involved in the transmission of *Orbiviruses* (Family: Reoviridae). We revised the systematic and the taxonomy of the species belonging to the subgenus *Avaritia* at a world scale to propose a classification scheme based on the species life history, and developed morphological and molecular tools for their identification.

An interactive identification key of the *Culicoides* species of the West palaeartic region (IIKC), richly illustrated, was developed based on one hundred species or so and validated by six users. A dedicated website <http://www.iikculicoides.net/> allows users, to browse the illustrated database, to identify online, and to download the free software. The development of these tools unfortunately limited by the inherent close morphology of the cryptic species leads us to develop and to validate a quantitative PCR able to estimate simultaneously the relative abundance of the both cryptic species, *C. (Avaritia) obsoletus* and *C. (A.) scoticus*, in mixed samples where both species are present. The world-wide scale and the multi-gene based molecular phylogeny implemented have shown that: (1) the subgenus *Avaritia* was monophyletic, (2) four monophyletic clades within the subgenus represented by the groups: *Obsoletus*, *Grahami*, *Boophagus* and *Imicola*, (3) a taxonomic revision of the discriminant characters within groups between species and, (4) an evolutive hypothesis for the position of the *Orientalis* group into the phylogenetic scheme.

In order to look at vector spatiotemporal dynamics, both morphological and molecular tools were designed to be used at the scale of entomological surveillance networks. This thesis is a contribution to the systematic and the taxonomic revision of the genus *Culicoides* as a whole. Such kind of revision remains necessary and must be addressed to a better knowledge of the species biology particularly species involved in pathogens transmission.

[Systematic, taxonomy, *Culicoides*, *Avaritia*, key, identification, interactive, quantitative PCR, phylogeny]



# Sommaire

Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	xi
Liste des annexes.....	xiii
Liste des valorisations .....	xv
Liste des abréviations .....	xvii
Introduction générale.....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	6
Chapitre 1 : Le genre <i>Culicoides</i> .....	7
1. Histoire de la description des espèces .....	7
2. Diversité actuelle, morphologie et écologie .....	10
Diversité actuelle.....	10
Morphologie.....	10
Ecologie.....	11
3. Etats des lieux des clés d'identification.....	12
Encadré n°1 : Les types de clés d'identification .....	12
Théorie et réalité de l'identification .....	12
Clés d'identification à accès simple .....	12
Clés d'identification à accès libre .....	13
Chapitre 2 : Le rôle vecteur des <i>Culicoides</i> .....	17
1. Découverte.....	17
Encadré n°2 : La nuisance.....	17
Du pathogène vers le vecteur .....	18
Une transmission biologique démontrée .....	19
2. Rôle dans la transmission .....	20
3. La FCO, actualité d'une crise sanitaire.....	21
Généralités, distribution et importance .....	21
Voies d'introduction du virus dans le bassin méditerranéen.....	23
Le vecteur majeur, distribution et changement climatique .....	25
Situation jusqu'en 2006.....	25
Situation après 2006 .....	27
4. Etat des lieux de l'identification des vecteurs .....	28
Les outils morphologiques .....	28
Les outils moléculaires.....	29
Chapitre 3 : Le sous-genre <i>Avaritia</i> Fox, 1955 .....	31
Définition morphologique .....	31
1. Importance vétérinaire .....	32
2. L'imbroglio taxonomique.....	34
Du sous-genre aux groupes .....	34
Le groupe <i>Obsoletus</i> .....	34
Le groupe <i>Andicola</i> .....	35
Le groupe <i>Pusillus</i> .....	35

Le groupe Actoni.....	35
Les groupes Imicola et Orientalis.....	36
3.    Éléments de phylogénie.....	36
Cadre et objectifs.....	41
RÉSULTATS .....	44
Chapitre 4 : Composition et échantillonnage du sous-genre <i>Avaritia</i> .....	45
1.    Liste des espèces appartenant au sous-genre <i>Avaritia</i> .....	45
2.    Échantillonnage des spécimens .....	48
3.    Conclusion .....	49
Chapitre 5 : Phylogénie moléculaire du sous-genre <i>Avaritia</i> .....	51
1.    Criblage de marqueurs moléculaires .....	52
2.    Phylogénie moléculaire .....	53
3.    Conclusion .....	83
Chapitre 6 : Clé d'identification interactive.....	85
1.    Approche méthodologique.....	86
2.    Résultats.....	88
3.    Conclusion .....	111
Chapitre 7 : Identification et quantification d'espèces cryptiques .....	113
1.    Approche méthodologique.....	111
2.    Résultats.....	114
3.    Conclusion .....	125
DISCUSSION .....	127
Encadré n°3 : Diagnose des espèces du groupe Boophagus. ....	134
Encadré n°4 : Diagnose des espèces du groupe Grahami. ....	136
Encadré n°5 : Diagnose des espèces du groupe Imicola .....	139
Encadré n°6 : Diagnose des espèces du groupe et complexe <i>Obsoletus</i> .....	142
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	151
Références .....	156
Annexes.....	172
Index des espèces citées .....	233

# Liste des figures

Figure 1 : Nombre d'espèces du genre <i>Culicoides</i> décrites au cours du temps (jusqu'en 2009) par région biogéographique depuis la première description en 1758.....	9
Figure 2 : Photographie de <i>Culicoides subfagineus</i> .....	10
Figure 3 : Cycle de vie des insectes du genre <i>Culicoides</i> .....	11
Figure 4 : Extrait d'une clé dichotomique pour les mâles <i>Culicoides</i> .....	13
Figure 5 : Carte de répartition de la fièvre catarrhale ovine.....	22
Figure 6 : Emergence de la FCO dans le bassin méditerranéen avant 2006 .....	23
Figure 7 : Zones réglementées pour la FCO en vigueur au 5 Juillet 2011 .....	24
Figure 8 : Distribution des vecteurs de la FCO en Europe et dans le bassin méditerranéen..	27
Figure 9 : Relations phylogénétiques basées sur les séquences ITS1 d'espèces du genre <i>Culicoides</i> présentes en France.. .....	37
Figure 10 : Relations phylogénétiques d'espèces au sein du sous-genre <i>Avaritia</i> .....	38
Figure 11 : Carte représentant l'échantillonnage des espèces collectées appartenant au sous-genre <i>Avaritia</i> .....	48
Figure 12 : Caractère alaire des espèces du groupe Boophagus. ....	84
Figure 13 : Capture écran du logiciel Xper2 en mode édition des taxa. ....	87
Figure 14 : Capture écran de l'assistant d'installation de IIKC. ....	88
Figure 15 : Localisation des 160 pièges de la surveillance entomologique en France depuis 2009.....	126
Figure 16 : Genitalia de <i>C. suzukii</i> Kitaoka. ....	132
Figure 17 : Comparaison des ailes femelles de <i>Culicoides suzukii</i> selon divers auteurs. ....	133
Figure 18 : Ailes des trois espèces du groupe Boophagus. ....	134
Figure 19 : Aile et génitalia de <i>Culicoides actoni</i> .....	135
Figure 20 : Caractères qualitatifs discriminants des trois espèces traitées du groupe Grahami. ....	136
Figure 21 : Photographies des ailes de <i>C. gulbenkiani</i> , <i>C. hui</i> et <i>C. tororoensis</i> . ....	138

Figure 22 : Ailes des espèces du groupe Imicola étudiées.....	139
Figure 23 : Pincés génitales de <i>C. filicinus</i> et de <i>C. gornostaeva</i> .....	140
Figure 24 : Pince génitale, édéage et paramères de <i>C. chiopterus</i> .....	142
Figure 25 : Illustrations des sensilles trichoïdes.....	145
Figure 27 : Phylogramme de l'arbre évolutif des trois clades résolus.....	146
Figure 28 : Hypothèses phylogénétiques, A, B et C sur la position du groupe Grahami.....	146
Figure 29 : Hypothèse évolutive sur la position du groupe Orientalis dans la phylogénie résolue.....	147

### Liste des figures des articles présentées :

**Article : *Molecular phylogeny of the biting midge genus Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). Taxonomic implications for the subgenus Avaritia.***

Figure 1. Saturation plots of the absolute numbers of transitions (blue) and transversions (green) for each gene and for ITS1 combining with ITS2 .....	62
Figure 2. Trees obtained by independent ML reconstruction for each region.....	64
Figure 3. Bayesian tree resulting from the phylogenetic analysis of the combined dataset according the best-fit partitioning strategy.....	66

**Article : *Development and validation of IIKC: an interactive identification e tool for Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region.***

Figure 1. Screenshot of IIKC .....	97
Figure 2. a) IIKC database structure, b) Examples of end user pathways .....	100
Figure 3. Numbers of observation for each descriptor used .....	105
Figure 4. Descriptor groups used by the different users (in percentage) with n as the total number of observations made by each user. ....	106



**Article : *Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: Application to *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus.***

Figure 1. Relative quantity of *C. obsoletus* DNA estimated as a function of the relative number of *C. obsoletus* and *C. scoticus* specimens present in 11 one-tube mixed samples of 100 males..... 122

Figure 2. Absolute values (min, max, mean) of differences between model prediction and the correct number of *C. obsoletus* to each sample..... 122



# Liste des tableaux

Tableau I : Liste des pathogènes transmis par les 16 espèces appartenant au sous-genre <i>Avaritia</i> .....	33
Tableau II : Liste actualisée des 83 espèces appartenant au sous-genre <i>Avaritia</i> . ....	47
Tableau III : Liste des espèces du sous-genre <i>Avaritia</i> collectés par région biogéographique. ....	49
Tableau IV : Pourcentages minimum (Min) et maximum (Max) d'identité des séquences en interspécifique (inter-sp.) et en intra-spécifique (intra-sp.).....	53
Tableau V : Liste des espèces qui composent les quatre groupes d'espèces monophylétiques identifiés dans cette étude. Nous émettons l'hypothèse que les espèces marquées d'une étoile * appartiennent au groupe sur la base d'évidences morphologiques (voir texte). ....	131
Tableau VI : Caractères discriminants permettant d'identifier les espèces des groupes <i>Imicola</i> et <i>Orientalis</i> d'après Meiswinkel (2004). ....	137
Tableau VII : Caractères discriminants au sein du complexe <i>Obsoletus</i> . ....	144

## Liste des tableaux des articles présentés :

### **Article : *Molecular phylogeny of the biting midge genus Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). Taxonomic implications for the subgenus Avaritia***

Table 1: Primers used to amplify the molecular regions studied .....	58
--	----

### **Article : *Development and validation of IIKC: an interactive identification e tool for Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region.***

Table 1. List of the 98 species represented in IIKC .....	92
Table 2. Descriptors and descriptor code used for IIKC .....	95
Table 3. For each species used for the validation, number of identification success, number of descriptors used by end user when the identification was correct, and theoretical number of descriptors following strictly the list of the Xper original sort .....	103

**Article : Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: Application to *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus**

Table 1. Primers and probes specific to <i>C. obsoletus</i> and <i>C. scoticus</i> .....	117
Table 2. Origin of the <i>Obsoletus</i> complex females used to the sensitivity of qPCR .....	118
Table 3. Non- <i>Obsoletus</i> complex specimens used to the specificity .....	119
Table 4. Origin of the males to calibrate the predictive model of the relative abundance of <i>C. obsoletus</i> and <i>C. scoticus</i> .....	120
Table 5. Contingency table with the number of specimens identified both by morphology (gold standard) and with the quantitative real-time PCR assay .....	121

# Liste des annexes

Annexe 1 : Morphologie des <i>Culicoides</i> .....	173
Annexe 2 : La collecte de <i>Culicoides</i> vivants selon Du Toit .....	178
Annexe 3 : Tableau des vecteurs du genre <i>Culicoides</i> par pathogènes.....	179
Annexe 4 : Liste des espèces supplémentaires à notre liste données comme appartenant au sous-genre <i>Avaritia</i> par Yu (2005).....	179
Annexe 5 : Tableau synthétique de la répartition biogéographique des espèces du sous-genre <i>Avaritia</i> .....	182
Annexe 6 : Chorologie des espèces du sous-genre <i>Avaritia</i> .....	184
Annexe 7 : Collection des ADNg disponibles .....	191
Annexe 8 : Liste des amorces testées, conditions d'amplification et notes pour l'amplification de <i>Culicoides</i> .....	203
Annexe 9 : Matrices des pourcentages d'identité de séquences obtenus lors du criblage de marqueurs.....	208
Annexe 10 : Compte rendu du groupe de travail de taxonomie réuni à Strasbourg du 16 au 20 Mars 2009.....	212
Annexe 11 : IIKC, documentation d'aide pour l'ouverture .....	222
Annexe 12 : IIKC, documentation d'utilisation de la clé.....	223
Annexe 13 : IIKC, documentation sur la nomenclature et l'observation des caractères morphologiques.....	227
Annexe 14 : Comparaison de l'extraction d'ADN non-destructive versus classique .....	231



# Liste des valorisations

## Articles

Mathieu B., Delécolle J.-C., Garros C., Balenghien T., Setier-Rio M.-L., Candolfi E., Cêtre-Sossah C. (2011), Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: Application to *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus. *Veterinary Parasitology*, **182**, pp. 297-306

Mathieu B., Cêtre-Sossah C., Garros C., Chavernac D., Balenghien T., Carpenter S., Setier-Rio M. L., Vignes-Lebbe R., Ung V., Candolfi E., Delécolle J. C. Development and validation of IIKC: an interactive identification e tool for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasite Vectors*, **En préparation**

Mathieu B., Garros C., Balenghien T., Candolfi E., Delécolle J. C., Cêtre-Sossah C. Molecular phylogeny of the biting midge genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): Taxonomic implications for the subgenus *Avaritia*. *Infection, Genetics and Evolution*, **En préparation**

Garros C., Mathieu B., Balenghien T., Cêtre-Sossah C., Delécolle J. C. (2010), Suggesting synonymies? Comments on Kiehl et al. (2009) "the European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?" *Parasitol Res*, **107**, 3, pp. 731-4.

Vénail R., Mathieu B., Setier-Rio M. L., Borba C., Alexandre M., Viudes G., Garros C., Allene X., Carpenter S., Baldet T., Balenghien T. (2011), Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. *J Med Entomol*, **48**, 2, pp. 351-7.

Balenghien T., Garros C., Mathieu B., Setier-Rio M. L., Allène X., Gardes L., Rakotoarivoany I., Venail R., Akaddar A., Drouet M., Baldet T., Delécolle J. C. (2010), La surveillance des Culicoides en France. *Bulletin Épidémiologique*, **35**, pp. 8-9.

## Communications orales avec acte

Mathieu B., Cêtre-Sossah C., Garros C., Chavernac D., Balenghien T., Vignes-Lebbe R., Ung V., Candolfi E., Delécolle J.C., (2010), IIKC: An Interactive Identification Key for female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the West Palearctic region, In: Nimis, P.L., Vignes-Lebbe, R. (Eds.) Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems. EUT, pp. 201-205. ISBN: 978-88-8303-295-0  
**20-22 Sept 2010 PARIS (FRANCE)**

Mathieu B., Chavernac D., Delécolle J.C., Balenghien T., Garros C., Candolfi E., Cêtre-Sossah C., (2009), What is known about the *Culicoides* identification freeware? *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **62**, 128.  
**2-4 Dec 2009, LISBONNE (PORTUGAL)**  
Vénail R., Mathieu B., Setier-Rio M.L., Balenghien T., (2009), World Health Organisation test applied on *Culicoides*: a multicentric study. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **62**, 132.  
**2-4 Dec 2009, LISBONNE (PORTUGAL)**

Mathieu B., Balenghien T., Schaffner F., Delécolle J.C., Garros C., Candolfi E., Cêtre-Sossah C., (2009), Towards an online key for morphological identification of Palearctic *Culicoides* species. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, **62**, 100.  
**9-11 Dec 2008, TERAMO (ITALIE)**

## Communications orales sans acte

Garros C., Mathieu B., Viennet E., Delécolle J.C., Setier-Rio M.L., Allène X., Gardés L., Rakotoarivoany I., Vénail R., Guis H., Baldet T., Cêtre-Sossah C., Balenghien T. - The genus *Culicoides*, biting midge vectors of Orbiviruses, in the Palaearctic region a comprehensive review of the taxonomy, distribution, dynamics and bionomics in relation to their implications with arboviral transmission. Oral communication Global Conference on Entomology, CHIANG MAI (THAILANDE), 2011

Mathieu B., Cêtre-Sossah C., Garros C., Chavernac D., Balenghien T., Vignes-Lebbe R., Ung V., Candolfi E., Delécolle J.C. - New identification tools for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), biting midge vectors of bluetongue virus: interactive identification key for female *Culicoides* of the Palaearctic region and quantitative-PCR assay for the *Obsoletus* Complex. Oral communication 17th European meeting Society for Vector Ecology, WROCLAW (POLOGNE), 2010

Mathieu B., Cêtre-Sossah C., Garros C., Chavernac D., Balenghien T., Vignes-Lebbe R., Ung V., Candolfi E., Delécolle J.C. - IIKC: An Interactive Identification Key for female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the West Palearctic region. Oral communication Tools for identifying biodiversity: Progress and problems, PARIS (FRANCE), 2010

Balenghien T., Delécolle J.C., Mathieu B., Garros C., Setier-Rio M.L., Allène X., Gardes L., Rakotoarivoany I., Venail R., Akkadar A., Baldet T. - *Culicoides* diversity and dynamics in France. Oral communication 5<sup>th</sup> International SOVE congress, ANTALYA (TURQUIE), 2009

## Poster

Garros C., Delécolle J.C., Setier-Rio M.L., Akkadar A., Allène X., Delécolle D., Gardes L., Rakotoarivoany I., Venail R., Mathieu B., Chavernac, D. Drouet M., Baldet T., Balenghien T. - Monitoring of *Culicoides* populations in France. Poster 17th European meeting Society for Vector Ecology, WROCLAW (POLOGNE), 2010

## Livret scientifique

La Fièvre Catarrhale Ovine. Collection "Les savoirs partagés", Charbonnier, G., Launois, M. (Eds.), CIRAD, 2009, 84p. ISBN: 978-2-87614-662-4

Mathieu B., Balenghien, T., Delécolle, J.C., (2009), Les *Culicoides* vecteurs de la FCO, In: Gourreau, J.M. (Ed.) La fièvre catarrhale ovine. Guides France Agricole, pp. 58-71. ISBN: 978-2-85557-161-4



# Liste des abréviations

5,8S : gène codant pour la sous-unité 5,8 du ribosome

28S : gène codant pour la sous-unité 28 du ribosome

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNr : ADN ribosomal

BI : Inférence bayésienne (*bayesian inference*)

bp : paire de bases

BTV : Virus de la bluetongue

CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

COI : Cytochrome oxydase de type I

COII : Cytochrome oxydase de type II

Cu : Nervure cubitale

Cytb : Cytochrome b

D3 : Domaine 3 de la région 28S

EID Méditerranée : Entente interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen

FCO : Fièvre catarrhale ovine

IRD : Institut de recherche pour le développement

ITS1 : *Internal transcribed spacer 1*

ITS2 : *Internal transcribed spacer 2*

m : Cellule médiane

M : Nervure médiane

MALDI-TOF : Spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry).

MHD : Maladie hémorragique des cervidés

ML : maximum de vraisemblance (*maximum likelihood*)

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle

NJ : *Neighbor-Joining*

OIE : Office international des épizooties

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (acronyme de *Polymerase chain reaction*)

PE : Peste équine

qPCR : PCR quantitative ou PCR temps réels

r : Cellule radiale

RAPD : Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*random amplification of polymorphic DNA*)

ratio P/H : rapport des longueurs du proboscis et de la tête

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

RT-PCR : PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique en ADN complémentaire

s/g : sous-genre

*Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin.*

Erwin Chargaff



# Introduction générale

Taxonomie ? Systématique ? Ces deux termes définissent deux approches distinctes qui sont bien souvent mal comprises et confondues. La taxonomie primaire (ou alpha-taxonomie) est la science qui décrit les organismes vivants et les regroupe en entités (taxons) avec des critères d'identification précis et qui classe ces taxons dans une structure hiérarchique. La systématique quant à elle, traite de l'étude des relations qui existent entre les taxons et les niveaux hiérarchiques.

A l'origine exclusivement morphologique, la systématique en tant qu'approche de l'évolution de l'histoire de vie, s'est ensuite développée par des études de biologie moléculaire suite à la découverte des fonctions enzymatiques des ADN polymérase issus de bactéries thermophiles impliquées dans la réaction d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR). La systématique morphologique et moléculaire ont chacune des avantages quant aux études de phylogénie (Hillis, 1987). L'approche « morphologie » est applicable sur le matériel de collection des musées et les fossiles<sup>1</sup>. L'étude d'une grande partie des organismes sera toujours premièrement abordée par cette approche. Le potentiel de la systématique moléculaire est extrêmement élevé et, lorsque pleinement exploité, devrait fournir des éléments fort détaillés de l'histoire de vie des organismes étudiés. Selon Hillis (1987), la combinaison des deux approches morphologique et moléculaire maximise l'utilité du contenu de l'information. En 2005, deux auteurs ont qualifié une telle approche combinatoire de *taxonomie intégrative* (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005). Pour Dayrat (2005), le niveau spécifique est mieux supporté lorsque l'étude se base sur plusieurs types de données plutôt que sur un seul, dans ce cas, *intégrative* signifie multidisciplinaire. Will et collaborateurs (2005) utilisent ce terme pour désigner un processus taxonomique basé sur l'inclusion de toutes les sources de données, et pas uniquement de la région code-barres de la vie, tout en donnant une priorité à l'alpha-taxonomie<sup>2</sup>. Le projet code-barres de la vie, *barcode of life*, proposé par Hebert *et al.* (2003) vise à séquencer la région *cytochrome c oxydase I* (COI) de l'ADN mitochondrial (ADNmt) des organismes pour les identifier, justifiant que cela libèrera du temps aux rares experts trop occupés par les nombreuses identifications des organismes composant les règnes présents sur Terre pour qu'ils puissent se consacrer à décrire la biodiversité. Schlick-Steiner et

---

<sup>1</sup> L'extraction d'ADN est toutefois possible pour certains fossiles mais toujours sous une forme dégradée.

<sup>2</sup> “*Their new idea that DNA barcoding can replace normal taxonomy for naming new species and studying their relationships is worse than bad, it is destructive.*” Will *et al.* (2005)

collaborateurs (2010) proposent un schéma de taxonomie intégrative qui suit une approche comparative des relations possiblement corrélées entre les données moléculaires et morphologiques. Taxonomie intégrative au sens de Yeates *et al.* (2011) se situe entre la génétique des populations et la phylogénie où la meilleure approche serait d'abord une méthodologie quantitative basée sur différents jeux de données concaténés et partitionnés, permettant à chacun de ces jeux d'apporter sa contribution évolutive. Pour ces mêmes auteurs, le terme de taxonomie itérative désigne les études qui posent des hypothèses de délimitations d'espèces, alors testées sur chaque jeu de données (itérations). A l'heure actuelle, ces termes et leurs définitions, ainsi que les méthodologies d'approche décrites sont loin d'être unanimes, preuve en est l'emploi d'autres termes de taxonomie « *combinée, multidisciplinaire, multidimensionnel et collaborative* » (Schlick-Steiner *et al.*, 2010).

Autrefois limitée à une approche classificatoire de la diversité, la systématique actuelle cherche à connaître les raisons de cette diversité, précisément l'évolution des espèces dans l'espace et dans le temps (Matile *et al.*, 1989). Par exemple, suite à une révision morphologique des mouches de fruits du genre *Ceratitis* (Diptera : Tephritidae) (De Meyer, 2000), deux études moléculaires cherchant à comprendre l'évolution de ce phylum ont permis d'en réviser la classification subgénérique et proposent la création de trois nouveaux sous-genres monophylétiques (Barr et McPheron, 2006; Barr et Wiegmann, 2009). Chez les équidés fossiles, le besoin majeur de réviser la classification générique, subgénérique et spécifique a conduit à une étude génétique sur 35 anciens spécimens issus de 4 régions géographiques dont les résultats sont en faveur d'une révision majeure de l'histoire évolutive récente des équidés et révèlent des synonymies ainsi que deux nouvelles espèces fossiles (Orlando *et al.*, 2009). L'organisation du règne végétal est également discutée. Les plantes hépatiques cosmopolites du genre *Frullania* (Frullaniaceae : Porellales) ont subi d'importants changements de classification basés sur leur morphologie. Avant d'en réviser la classification par une étude systématique moléculaire réalisée sur 4 marqueurs distincts, Hentschel *et al.* (2009) recensaient huit études qui décomposaient 15 sous-genres en plus de 30 sections et sous-sections. Chez les poissons d'eau douce du genre *Etheostoma* (Teleostei: Percidae), une analyse phylogénétique sur deux marqueurs suggère la suppression du sous-genre *Boleichthys* (Lang et Mayden, 2007). Ainsi, **l'apport d'une base évolutive à la classification fait défaut dans de nombreux groupes appartenant aux différents règnes.**

Que l'approche soit morphologique et/ou moléculaire, la systématique tend à retracer l'histoire de vie des espèces, et parallèlement la taxonomie propose des outils pour les identifier. Parmi les différents outils, les clés d'identification présentent un intérêt majeur puisqu'elles permettent l'accès à l'information biologique pour l'ensemble des disciplines utilisant les organismes comme modèle. Une des premières clés développée fut celle de Lamarck lorsqu'il publia une *Flore française* en 1778. Des clés permettant de classer les organismes dans les familles et ordres existent depuis longtemps et sont généralement mises à jour sous forme d'ouvrages, *e.g.* pour les poissons d'eau douce (Keith et Allardi, 2001) ou les insectes (Matile, 2000). La grande majorité des clés d'identification se limite à un groupe d'organismes et/ou une zone géographique très limitée : la mycologie avec les champignons liés aux plantes tropicales de la famille des Annonaceae (Beenken et Berndt, 2010), les larves saprophages du Portugal en entomologie légale (Velasquez *et al.*, 2010) ou en botanique avec les salicornes d'Iran (Zare et Keshavarzi, 2007). Le lancement du journal *zookeys*<sup>3</sup> en 2008, propose un nouveau support à la taxonomie avec publication prioritaire des clés d'identifications, et dans sa lignée, en 2010 et 2011, les journaux *phytokeys* et *mycokeys* sont édités respectivement dans les domaines de la botanique et de la mycologie. L'apparition de ces nouvelles revues spécialisées est révélatrice du **regain d'intérêt pour les clés de détermination et le manque de ces outils** indispensables. Toutefois, l'identification morphologique des espèces est gênée par le manque d'accès à l'information taxonomique et par le manque d'experts (Agosti, 2006). Ces dernières années, plusieurs alertes ont été lancées pour montrer le déclin de l'expertise taxonomique, *taxonomic impediment*. Le manque de taxonomistes dans le monde et le faible taux de remplacement ont des conséquences dans de nombreux domaines tels que la conservation de la biodiversité (Agosti, 2006), l'entomologie médicale et vétérinaire (Cuisance et Rioux, 2004; Oliver, 1988), ou le contrôle des nuisibles (Song, 2010).

L'identification de l'espèce est principalement réalisée grâce à des caractères anatomiques et morphométriques. Toutefois, lors d'évènements de spéciation récents, les « nouvelles » espèces demeurent tellement proches d'un point de vue morphologique que leur identification en devient très difficile. Un tel ensemble d'espèces morphologiquement proche mais dont la diversité génétique est réelle, est nommé complexe d'espèces cryptiques. Cette diversité n'a rien d'un phénomène isolé et peut être rencontrée dans de très nombreux groupes

---

<sup>3</sup> *zookeys* est un journal à comité de lectures, d'accès gratuit, indexé et affiche un facteur d'impact de 0,514 en 2011

tels que les oiseaux (Lohman *et al.*, 2010), les chauve-souris (Ibáñez *et al.*, 2006), les araignées (Hamilton *et al.*, 2011) et même dans le milieu marin chez les invertébrés, vertébrés et les plantes (Knowlton, 1993). **L'existence de tels complexes d'espèces pose très clairement les limites de la systématique morphologique.** Dans ce contexte, le développement d'outils moléculaires à visée diagnostique des membres de ces complexes semble être un point clé et considéré comme une des solutions les plus prometteuses. Plusieurs techniques sont principalement utilisées jusqu'ici : la technique PCR « conventionnelle », la technique PCR en temps réel, les méthodes enzymatiques, le séquençage du génome complet, les biopuces, la spectrométrie de masse entre autres. Diverses et variées, les techniques de PCR permettent désormais la détection simultanée de plusieurs espèces d'un même micro-organisme, comme par exemple les trois espèces appartenant au genre *Vibrio* incluant *Vibrio cholerae* responsable du choléra chez l'Homme (Neogi *et al.*, 2010). De nombreuses variations de techniques existent, des étapes de découpage RFLP par une ou plusieurs enzymes de restriction par exemple pour l'identification des larves de coléoptères (Hirsch *et al.*, 2011). La technique de PCR en temps réel s'exonère, quant à elle, de migration électrophorétique puisqu'elle intègre un agent fluorescent intercalant de l'ADN ou une sonde spécifique libérant un fluorophore après hybridation, dans ses réactions permettant ainsi une lecture optique d'unités de fluorescence correspondant alors proportionnelles à une quantité d'ADN amplifié. Cette technique est largement utilisée pour la détection de micro-organismes tels que les virus de la pomme de terre (Mortimer-Jones *et al.*, 2009) ou les champignons entomopathogènes (Schneider *et al.*, 2011). Très récemment introduite comme technique permettant le diagnostic microbiologique en routine, la spectrométrie de masse par les appareils MALDI-TOF semble prometteuse pour la systématique des micro-organismes (Steensels *et al.*, 2011).

Cette introduction générale abordant les relations entre la systématique et la taxonomie a permis de dégager trois grands thèmes : (i) le manque d'une base évolutive dans la classification actuelle, (ii) le manque d'outils d'identification morphologique et, (iii) le développement d'outils moléculaires à visée diagnostique pour des espèces appartenant à un complexe d'espèces. L'actualité récente de la réémergence d'une maladie virale à transmission vectorielle dans le bassin méditerranéen et en Europe, la fièvre catarrhale ovine (FCO), a montré le besoin d'investiguer l'ensemble des trois thèmes énoncés pour certaines espèces du genre des vecteurs responsables de la transmission de cette maladie. Le modèle



d'étude choisi sont les espèces du sous-genre *Avaritia* (Diptera : Ceratopogonidae, genre *Culicoides*), impliquées dans la transmission des virus du genre *Orbivirus* (Reoviridae).

Le premier chapitre présente le genre *Culicoides* au travers de l'histoire de sa description, la biodiversité, la morphologie et l'écologie ainsi que l'état des lieux des outils d'identifications (**chapitre 1**). Le chapitre suivant se focalise sur le rôle de vecteur en retraçant l'histoire de sa découverte, la diversité des pathogènes transmis par ces insectes (**chapitre 2**). Une attention particulière sera portée à la récente crise sanitaire de FCO en Europe ce qui permettra de mettre en avant la diversité des vecteurs impliqués ainsi que les moyens de les identifier. Une dernière partie de l'état des connaissances est ciblée sur le sous-genre *Avaritia* avec la définition et l'importance vétérinaire des espèces qui le composent, l'état de la classification actuelle et les éléments de phylogénie existants (**chapitre 3**). Le cadre et les objectifs sont ensuite exposés avant d'aborder les résultats obtenus. Après avoir actualisé la liste des espèces du sous-genre *Avaritia*, l'échantillonnage des spécimens à l'échelle mondiale est donné (**chapitre 4**). Basé sur ces spécimens, la phylogénie moléculaire réalisée est présentée ainsi que les propositions de révision systématique au sein du sous-genre *Avaritia* (**chapitre 5**). La contribution à l'identification morphologique des *Culicoides* par le développement et la validation d'une clé interactive est exposée (**chapitre 6**). Dans le contexte de deux espèces cryptiques, le développement et la validation d'un outil PCR en temps réel permettant d'estimer l'abondance relative de chacune des espèces simultanément sont présentés (**chapitre 7**). Dans la discussion générale du manuscrit, l'extraction d'ADN non destructive, le choix des marqueurs moléculaires sont abordés, la révision systématique proposée est mise en perspective avec la taxonomie des espèces et des hypothèses évolutives émises. Des conclusions et des perspectives de ce travail achèvent le présent manuscrit.

# ÉTAT DES CONNAISSANCES

# Chapitre 1 : Le genre *Culicoides*

## 1. Histoire de la description des espèces

*Cette partie tente de mettre en parallèle les débuts de l'entomologie avec l'histoire de la découverte de la biodiversité culicoïdienne.*

Le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) a joué un rôle majeur dans le développement de l'entomologie académique au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle. Au sein du MNHN, le Professeur Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829) introduit une classification rationnelle des invertébrés. Le Professeur Pierre-André Latreille (1772-1833) succède à Lamarck en 1829 et initie l'application des règles taxonomiques chez les insectes (Opinel, 2008). Il publie en 1832 un système taxonomique suffisamment souple pour introduire un nombre croissant de genres et d'espèces. Il crée avec Jean-Victor Audoin (1797-1841) qui lui succédera en 1833, la Société Entomologique de France en 1832. Cette société rassemble autour du MNHN les entomologistes isolés et les associations naturalistes et entomologiques locales. Avec le lancement de son journal, le *Bulletin de la Société Entomologique de France*, l'objectif est la diffusion de la connaissance entomologique auprès d'un large public<sup>4</sup>. Il s'en suit un intérêt grandissant pour « l'histoire naturelle médicale » qui commence à être enseignée dans les facultés de médecine et de pharmacie. En France, l'étude des arthropodes et notamment des moustiques vecteurs commence après les années 1890 (Opinel, 2008) et le terme d'entomologie médicale est utilisé pour la première fois en France vers 1910. Le premier traité sur les Diptères est « Nouvelle classification des Mouches à deux ailes, (Diptera L.), d'après un plan tout nouveau » publié en 1800 par le diptériste Allemand Johann Wilhelm Meigen (1764-1845).

La première description d'espèce de petits moucheron piqueurs est celle de *Culicoides pulicaris* (= *Culex pulicaris*) réalisée par Linné en 1758. Le genre *Culicoides* est décrit plus tard par Latreille en 1809 avec comme espèce type *C. punctatus* (Meigen) (= *Ceratopogon punctatus*)<sup>5</sup>. Après la description de Linné, cinq autres espèces sont décrites par Meigen entre 1804 et 1830. En région Paléarctique, l'entomologiste danois Rasmus Carl Staeger (1800-1875) et le diptériste allemand Johann Winnertz (1800-1896) publient de nombreuses

---

<sup>4</sup> Voir Opinel (2008) pour l'histoire détaillée de l'émergence de l'Entomologie médicale en France.

<sup>5</sup> Par conséquent, toutes les espèces décrites sous des genres tels que *Culex* ou *Ceratopogon* et qui sont à présent nommées sous le genre *Culicoides*, sont notées en mettant auteur et date de description entre parenthèses pour signifier le changement de genre par rapport à la description originale.

descriptions. *Culicoides nocivum* est la première espèce décrite pour la région Néarctique par l'entomologiste et botaniste américain Thaddeus William Harris (1795-1856). Le diptériste américain Daniel William Coquillett (1856-1911) contribue largement à la description de la faune culicoïdienne dans cette région. Plus au sud en région Néotropicale, le zoologiste cubain Felipe Poey (1799-1891) décrit en 1853, *C. furens* (= *Oecacta furens*), espèce agressive et nuisante pour l'homme. Il faudra ensuite attendre 43 ans pour que l'enseignant, paléontologue et diptériste américain Samuel Wendell Williston (1852-1918) contribue à l'inventaire de la faune culicoïdienne de cette région.

*Culicoides shultzei* et *C. herero* sont décrites en 1908 en Namibie par l'entomologiste allemand Günther Enderlein (1872-1968). Elles sont les premières espèces de *Culicoides* décrites pour la faune de la région Ethiopienne. L'année suivante c'est l'entomologiste britannique Ernest Edouard Austen (1867-1938) qui découvre la faune du Ghana, du Kenya et de l'Ouganda. La première espèce décrite pour la région Orientale est *C. guttifer* en 1907 par le diptériste allemand Johannes Cornelis Hendrik de Meijere (1866-1947). A partir de 1910, l'abbé Jean-Jacques Kieffer (1857-1925), naturaliste français, entreprend de décrire la diversité des *Culicoides* d'Inde. Kieffer a reçu le titre honorifique de Docteur *honoris causa* de l'Université de Strasbourg en 1904 pour son importante contribution aux apocrites, culicoïdes et moustiques.

Si l'on considère la contribution à la description de la diversité du genre *Culicoides*, trois grands entomologistes se détachent : William Wagner Wirth (1916-1994) ayant décrit 266 espèces pour le seul genre *Culicoides*, Tokunaga avec 66 espèces et Kieffer avec 65 espèces<sup>6</sup>. Wirth avec ses collaborateurs a décrit plus de 20% de la faune actuelle mondiale des *Culicoides*.

La description des espèces du genre *Culicoides* ne démarre qu'à partir de 1900 (Figure 1). Avant le début du siècle, on compte 22 espèces de *Culicoides* décrites dont la quasi-intégralité est décrite en région Paléarctique.

---

<sup>6</sup> Ne sont comptabilisées dans ce chapitre uniquement les espèces valides, celles placées en synonymie sont exclues des comptes et graphiques.

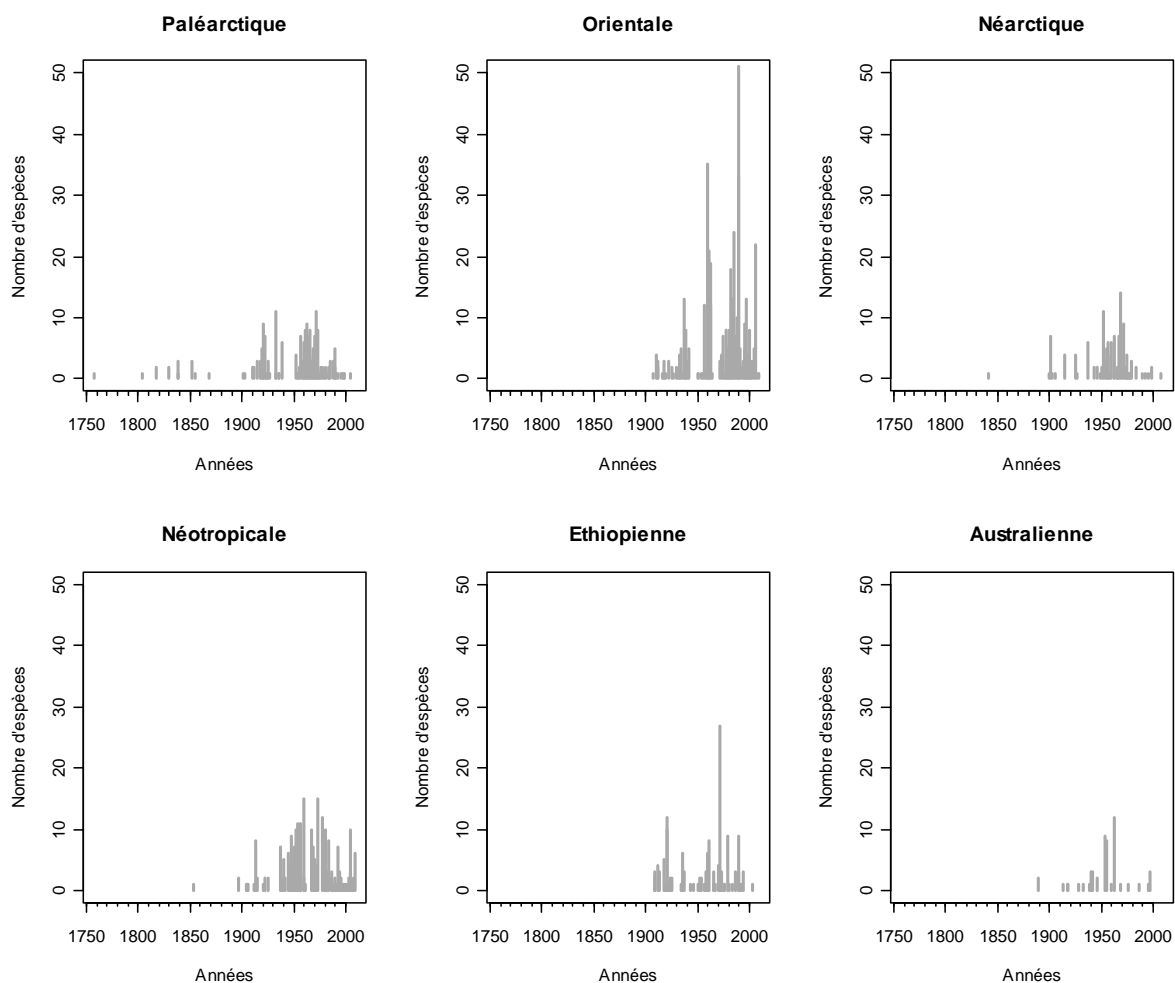


Figure 1 : Nombre d'espèces du genre *Culicoides* décrites au cours du temps (jusqu'en 2009) par région biogéographique<sup>7</sup> depuis la première description en 1758. L'ensemble des espèces décrites valides et synonymes est comptabilisé selon leurs auteurs, dates de descriptions et région biogéographiques, basé sur le catalogue des *Culicoides* du monde dressé et maintenu à jour par Art Borkent (Borkent, 2009).

Les descriptions en région Paléarctique avant 1900 sont essentiellement issues des travaux de Meigen et de Winnertz, puis d'Arnaud, Callot, Dzharfarov, Kremer, Gutzevich, Glukhova, Remm, pour ne citer que les plus importants. Le très grand nombre de descriptions en 1989 s'explique par la parution du monographe de Wirth et Hubert (1989) sur les *Culicoides* du sud-est asiatique. Le regain d'intérêt pour la taxonomie du genre *Culicoides* observé autour des années 50 dans toutes les régions biogéographiques tient à la découverte du rôle de certaines espèces dans la transmission de pathogènes.

<sup>7</sup> Dans cette thèse est utilisé le découpage en six régions biogéographiques selon Wallace (1876) : Paléarctique, Ethiopienne, Orientale, Australienne, Néotropicale et Néarctique.

## 2. Diversité actuelle, morphologie et écologie

### Diversité actuelle

Entre 1758 et 2009, 1634 espèces ont été décrites (Borkent, 2011). Parmi elles, 324 sont depuis tombées en synonymie. A ce jour, il existe donc 1310 espèces valides, auxquelles s'ajoutent des espèces fossiles décrites dans le sous-genre *Culicoides* et datées du Crétacé supérieur (environ entre 65 et 100 Ma) (Borkent, 2011).

### Morphologie

*La morphologie et la nomenclature utilisée sont détaillées dans l'annexe 1.*

Ces petits moucherons hématophages d'environ 1,5 mm présentent pour la majorité des espèces des ailes tachetées (Figure 2).



Figure 2: Photographie de *Culicoides subfagineus* (source : Bruno Mathieu, EID Méditerranée, 2007)

La forme, la disposition (ou l'absence) de ces taches alaires apportent de précieuses informations pour la détermination des espèces. Leurs yeux soudés ou séparés, peuvent être pubescents ou nus. La forme des palpes maxillaires et de leurs fossettes sensorielles sont des parties importantes à observer. Une partie anatomique incontournable pour identifier les espèces est l'antenne, et notamment les longueurs et rapport d'articles ainsi que le nombre, la forme et la répartition des sensilles antennaires. Observée à l'état frais plutôt qu'en alcool, l'ornementation du thorax peut apporter des informations non négligeables pour la diagnose. La coloration et l'ornementation des pattes peuvent avoir un intérêt dans certains cas. Au niveau de l'abdomen, seuls les derniers segments sont utilisés car ils portent les structures génitales mâles et femelles dont l'observation est essentielle pour la diagnose spécifique.

## Ecologie

Au cours de leur vie, les *Culicoides* passent par 6 stades immatures (l'œuf, 4 stades larvaires et 1 stade nymphal) et un stade adulte (Figure 3).

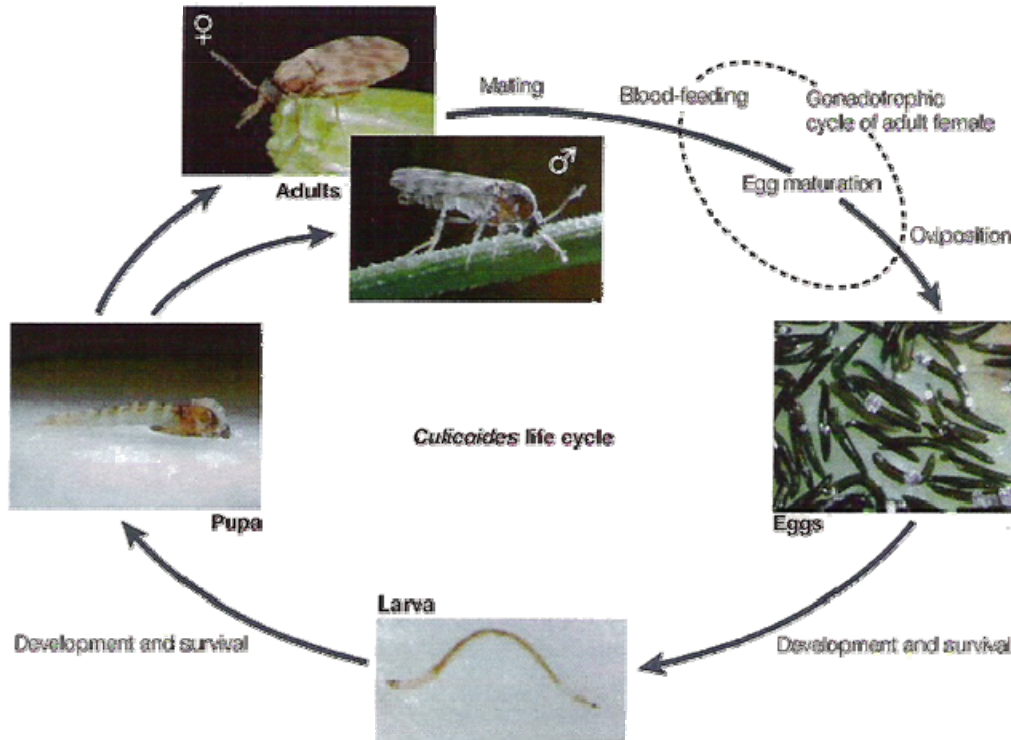


Figure 3 : Cycle de vie des insectes du genre *Culicoides* (d'après Purse *et al.* (2005)).

Les œufs sont déposés au sol par les femelles lors de la ponte. Les larves sont apneustiques et mobiles, et sont enfouies dans les premiers centimètres de substrats humides. Les gîtes larvaires sont extrêmement variés en fonction des espèces, ils peuvent être des: bords de marre, étangs, trous d'arbres, creux de rocher, fruits en décomposition, tourbières, bouses de vaches. A l'issue du quatrième stade larvaire, la nymphe, quant à elle, est quasiment immobile et munie de corne respiratoire. Respirant l'oxygène atmosphérique, les nymphes se situent en surface du gîte et sont ainsi très vulnérables à la prédation. De ce dernier stade immature, le moucheron hématophage adulte mâle ou femelle émerge. L'accouplement se fait en vol lors d'un essaim nuptial, au cours duquel les femelles stockent les spermatophores des mâles dans une à trois spermathèques (suivant les espèces). Après l'accouplement, les femelles vont rechercher un hôte pour prendre un repas de sang nécessaire pour la maturation des œufs. Après la ponte, les femelles cherchent un nouveau repas de sang et n'ont pas besoin de s'accoupler à nouveau, le stockage des spermatophores dans les spermathèques étant suffisant pour toute la durée de leur vie.

### 3. Etats des lieux des clés d'identification

#### Encadré n°1 : Les types de clés d'identification

##### Théorie et réalité de l'identification

En théorie, pour être identifié avec précision, un spécimen doit être comparé aux spécimens types (holotypes, allotypes...) désignés par l'auteur de l'espèce ou à la description originale de cette espèce. En pratique, les types sont éparpillés dans divers musées ou laboratoires et il est souvent difficile de les localiser et donc d'y accéder. Comme nous l'avons vu au début du chapitre, les descriptions d'espèces peuvent être très anciennes et l'accès à cette littérature est loin d'être aisée. Certaines descriptions sont dans la langue maternelle de l'auteur ce qui complique aussi l'accessibilité et la diffusion des informations. Enfin, dans le cadre d'études écologiques ou biologiques avec un grand nombre d'individus à identifier, l'identification par comparaison des caractères morphologiques au type ou à la description originale est fastidieuse et peu réalisable.

##### Clés d'identification à accès simple

Les premières clés dichotomiques sont des clés à accès simple et sont aujourd'hui les plus répandues. Une des premières clés développée fut celle de Lamarck lorsqu'il publia une *Flore française* en 1778. Le principe repose sur une succession d'alternatives d'états de caractères, organisées en séquences ordonnées. Chaque option de l'alternative conduit à une autre alternative et ainsi de suite jusqu'à l'aboutissement d'un nom d'espèce. Un exemple montrant la structure d'une clé dichotomique est donné pour les *Culicoides* (Figure 4).



1 - Lamelle sans processus ou à processus réduits à un simple allongement des coins de la lamelle . . . . .	2
- Lamelle présentant des processus. Ces processus pouvant être petits mais toujours bien individualisés . . . . .	5
2 - Processus rudimentaires formés par un allongement des coins de la lamelle (fig. 316-318). Aedeagus en forme de coiffe hollandaise. Membrane nue . . . . .	<i>C. chioplerus</i> (Mg.)
- Lamelle sans aucun processus . . . . .	3
3 - Sternite fendu en deux parties totalement séparées l'une de l'autre (fig. 325) . . . . .	<i>C. scolicus</i> D. et K.
- Fente du sternite incomplète . . . . .	4
4 - Sternite échancré largement. Membrane épaissie entre les bras de l'aedeagus sur presque toute leur longueur, bord antérieur de cette membrane formant généralement une barre transversale épaissie entre l'origine des bras. Membrane spiculée (fig. 322) . . . . .	<i>C. dewulfi</i> Gr.
- Sternite fendu par une fente étroite, non complète, bordée par des lobes. Pas de membrane épaissie entre les bras de l'aedeagus. Membrane nue (fig. 300 et 301) . . . . .	<i>C. obsoletus</i> (Mg.)
5 - Paramères soudés en leur milieu ou par toute leur partie proximale . . . . .	6
- Paramères non soudés . . . . .	11

Figure 4 : Extrait d'une clé dichotomique pour les mâles *Culicoides* (Kremer, 1965)

L'utilisateur doit suivre strictement l'ordre des alternatives proposées et ne peut pas emprunter de raccourci par exemple dans le cas où une partie anatomique du spécimen est manquante ou s'il est en limite de sa connaissance morphologique de l'insecte. Les choix étant exclusifs, la rédaction doit être précise et inclure l'ensemble des possibilités d'états morphologiques. Dans la négative, l'utilisateur ne peut pas faire de choix et l'identification ne peut aboutir. La qualité d'une clé est clairement dépendante du degré d'expertise de l'auteur qui l'a rédigée (Hagedorn *et al.*, 2010).

Dans le cas où une clé propose une alternative à plus de deux options, elle est qualifiée de clé polytomique<sup>8</sup>. Mais même dans ce cas, cela reste une clé à accès simple *i.e.* l'utilisateur doit suivre les séquences ordonnées des caractères et n'a donc toujours qu'une seule voie d'entrée dans la clé. Ces clés sont parfaitement adaptées à un format papier qui est très pratique pour un usage sur le terrain.

### Clés d'identification à accès libre

Contrairement aux clés d'identification à accès simple, les clés d'identification à accès libre ne sont pas organisées en séquences ordonnées. Dès le début de l'identification, l'ensemble des caractères sont disponibles et l'utilisateur est alors libre de choisir celui qu'il veut. Si cette

<sup>8</sup> Le terme d'*alternative* devient alors inadapté, par la suite il est remplacé par *caractère* qui devient plus pratique pour à compréhension.

liberté semble au premier abord un avantage important, elle peut rapidement devenir un inconvénient si la liste proposée comporte un grand nombre de caractères. Notamment, les utilisateurs débutants avec peu d'expérience auront du mal à faire un choix parmi les caractères proposés. Les clés d'identification multi-accès, variante des clés à accès libre, limitent le nombre de caractères présents dans la liste disponible au début de l'identification à un sous-échantillon de caractères. Au fur et à mesure de l'identification, la liste sera enrichie par d'autres caractères.

Au cours de la dernière décennie, le développement des systèmes assistés par ordinateur à aider au développement des clés multi-accès. C'est notamment le cas en entomologie médicale où des clés assistées par ordinateur ont vu le jour dans trois grands groupes d'intérêt médical : les phlébotomes (Vignes-Lebbe et Gallut, 1997), les moustiques (Hervy *et al.*, 1998; Schaffner *et al.*, 2001), et les glossines (Brunhes *et al.*, 2009).

De nombreuses études locales ou régionales ont proposé des clés d'identification permettant la diagnose des espèces signalées dans des zones géographiques limitées. Sont cités ici uniquement les clés les plus importantes en termes de nombre d'espèces traitées et de l'étendue de la zone géographique étudiée. Il est intéressant de noter qu'il existe pour le genre *Culicoides* des atlas de photos d'ailes (Dyce *et al.*, 2007; Wirth *et al.*, 1988). Néanmoins, ils ne sont pas organisés et donc pas utilisables en tant que clé d'identification.

C'est en région Orientale qu'une clé comportant un grand nombre d'espèces (168) a été publiée (Wirth et Hubert, 1989). En région Néarctique, des travaux ont été réalisés généralement par état comme par exemple Wirth (1952) qui publia des descriptions et des clés dichotomiques de la famille des Ceratopogonidae de Californie (USA). Forratini (1957) publia une clé d'identification dichotomique des *Culicoides* de la région Néotropicale. En ce qui concerne la région Est Paléarctique, Glukhova (2005) publia la plus récente clé dichotomique de la Russie et des pays adjacents. Pour la partie Ouest Paléarctique, les clés dichotomiques de Campbell et Pelham-Clinton (1960) et de Kremer (1965) restent à ce jour les travaux les plus complets. Le travail de thèse de Delécolle (1985) propose une forme révisée de celle de Kremer (1965) mais limitée à la faune du Nord-est de la France.

Toutes les clés dichotomiques disponibles pour le genre *Culicoides* sont remarquables mais, n'ont pas été mises à jour avec les espèces nouvellement signalées et de celles tombées en synonymie. De plus, ces clés ne sont pas adaptées pour un débutant en taxonomie. Pour un débutant, le jargon taxonomique utilisé est peu encourageant et une clé non illustrée écrite

dans un style télégraphique riche en abréviation taxonomique semble inaccessible. Ecrites par des experts, les clés n'étaient comprises que par des experts. Aucune clé interactive basée sur le principe d'une clé multi-accès n'existe à ce jour pour les espèces du genre *Culicoides*<sup>9</sup>.

---

<sup>9</sup> ni même au sein des autres genres de la famille des Ceratopogonidae.

*« ...the successful transmission of blue-tongue by the bites of Culicoides, which had been stored for 10 days and fed during this period upon sugar solution and fruit juices only with no access to blood, may be of significance. » (Du Toit, 1944)*

## Chapitre 2 : Le rôle vecteur des *Culicoides*

Dans ce chapitre, nous abordons l'aspect nuisant des *Culicoides* (encadré n°2) avant de nous consacrer à leur rôle vecteur, qui intéresse plus particulièrement ces travaux. Le **paragraphe 1** retrace l'histoire de la découverte de leur rôle vecteur. Leur implication dans la transmission des pathogènes est exposé et mis en perspective par rapport à la pathogénicité induite chez l'hôte (**paragraphe 2**). L'actualité de la crise sanitaire de la fièvre catarrhale ovine (FCO) permettra de mettre en avant les vecteurs appartenant au sous-genre *Avaritia* impliqués dans cette épizootie (**paragraphe 3**). Le dernier paragraphe de ce chapitre sera l'état des lieux des outils morphologiques et moléculaires disponibles à ce jour pour identifier les vecteurs (**paragraphe 4**).

### 1. Découverte

Avant de découvrir leur rôle dans la transmission de pathogènes, les *Culicoides* ont reçu l'intérêt des scientifiques en tant qu'insectes nuisants pour l'Homme (voir encadré n°2).

#### Encadré n°2 : La nuisance

Bien avant la découverte du rôle vecteur par Du Toit, les *Culicoides* ont été décrits comme insectes nuisants. En effet, avant même la première description d'espèce, le Révérent William Derham, recteur d'Upminster dans le Comté d'Essex (Royaume-Uni) décrit en 1713 leurs comportements de piqueurs (Mellor *et al.*, 2000). L'espèce en question est *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, qui sera décrite en 1920. Ce n'est qu'en 1945 qu'un comité est mis en place par le Département de la Santé d'Ecosse pour étudier la nature du problème et tenter d'y remédier (Kettle, 1952). Ce comité préconise dans un premier temps l'usage de protection individuelle et de répulsifs. Des essais larvicides seront menés quelques années plus tard (Kettle et Parish, 1957) mais à ce jour aucune solution efficace n'a été trouvée. Plus récemment, certains auteurs ont même déclaré la lutte inefficace, les répulsifs restant la première ligne de défense contre *C. impunctatus* (Blackwell *et al.*, 2004). D'autres espèces sont connues pour être des sources de nuisance comme par exemple *C. furens* (Poey) en Floride et *C. belkini* Wirth and Arnaud en Polynésie française.

## Du pathogène vers le vecteur

La FCO a été observée pour la première fois, en 1881 en Afrique du Sud sur un troupeau de moutons de race mérinos par Hutcheon, vétérinaire en chef à Captown, ((Hutcheon, 1881) cité dans (Cox, 1954)). C'est également Hutcheon (1902) qui fait la première description de la maladie décrite d'abord sous le terme *fever or epizootic catarrh* puis sous le nom de *Malarial catarrhal fever of sheep*. Les signes cliniques sont bien décrits et la maladie est reconnue comme non contagieuse mais pouvant être transmise par injection intraveineuse ou sous-cutanée à partir d'une faible dose de sang infecté. Expérimentalement, le Dr James Spruell, un autre vétérinaire de son équipe, montre qu'une légère réaction fébrile peut être obtenue par injection d'une forte dose de sang infecté chez de jeunes chèvres et des lapins (Hutcheon, 1902). Ce dernier, découvre également le rôle de réservoir de la chèvre lors de la contamination d'un mouton cliniquement atteint suite à l'injection de sang provenant d'une chèvre qui avait elle-même été précédemment inoculée par du sang infecté. L'assistant de bactériologie William Robertson, après 18 mois de recherches sur l'agent pathogène de la FCO, conclut à une origine « micro-parasite » de l'agent par l'observation d'un petit parasite ou « plasmodium » intra-hématocytaire dont il observerait des formes libres dans le sang. Il est conclu que la FCO est inoculée par des « parasites de peau » et, qu'il existe certainement des conditions favorables et défavorables à son développement et à sa diffusion. Toujours à cette époque, Hutcheon remarque que les conditions d'apparition de la FCO sont similaires à celles qui favorisent l'apparition de la peste équine (PE) ou *African Horse Sickness*. L'existence d'un lien entre la transmission de la FCO et de la PE est donc déjà établi en 1902. L'origine virale de la maladie connue alors sous le nom de *bluetongue* ainsi que des espèces hôtes sensibles ont été décrites par Theiler (1906). Selon Hutcheon, Spreull et Theiler, la FCO se développerait chez les moutons pendant la nuit lors de « rosées abondantes ». Ils remarquent que l'incidence de la FCO est plus faible en saison sèche. Ils constatent que généralement la FCO est limitée aux vallées et plaines, et rarement rencontrée en altitude. Ils précisent que l'élévation locale par rapport au niveau de la mer confère une certaine immunité. Les moutons gardés dans les bâtiments d'élevage avant le coucher du soleil jusqu'au matin, sont rarement affectés. Hutcheon constate que la baignade des moutons stoppe la diffusion de la maladie au sein du troupeau où la maladie était cliniquement présente. Il en conclut que la baignade des moutons avec du désinfectant aurait, soit détruit le « parasite de peau » qui transmet la FCO, soit rendu la toison et la peau répulsive à un « parasite ailé tel qu'un moustique qui, dans ce cas, pourrait être « *the inoculating medium* ».

L'hypothèse d'une transmission à caractère vectoriel de la FCO est alors née. Il faudra toutefois attendre plus de trente ans pour en identifier les vecteurs.

Réalisée au cours de l'été 1931-1932, Nieschultz *et al.* (1934) publie la première étude expérimentale permettant d'identifier le ou les vecteurs de la FCO et de la PE. Ils établissent que la FCO et la PE sont 2 maladies étroitement liées. Les éléments qu'ils reconnaissent comme communs entre ces deux maladies sont : l'aspect non contagieux, leur saisonnalité et distribution géographique, l'importance de la pluviométrie au moment des premiers signes cliniques, leur occurrence en zone marécageuse, leur absence au sommet des collines, les facteurs favorisant leur développement (mise au pâturage durant la nuit, en fin d'après-midi ou aux premières heures du jour) et enfin les facteurs limitant la propagation (la présence des animaux en étables). Considérant toutes ces informations, ils leur semblent « très probable » que la PE et la FCO soient « [si elles sont] transmises exclusivement par des insectes, qu'elles le soient par la même espèce ou par des espèces très proches ». Au cours de cette étude, les auteurs orientés plutôt vers les moustiques, pensent que les espèces du genre *Aedes* (Diptera : Culicidae) sont les vecteurs les plus probables.

### Une transmission biologique démontrée

L'entomologiste René Michel Du Toit (1904-1988) réalise deux types d'expériences dans les années 1941-1942. La première a consisté à broyer des *Culicoides* collectés sur le terrain notamment à l'aide de pièges lumineux, et à injecter ce broyat d'insectes par voie intraveineuse à trois moutons. Sur les trois moutons testés, tous ont développé des signes cliniques caractéristiques de la FCO avec un cas fatal. La seconde expérience visait à gorgier des *Culicoides* sur des moutons et des chevaux, et après 10 jours d'incubation, à proposer ces mêmes *Culicoides* à des hôtes sains. Malgré le faible nombre de *Culicoides* gorgés sur ces hôtes sains (2), un mouton déclare des signes cliniques de FCO, mais les chevaux restent indemnes. Les deux spécimens appartenant au genre *Culicoides* sont identifiés comme étant *C. imicola* (= *C. pallidipennis*). La transmission biologique est alors démontrée pour la première fois.

Le piège lumineux utilisé par Du Toit, est une version modifiée du piège lumineux *New Jersey*. Le fonctionnement de ce piège présentant des modifications intéressantes pour la collecte et le maintien en vie des *Culicoides* est détaillé en **annexe 2**.

## 2. Rôle dans la transmission

Les *Culicoides* sont impliqués, à ce jour, dans la transmission, de façon certaine ou de façon suspectée, de 65 virus, de 15 espèces de protozoaires et de 25 espèces de filaires (Borkent, 2005). Sont cités ici uniquement les pathogènes importants pour leur virulence et/ou leur large distribution.

En santé publique, certaines espèces de *Culicoides* transmettent deux filaires bénignes pour l'homme *Dipetalonema perstans* en Afrique et Amérique tropicale et *D. streptocerca* en Afrique (Golvan, 1983). En santé animale, *Onchocerca cervicalis* et *O. gutturosa*, deux filaires à distribution mondiale, provoquent des pathologies discrètes chez les chevaux et les bovins respectivement (Linley, 1985). La principale implication des *Culicoides* dans la transmission de protozoaires concerne la transmission d'hémosporidies aux oiseaux. Récemment, une étude a montré des relations spécifiques et généralistes entre les hémosporidies du genre *Haemoproteus* et les *Culicoides*, ainsi qu'une coévolution entre certains haplotypes et *C. festivipennis* et *C. kibunensis* (Martinez-de la Puente *et al.*, 2011).

L'implication des *Culicoides* dans la transmission de virus reste de loin la plus importante par le nombre de virus transmis et par l'impact économique et sanitaire engendré. En santé publique, le virus Oropouche (Bunyaviridae, genre *Orthobunyavirus*) est une encéphalite transmise par *C. paraensis* (Pinheiro *et al.*, 1981a). La circulation virale est restreinte à l'Amérique du Sud et centrale. Les premières épidémies connues ont eu lieu au Brésil entre 1961 et 1978 (Pinheiro *et al.*, 1981b), et depuis un demi-siècle, 500 000 cas ont été comptabilisés aux Amériques (Azevedo *et al.*, 2007). Ces deux dernières années, des cas ont été signalés au Brésil et au Pérou (*Pro-Med mail* n° 20090808.2816 et n° 20100701.2197).

En santé animale, trois maladies sont d'importance majeure : la FCO, la PE et la maladie hémorragique des cervidés (MHC) (Maclachlan et Guthrie, 2010). Les agents pathogènes de ces trois maladies sont des virus du genre *Orbivirus* (Reoviridae). Ces trois pathologies figurent sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Organisation mondiale de la santé animale (Office International des Épizooties, OIE). La PE sévit en Afrique essentiellement. En Europe, deux incursions ont eu lieu par le passé en Espagne en 1966 et entre 1987 et 1989. C'est au cours de cette dernière épizootie que le virus a été isolé à partir de *C. imicola* (Mellor *et al.*, 1990), vecteur principal en Afrique où *C. bolitinos* présente également un rôle vecteur reconnu dans la PE (Meiswinkel et Paweska, 2003). Les incursions espagnoles, la distribution de *C. imicola* ainsi que la possibilité de transmission par d'autres espèces (Venter *et al.*, 2009) font



que le risque d'émergence de la PE en Europe est bien réel. Le virus Akabane (Bunyaviridae, genre *Orthobunyavirus*) est également d'intérêt chez les ruminants où il provoque des anomalies congénitales sur la progéniture, présent en Israël (Mellor *et al.*, 1981; Stram *et al.*, 2004) et dans le sultanat d'Oman (al-Busaidy et Mellor, 1991). La transmission biologique de ce virus Akabane par les espèces de *Culicoides* est démontrée (Jennings et Mellor, 1989). Les deux virus les plus importants en termes de nombre de foyers déclarés et de pertes économiques engendrées sont sans nul doute ceux de la PE et de la FCO.

### 3. La FCO, actualité d'une crise sanitaire

#### Généralités, distribution et importance

La FCO ou *bluetongue*, est une arbovirose des ruminants affectant principalement les ovins et plus rarement les caprins et les bovins. Les infections subcliniques sont en revanche fréquentes chez de nombreuses espèces de ruminants domestiques ou sauvages (Mellor *et al.*, 2008). L'agent pathogène est le virus bluetongue (BTV) et ses vecteurs sont des espèces du genre *Culicoides*. Il existait jusque début 2009, 24 sérotypes reconnus de BTV. Alors que la découverte d'un nouveau virus, le virus Toggenburg isolé en Suisse a eu lieu récemment, considéré désormais comme le BTV-25 (Hofmann *et al.*, 2008), un 26<sup>ème</sup> vient d'être isolé et séquencé à partir d'un mouton au Koweït portant à 26 le nombre de sérotypes de BTV (Maan *et al.*, 2011).

La déclaration obligatoire des foyers de FCO à l'OIE implique, du point de vue réglementaire, la mise en place de zone de restrictions<sup>10</sup> de 150 km autour des foyers réglementant les déplacements d'animaux et de leurs produits biologiques *i.e.* semences et ovules. Les conséquences économiques de la FCO sont des pertes directes dues à la mortalité d'animaux mais aussi en pertes indirectes engendrées par les déclassements de carcasses, la mauvaise qualité de la laine, avortements et surtout les pertes financières consécutives à la restriction des mouvements d'animaux (Lefèvre, 2003). Ces pertes ont été évaluées aux États-Unis à 125 millions de dollars annuelles (Tabachnick, 1996) et à 200 millions d'euros pour les deux années consécutives 2006 et 2007 aux Pays Bas (Velthuis *et al.*, 2010).

La FCO a une distribution mondiale (Figure 5). Jusqu'en 1998, la FCO sévissait traditionnellement dans une large bande s'étendant entre 35°S et 40°N bien que dans des

---

<sup>10</sup> Le zonage comporte 3 zones de restrictions autour d'un foyer : périmètre interdit de 20 km, zone de protection de 100 km et zone de surveillance de 150 km.

certaines zones (Nord-Ouest des USA, Chine et Kazakhstan), elle peut s'étendre jusqu'au 50°N (Mellor *et al.*, 2008). Depuis 1998, neuf sérotypes (BTV-1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 16, 25) parmi les 26 connus à ce jour ont envahi l'Europe (De Clercq *et al.*, 2009; Wilson et Mellor, 2008) et ont couvert une zone allant, pour l'axe Sud-Nord, du Sud de l'Espagne jusqu'à l'Angleterre, et d'Ouest en Est, du Portugal jusqu'à la Turquie.

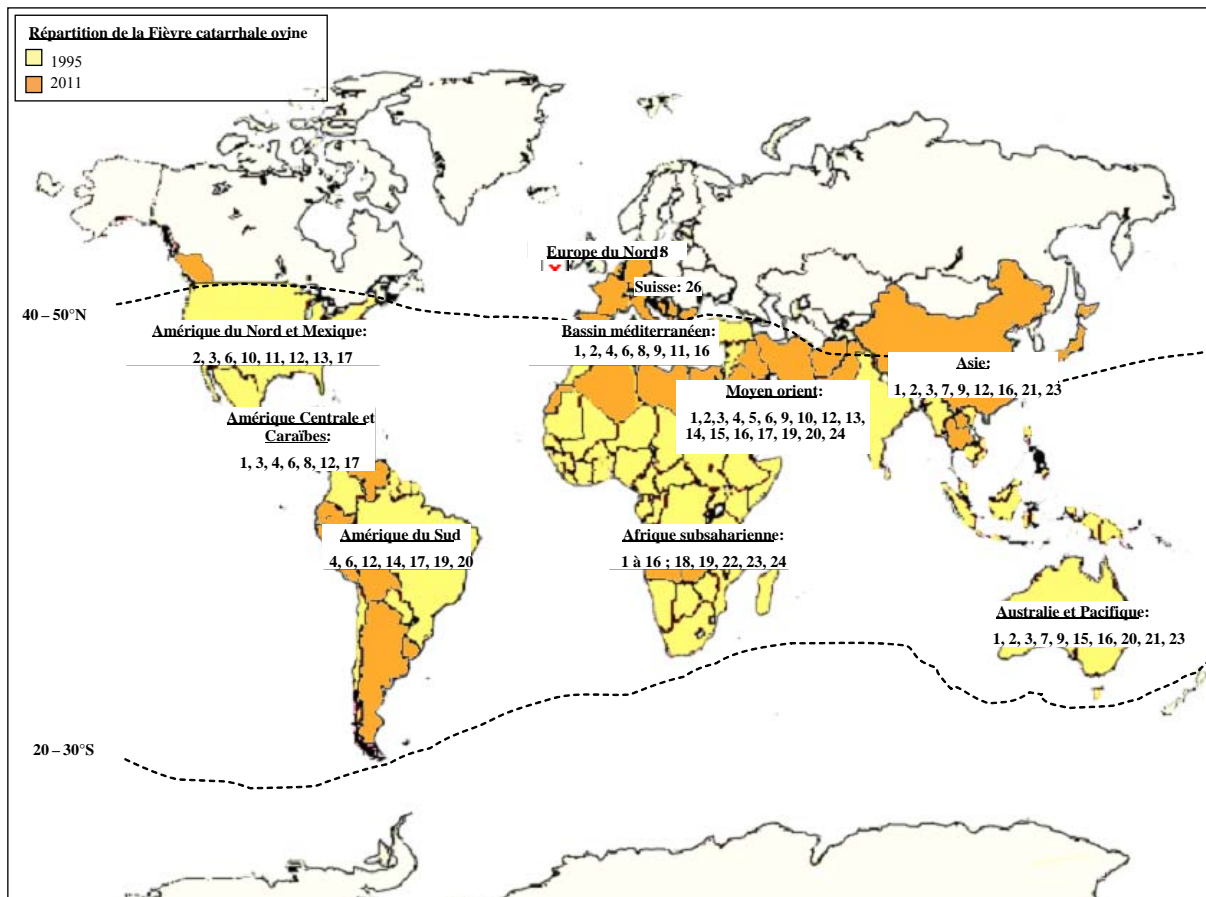


Figure 5 : Carte de répartition de la fièvre catarrhale ovine.

Les sérotypes incriminés sont précisés pour chacune des zones géographiques. Adapté de (Barber, 1979; Clavijo *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 1995; Dulac G.C. *et al.*, 1989; Dulac *et al.*, 1992; Gibbs et Greiner, 1994; Gibbs et Greiner, 1988; Lefèvre, 2003; Maan *et al.*, 2011; Sharifah *et al.*, 1995).

Le réseau d'alerte Pro-Med permet la diffusion rapide de l'information autour des maladies infectieuses et essentiellement les déclarations de foyer. Une recherche avec le mot clé « Bluetongue » en restreignant les dates de 1998 à nos jours, donne 371 références sur 43 pays différents dans le monde. Sur cette base, la liste des 32 pays touchés par la FCO depuis 1998 en Europe et sur le pourtour méditerranéen est établie<sup>11</sup> : Algérie, Allemagne, Autriche,

<sup>11</sup> En dehors de cette zone, la FCO toujours depuis 1998 a concerné : l'Argentine, l'Australie, le Brésil, le Canada, l'Inde, le Japon, la Réunion, la Corée du Sud (cas importé), le Qatar, Taiwan et les USA.



dans le Sud de l'Espagne s'est répandu largement plus au Nord pour gagner le Sud-ouest de la France.

A ce jour, les méthodes de lutte antivectorielle demeurent peu efficaces. L'amélioration des méthodes d'études sur le terrain pour la biologie, l'écologie et le comportement des vecteurs est nécessaire pour développer et évaluer des stratégies de luttes (Carpenter *et al.*, 2008b). Actuellement, seule la vaccination permet d'interrompre la transmission et demeure ainsi la meilleure méthode de lutte contre la maladie. Au niveau des mesures réglementaires, la restriction des mouvements d'animaux permet de ralentir la progression des foyers sans toutefois stopper la transmission. La campagne de vaccination et les zones réglementées (Figure 7) ont conduit à une circulation virale très ralentie actuellement. Pour redevenir en statut indemne, la surveillance sérologique d'un état membre doit prouver l'absence de circulation virale pendant 2 années consécutives.

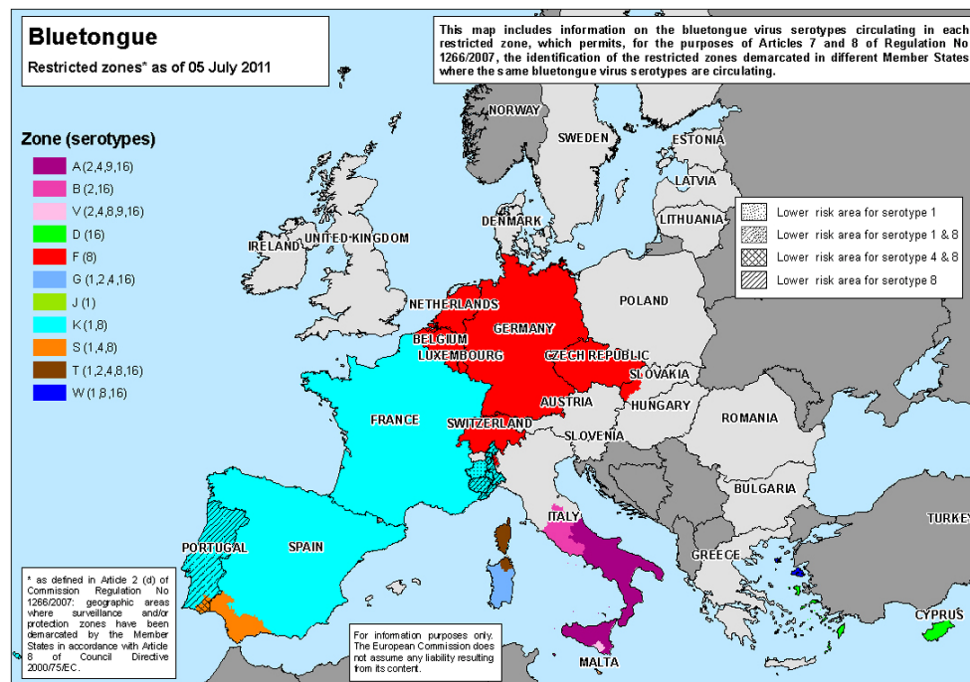


Figure 7 : Zones réglementées pour la FCO en vigueur au 5 Juillet 2011 (source : commission européenne)

La transmission entre les hôtes ruminants est réalisée quasi-exclusivement<sup>12</sup> par la pique de vecteurs hématophages appartenant tous au sous-genre *Culicoides*. Toutefois, la transmission transplacentaire a été largement étudiée ces dernières années et semble avoir été bien présente

<sup>12</sup> Le virus semble pouvoir se retrouver dans la semence de taureaux en phase virémique et la transmission transplacentaire est controversée. Roberts D. H., Lucus M. H., Bell R. A. (1992). Animal and animal product importation and assessment of risk. In: Bluetongue, African Horsesickness and Related Orbiviruses. B.I. W. T. E. O. ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 916–923., Parsonson Thompson Am J Vet res 1994.

lors de la récente épizootie BTV-8 (Menziès *et al.*, 2008; Santman-Berends *et al.*, 2010; van der Sluijs *et al.*, 2011; Zanella *et al.*, 2012) bien qu'elle ait été controversée pour d'autres sérotypes (Parsonson *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 1992). Cependant, la distribution de la FCO est limitée aux zones où les vecteurs sévissent et la transmission est limitée aux périodes de l'année où les vecteurs adultes sont actifs (Mellor *et al.*, 2000). La diffusion de la maladie pose tout naturellement la question de la distribution et de l'abondance des vecteurs dans les zones de foyers.

## Le vecteur majeur, distribution et changement climatique

### Situation jusqu'en 2006

Dans la zone Est du bassin méditerranéen, où l'émergence de la FCO a eu lieu, le vecteur majeur *C. (Avaritia) imicola*, d'origine afro-asiatique était présent en Turquie (Jennings *et al.*, 1983), sur certaines îles de Grèce, sur le continent à l'exception du Nord du pays (Mellor et Wittmann, 2002) et en Israël (Braverman *et al.*, 1976). Pour la partie Ouest de la Méditerranée, il était présent en Algérie (Szadziewski, 1984), Maroc (Bailly-Choumara et Kremer, 1970) et Egypte (Macfie, 1943). En Italie, suite à l'épizootie de 2000, la présence de *C. imicola* est mise en évidence en Sardaigne et en Sicile (Calistri *et al.*, 2003; Conte *et al.*, 2003) puis le long de la côte Ouest de l'Italie (De Liberato *et al.*, 2003). Il est ensuite signalé dans le Sud de l'Espagne et au Portugal au début des années 80 (Mellor *et al.*, 1990) et consécutivement aux foyers des années 2000, *C. imicola* est signalé aux îles Baléares (Miranda *et al.*, 2003) puis au Nord-est de l'Espagne en Catalogne (Sarto i Monteys et Saiz-Ardanaz, 2003). La France n'a pas été épargnée et les premiers *C. imicola* ont été trouvés seulement quelques jours avant les premiers foyers en 2000 (Delécolle et De La Roque, 2002). Le réseau de surveillance entomologique en France a permis la détecter la présence des premiers spécimens de *C. imicola* dans le département du Var<sup>13</sup> (Baldet *et al.*, 2005).

Les foyers de FCO identifiés en Bulgarie en 1999 sont déclarés en l'absence de *C. imicola* mais en présence d'espèces appartenant au complexe *Obsoletus* (Mellor et Wittmann, 2002). Des foyers sont également recensés dans le Nord de la Grèce et dans certaines zones de Turquie indemnes de *C. imicola* (Mellor et Wittmann, 2002). En Italie, les données entomologiques de 2001 et 2002 montrent que : *C. imicola* est présent dans seulement 30% des zones de foyers ; le vecteur majeur est faiblement abondant à l'intérieur des terres ; et en

---

<sup>13</sup> A partir de 2004, des missions de terrain mandatées par le ministère de l'agriculture et de la pêche conduites par le CIRAD, l'EID Méditerranée et l'Université de Strasbourg ont permis de mettre en évidence une population bien installée de *C. imicola* dans la vallée de l'Argens (Var, France). Pourtant à ce jour, ce département n'a jamais été touché par la FCO.

son absence, des espèces du complexe *Obsoletus* sont abondantes avec un rôle potentiel évident dans la transmission (De Liberato *et al.*, 2003)). Cette hypothèse est confortée par la découverte au même moment de spécimens sauvages appartenant au complexe *Obsoletus* infectés par les sérotypes BTV-2 et 9 en Italie continentale (Savini *et al.*, 2003). Dans les zones montagneuses de Sicile, des foyers de BTV-2 surviennent en absence de *C. imicola*, des spécimens du groupe *Pulicaris* sont infectés par ce sérotype (Caracappa *et al.*, 2003; Torina *et al.*, 2004).

Une étude de Purse *et al.* (2005) met en relation cette réémergence de le FCO avec les distributions de vecteurs et l'augmentation globale des températures, et constitue ainsi un bel exemple de transmission vectorielle liée aux changements climatiques. Cette étude suggère que les modifications du climat ont joué un rôle dans : la persistance du virus pendant l'hiver, l'expansion de l'aire géographique de *C. imicola*, ainsi que dans la transmission du virus par des espèces indigènes. Cette même étude représente sur une carte du bassin méditerranéen et de l'Europe, la mise en relation des foyers de FCO et PE jusqu'en 1998 et ceux de FCO entre 1998 et 2004, avec les distributions du vecteur avéré et des vecteurs suspectés (Figure 8) (Purse *et al.*, 2005).

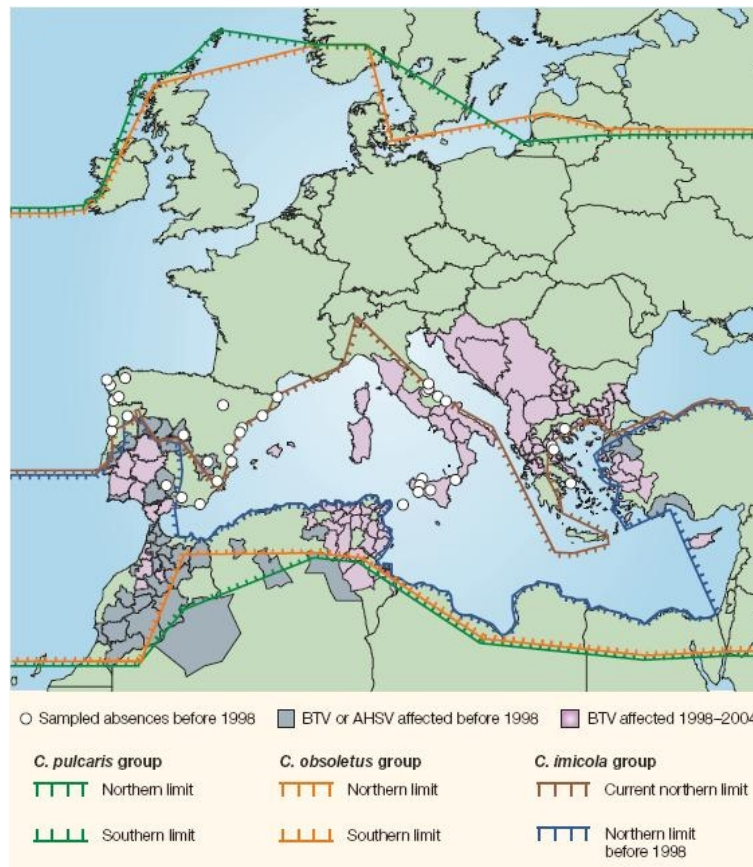


Figure 8 : Distribution des vecteurs de la FCO en Europe et dans le bassin méditerranéen (Purse *et al.*, 2005).

### Situation après 2006

Au cours de l'épizootie due au BTV-8, les espèces du complexe *Obsoletus*, *C. (A.) obsoletus* et *C. (A.) scoticus*, ont été les espèces les plus abondamment collectées dans les zones d'élevages et ces deux espèces ainsi que *C. (A.) dewulfi* présentent des comportements endophile et endophage (Baldet *et al.*, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008b). Enfin, une étude plus récente portant sur la détection de virus BTV dans les *Culicoides* capturés lors de l'épizootie dans des fermes belges a permis de détecter le virus dans 20% des lots de *Culicoides* (*C. obsoletus/C. scoticus*) testés et un lot de *C. (Culicoides) pulicaris* (Vanbinst *et al.*, 2009).

Carpenter *et al.* (2008a) montre par des infections expérimentales avec les sérotypes 8 et 9, qu'au sein du complexe *Obsoletus*, l'espèce *C. scoticus* réplique ces 2 sérotypes avec plus de 3 log<sub>10</sub> de différence comparé à l'espèce *C. obsoletus*. Récemment, Pili *et al.* (2010) ont identifié chacun des spécimens collectés à l'aide 5 marqueurs par RAPD afin de déterminer la structure génétique et l'abondance relative des espèces *C. obsoletus* et *C. scoticus*. Cette



dernière étude montre que *C. obsoletus* est moins abondant que *C. scoticus* en hiver suggérant que cette dernière espèce pourrait avoir un rôle dans le maintien du virus pendant l'hiver.

Par ailleurs, un lot de spécimens de *C. dewulfi*, a été détecté positif par RT-PCR en BTV-8 (Meiswinkel *et al.*, 2007). *Culicoides dewulfi* a été reconnu comme un vecteur potentiel du BTV-8 sur la base d'éléments supplémentaires de suspicion : ses gîtes larvaires sont les bouses de vaches et le crottin de cheval, c'est la troisième espèce la plus abondante dans les piégeages de surveillance réalisés au Pays-Bas, son taux de survie élevé (Meiswinkel *et al.*, 2008a), et son comportement endophile et endophage.

Un seul lot de 50 spécimens de *C. (A.) chiopterus* a été, lui aussi, détecté positif en BTV-8 par RT-PCR (Dijkstra *et al.*, 2008). Cette espèce est largement distribuée en Europe, et inféodée aux élevages de par ses gîtes larvaires constitués de bouses de vache (Kremer, 1965). Parmi les vecteurs probablement impliqués dans l'épizootie, elle présente la plus faible abondance ce qui la place en dernière position des vecteurs ayant pu jouer un rôle.

#### **4. Etat des lieux de l'identification des vecteurs**

Les outils morphologiques

L'identification du vecteur majeur, *C. (Avaritia) imicola* est assez aisée en Europe où elle est la seule espèce représentante du complexe d'espèces Imicola. Sa récente découverte en Europe a fait l'objet d'une redescription complète (Delécolle et De La Roque, 2002). A la loupe binoculaire, il est assez facile, avec un peu d'expérience, de la reconnaître avec précision sur la base de tâches alaires caractéristiques. Cette aile typée a été utilisée pour développer une clé d'identification simplifiée, à l'observation basée uniquement sur le profil alaire, adaptée à une utilisation en routine pour des non-experts (Rawlings, 1996). *Culicoides dewulfi* et *C. chiopterus* s'identifient aisément au microscope. Cependant, l'identification à la loupe binoculaire n'est pas aisée ce qui conduit certaines études à traiter les quatre espèces suivantes ensemble, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus* et *C. dewulfi*, ce qui peut aboutir à des résultats et conclusions hasardeuses sur leurs rôles vecteurs (Mehlhorn *et al.*, 2007). En ce qui concerne *C. obsoletus* et *C. scoticus*, alors que l'identification des mâles ne pose aucun problème, l'identification précise des femelles est controversée. La taille des spermathèques des deux espèces présente un chevauchement de valeurs (Delécolle, 1985) qui, dans le cas où un spécimen présente une morphologie intermédiaire, ne permet pas de conclure à une identification précise. Une étude associant des mesures morphologiques avec des



identifications moléculaires basées sur la région barcode, le Cytochrome oxydase c I (COI), montre que les caractères abdominaux pour séparer les femelles sont limités par une plage de valeurs communes aux deux espèces (Pagès et Sarto I Monteys, 2005). Une étude similaire tend à montrer l'inverse à savoir qu'il est possible d'identifier précisément les deux espèces par quelques mesures bien que les auteurs admettent qu'il peut y avoir de spécimens douteux pour lesquels le séquençage du COI est nécessaire (Augot *et al.*, 2010). Récemment, une étude associant l'identification morphologique et moléculaire montre qu'il est possible de discriminer les quatre espèces *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus* et *C. dewulfi* à la loupe binoculaire sur la base de l'observation de la forme du palpe et du nombre de soies du 1<sup>er</sup> tergite abdominal (Nielsen et Kristensen, 2011).

## Les outils moléculaires

L'identification moléculaire d'espèces par amplification de type PCR présentant des fragments de tailles spécifiques d'espèces s'est développée depuis une dizaine d'années chez les *Culicoides*. Une PCR spécifique de *C. imicola* par PCR a été développée et validée pour être utilisable en routine à partir de prélèvements de piégeages sans étape de pré-tri *i.e.* incluant tous types d'insectes (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004). Quelques études se sont intéressées à la détection d'espèces du groupe *Pulicaris* (Nolan *et al.*, 2007; Pagès *et al.*, 2009). La majorité des PCR spécifiques se sont focalisées sur les espèces du groupe *Obsoletus* en utilisant les techniques de PCR conventionnelles (Gomulski *et al.*, 2005; Mathieu *et al.*, 2007; Nolan *et al.*, 2007; Schwenkenbecher *et al.*, 2009b) mais aussi les techniques de PCR en temps réel (Monaco *et al.*, 2010) basées soit sur les marqueurs COI soit les marqueurs ITS. La spectrométrie de masse a été évaluée récemment sur *C. nubeculosus* et se révèle prometteuse pour l'identification des espèces du genre *Culicoides* (Kaufmann *et al.*, 2011). Une approche puce à ADN appliquée aux *Culicoides* vient de voir le jour et permettrait de traiter un grand nombre d'échantillons (Deblauwe *et al.*, 2012).



## Chapitre 3 : Le sous-genre *Avaritia* Fox, 1955

Dans ce chapitre, le sous-genre *Avaritia* est défini (*paragraphe 1*) et l'importance des espèces qui le composent et qui sont impliquées dans la transmission des virus est mise en avant (*paragraphe 2*). L'état des lieux de la systématique et de la taxonomie des espèces de sous-genre est donné par le recensement des désaccords entre spécialistes (*paragraphe 3*) et par les données des phylogénies existantes (*paragraphe 4*).

### 1. Définition morphologique

L'entomologiste et arachnologiste américain Irving Fox (1912-1992) créé en 1955 deux nouveaux sous-genres : *Macfiella*<sup>14</sup> et *Avaritia* (Fox, 1955). Ce dernier sous-genre fait l'objet de cette thèse, il est décrit par l'auteur comme suit :

« *Hypopygium* du mâle avec le 9<sup>ème</sup> tergite habituellement sans encoche médiane et absence de processus apico-latéraux ; chez une espèce (*C. chiopterus*) le bord postérieur du 9<sup>ème</sup> tergite est concave et les angles sont proéminents mais sans former de processus caractéristiques. Les paramères sont séparés ou joints basalement, les extrémités avec ou sans poils. édeages variables, quelquefois triangulaires. Marge intérieure du basistyle sans soie ; apodème ventral très long, plus long que l'apodème dorsal. Femelles très petites, 1,0-1,5mm, yeux soudés ; taches alaires à peine visible, macrotriches peu abondants, la 2<sup>ème</sup> cellule radiale habituellement dans une tache claire, mais parfois dans une tache sombre ; deux spermathèques. Type, ici désigné, *Ceratopogon obsoletus* Meigen. » (Fox, 1955)

En 1979, Blanton et Wirth complètent la définition du sous-genre en ajoutant dans un style très télégraphique (Wirth et Hubert, 1989):

« *Distribution de sensilles antennaires* généralement 3, 11-15 ; deux spermathèques plus une rudimentaire et anneau sclérifié, ovoïdes à cols courts ; *Peigne tibial* avec 5 épines ; *Génitalia* mâle avec 9<sup>ème</sup> tergite sans encoche médiane, généralement arrondie caudalement, avec processus apico-latéraux absents ou en forme de lobes arrondis à bords francs ; *basistyle* avec apodèmes ventraux et dorsaux longs et simples, subégal ; *dististyle* généralement arrondi au sommet ; *édéage* avec une haute arche basale, sommet simple ; *paramères* séparés, avec bras antéro-latéral simple, corps court et mince, soies présentes en son sommet ou nu. » (Blanton et Wirth, 1979)

---

<sup>14</sup> Le sous-genre *Macfiella* est toujours valide actuellement et regroupe depuis sa création toujours les deux seules espèces : *C. phlebotomus* (Williston) et *C. willisoni* Wirth et Blanton.

Cette description du sous-genre *Avaritia* a été complétée par Wirth et Hubert (1989). Sont reportés ci après uniquement les caractères complémentaires des descriptions précédentes.

« Antennes : avec des segments modérément allongés ; Palpes : 3<sup>ème</sup> segment du palpe généralement mince, fossette sensorielle petite et ronde, habituellement plutôt renflé, localisé à proximité du sommet du segment avec la portion au-delà de la fossette non étroite. Aile : Apex des nervures M1, M2, M3+4 et Cu1 sombre au bord de l'aile. Pattes : Peigne tibial des pattes postérieures avec 5 épines, celle la plus proche de l'éperon généralement la plus longue. Spermathèques : Présence d'un anneau sclérifié. Spermathèques ovoïdes, généralement avec un col court. Genitalia mâle : paramères courts, généralement séparés, chacun avec un bras basal modérément long s'étendant antéro-latéralement, partie médiane courte et modérément renflée, effilés distalement jusqu'à un simple filament, quelques fois avec une frange de poils au sommet. » (Wirth et Hubert, 1989)

## 2. Importance vétérinaire

Un tableau complet récemment publié des pathogènes transmis par les trois genres appartenant à la famille des Ceratopogonidae ayant un rôle vecteur, *Culicoides*, *Forcipomyia* et *Leptoconops* est actualisé et analysé pour évaluer la part que représente les espèces du sous-genre *Avaritia* dans la transmission de ces différents pathogènes (Borkent, 2005). Le tableau de Borkent (2005) liste par pathogènes, les vecteurs, les hôtes vertébrés et présente une localisation géographique de la transmission. Ces données sont alors compilées et présentées par vecteur et actualisées avec les espèces signalées comme pouvant jouer un rôle dans la transmission de la FCO depuis 2005 (Carpenter *et al.*, 2006; Carpenter *et al.*, 2008; Dijkstra *et al.*, 2008; Hoffmann *et al.*, 2009; Meiswinkel *et al.*, 2007) (Tableau I).

Tableau I : Liste des pathogènes transmis par les 16 espèces appartenant au sous-genre *Avaritia*.

	VIRUS								PROTOZOAIRES		FILAIRES	total
	alphavirus	bunyavirus	flavivirus	Nairovirus	Orbivirus	Vesiculovirus	Lyssavirus	arbovirus non-classés				
<i>C. (A.) actoni</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) bolitinos</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	3
<i>C. (A.) chiopterus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) dewulfi</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) imicola</i>	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	3
<i>C. (A.) fulvus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) grahami</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) obsoletus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2
<i>C. (A.) orientalis</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2
<i>C. (A.) pusillus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) scoticus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. (A.) tororoensis</i>	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. (A.) trifasciellus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>C. (A.) wadai</i>	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
total références s/g <i>Avaritia</i>	0	3	0	1	14	0	2	0	0	4	-	24
total références autres s/g	2	12	1	1	12	3	9	3	13	24	-	80
total	2	15	1	2	26	3	11	3	13	28	-	104

Parmi les 104 mentions de rôle dans la transmission, les espèces du sous-genre *Avaritia* représentent 24 références (25%) contre 80 pour les espèces des autres genres<sup>15</sup>. La centaine de références de vecteur, représente un total de 63 espèces de *Culicoides* correspondant à 5% de la faune mondiale qui est signalée comment pouvant jouer un rôle dans la transmission de pathogènes (le détail pour les 63 espèces vectrices est présenté en annexe 3). Parmi ces 63 espèces, le seul sous-genre *Avaritia* représente 16 espèces (correspondant à un quart des vecteurs). A ce jour, aucune espèce du sous-genre *Avaritia* n'a été mentionnée comme pouvant avoir un rôle dans la transmission de protozoaires. Seules quatre espèces du sous-genre étudié sont impliquées dans la transmission des filaires. *Culicoides grahami* a un rôle dans la transmission à l'Homme de *Dipetalonema perstans* en Afrique. Les chevaux et bovins sont affectés par les transmissions des filaires : *Onchocerca cervicalis* en Europe par *C. obsoletus*, *Onchocerca gibsoni* en Asie par *C. orientalis*, et *Onchocerca gutturosa* en

<sup>15</sup> Les termes de *mentions* et *références* signifient ici qu'une espèce peut avoir été impliquée dans plusieurs transmissions. Les nombres d'espèces que ces mentions de rôles vecteurs représentent sont donnés dans le texte.

Afrique par *C. trifasciellus*. A ce jour, les espèces *C. grahamii* et *C. trifasciellus* sont impliquées uniquement dans la transmission de filaires. Les 14 autres espèces du sous-genre *Avaritia* jouent un rôle dans la transmission de virus de la famille des *Reoviridae* appartenant au genre *Orbivirus*. Plus d'un vecteur sur deux de virus du genre *Orbivirus* sont des espèces du sous-genre *Avaritia* (Tableau I).

### 3. L'imbroglia taxonomique

*Ce paragraphe s'attache à mettre en avant les désaccords taxonomiques entre les auteurs au niveau des sous-genres et au niveau des groupes. Les études citées ici n'en demeurent pas moins d'excellentes études qui sont encore des références de taille pour la qualité des descriptions faites au niveau espèce.*

#### Du sous-genre aux groupes

Lors de la définition du sous-genre *Avaritia*, Fox incluait en 1955 les trois espèces *C. chiopterus*, *C. obsoletus* et *C. pusillus*, avec une variété de caractères morphologiques qui lui a permis de donner une définition du sous-genre assez précise. Toutefois, la plupart des auteurs de ces dernières décennies rassemblent l'ensemble des espèces appartenant au sous-genre *Avaritia* en groupes et parfois même sans assignement au sous-genre (Blanton et Wirth, 1979; Campbell et Pelham-Clinton, 1960; Glick, 1990; Khamala et Kettle, 1971; Kremer, 1965). Malgré cela, plusieurs auteurs s'accordent à dire que le sous-genre *Avaritia* apparaît comme un ensemble naturel bien défini (Boorman, 1988; Glukhova, 1977; Wirth et Hubert, 1989).

Les différentes études réalisées sur les groupes dans le but de rassembler les espèces du sous-genre *Avaritia* (Boorman, 1991; Glick, 1990; Kremer, 1965; Wirth *et al.*, 1988; Wirth et Hubert, 1989), montrent l'existence de 6 groupes principaux : Actoni, Andicola, Imicola, Obsoletus, Pusillus et Orientalis.

#### Le groupe Obsoletus

Le groupe Obsoletus comprend des espèces avec des ailes ayant des taches mal délimitées et une 2<sup>nde</sup> cellule radiale entamée par une tache claire, les mâles arborent des génitalia exubérants. D'après Kremer (1965) ce groupe est réellement homogène car il contient peu d'espèces et qu'elles sont si proches les unes des autres que pendant longtemps il fut même impossible d'en distinguer les femelles. Ce groupe comprend des espèces présentes en

région holarctique<sup>16</sup> : *C. chiopterus* et *C. obsoletus*. Récemment, au cours d'un atelier de taxonomie organisé à Strasbourg en Mars 2009 dans le cadre du programme européen MedReoNet auquel participait l'ensemble des experts internationaux, il a été cependant proposé d'exclure *C. chiopterus* et *C. dewulfi* sur la base de différences au niveau des pinces génitales, et chacune de ces espèces formerait un groupe à part. La notion de complexe, telle que définie par Meiswinkel (2004) pour désigner l'ensemble des taxa terminaux très proches, est introduite pour l'ensemble des espèces suivantes : *C. obsoletus*, *C. montanus* et *C. scoticus*.

### Le groupe Andicola

En région néotropicale, le groupe Andicola compte des espèces endémiques aux Andes décrites et présentes en haute altitude allant jusqu'à 3200 m et toutes ayant un comportement anthropophile (Rodriguez et Wirth, 1986). Récemment, une nouvelle espèce appartenant à ce groupe, *C. hermani*, a été décrite entre 1600 et 2750 m d'altitude avec également un comportement agressif envers l'Homme (Spinelli et Borkent, 2004).

### Le groupe Pusillus

Présent dans les régions néarctique et néotropicale, le groupe Pusillus ne comprend que trois d'espèces : *C. pusillus*, *C. pusilloides* et *C. impusilloides* (Wirth *et al.*, 1988). Ce groupe n'a présenté aucun désaccord entre les taxonomistes car les espèces qui le composent, présentent la particularité pour les *Avaritia* d'avoir la 2<sup>nd</sup>e cellule radiale entièrement sombre. Ces espèces possèdent également des yeux pubescents.

### Le groupe Actoni

Les espèces de ce groupe Actoni se rencontrent dans les régions éthiopienne, orientale et australienne (Wirth et Hubert, 1989). Dans la définition de ce groupe donnée par Wirth et Hubert en 1989, on peut noter comme particularités la présence d'yeux pubescents et la 2<sup>nd</sup>e cellule radiale entièrement sombre. Les mêmes auteurs signalent que le groupe Actoni est étroitement lié au groupe Pusillus et également très proche du groupe Orientalis.

---

<sup>16</sup> terme qui rassemble les régions néarctique et paléarctique.

## Les groupes Imicola et Orientalis

Les espèces de ces deux groupes sont présentes en région australienne, éthiopienne et orientale. Au sein du groupe Imicola, une seule espèce, *C. imicola*, est également présente en région paléarctique.

Khamala et Kettle (1971) précisent que la classification en sous-genre n'est pas satisfaisante pour décrire la faune éthiopienne. Il crée donc des groupes, et rassemble dans le groupe Imicola (=Pallidipennis), des espèces ayant, pour ne citer que deux caractères, les yeux pubescents ou nus, et la 2<sup>nd</sup>e cellule radiale entamée par une tâche claire ou entièrement sombre. Ainsi, *Culicoides grahamii* fait partie du groupe Imicola ou du groupe Actoni suivant que l'on considère respectivement les auteurs Khamala et Kettle (1971) ou Wirth et Hubert (1989). Glick (1990) décrit de la même façon la faune du Kenya en plaçant également l'ensemble des espèces du sous-genre *Avaritia* dans le groupe Imicola. Ce dernier auteur ne mentionne à aucun moment dans son article de 109 pages le terme d'*Avaritia*.

Avant les travaux de Meiswinkel (2004), aucune mention n'est faite d'espèces du groupe Orientalis présentes en région éthiopienne. A cette époque, le terme de « groupe Imicola » était surtout utilisé pour les espèces éthiopiennes et le terme de groupe Orientalis pour les espèces orientale et australienne. Dans la description de la faune du Sud-Est Asiatique, Wirth et Hubert (1989) classent les espèces du sous-genre *Avaritia* en deux groupes : Actoni et Orientalis.

Le groupe Orientalis selon Wirth et Hubert (1989) est clairement défini et exclut les espèces à yeux pubescents et celles ayant la 2<sup>nd</sup>e cellule radiale sombre (qui *in fine*, sont rassemblées dans le groupe Actoni). S'il est vrai que la définition est précise, il n'en demeure pas moins que le groupe Orientalis *sensu* Wirth et Hubert (1989) comprend comme espèce *C. imicola*. Une étude morphologique basée sur des spécimens d'Afrique et d'Asie comprenant 23 espèces pouvant se rapprocher de *C. imicola* ou de *C. orientalis*, a mis en évidence des caractères permettant de séparer ces espèces en deux groupes : Imicola et Orientalis (Meiswinkel, 2004).

## 4. Éléments de phylogénie

Une étude phylogénétique basée sur la région internal transcribed spacer 1 (ITS1) de l'ADN ribosomal (ADNr), a montré pour 36 espèces françaises du genre *Culicoides*, une bonne corrélation entre phylogénie, morphologie et écologie (Perrin *et al.*, 2006). Les trois



espèces du sous-genre *Avaritia* représentées dans cette étude sont regroupées dans un même clade d'espèces monophylétiques, proche du clade représentant les espèces du sous-genre *Monoculicoides* (Figure 9).

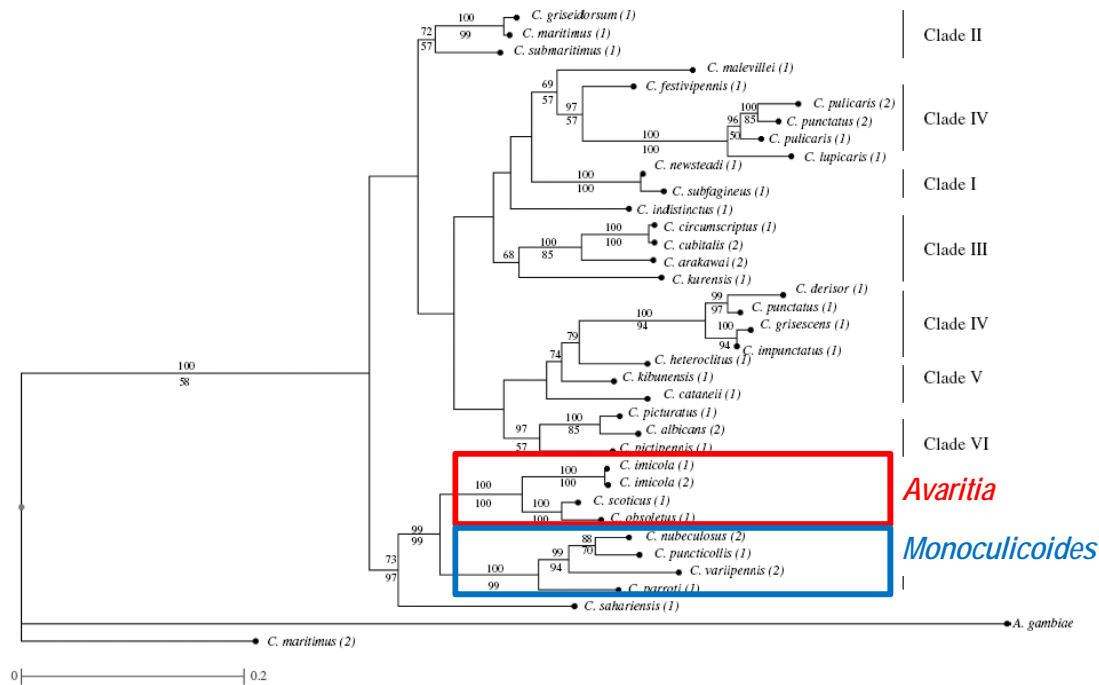


Figure 9 : Relations phylogénétiques basées sur les séquences ITS1 d'espèces du genre *Culicoides* présentes en France, adapté de (Perrin *et al.*, 2006). Les valeurs au dessus des branches correspondent aux probabilités postérieures en BI et en dessous des branches sont représentées les valeurs de *bootstraps* en ML. Les espèces appartenant aux sous-genres *Avaritia* et *Monoculicoides* sont encadrées.

Deux autres études ont investigué les relations phylogénétiques au sein du sous-genre *Avaritia* et développé des outils PCR permettant le diagnostic moléculaire de ces espèces. Basées respectivement sur les ITS1 (Mathieu *et al.*, 2007) et les ITS2 (Gomulski *et al.*, 2005), les deux études concordent pour positionner *C. dewulfi* à la fois comme l'espèce la plus proche du vecteur majeur *C. imicola*, et à la fois comme l'espèce la plus externe du groupe *Obsoletus* (Figure 10). Les deux espèces *C. obsoletus* et *C. montanus* sont très proches mais la résolution des deux études ne permet pas de clairement séparer les spécimens de ces espèces.

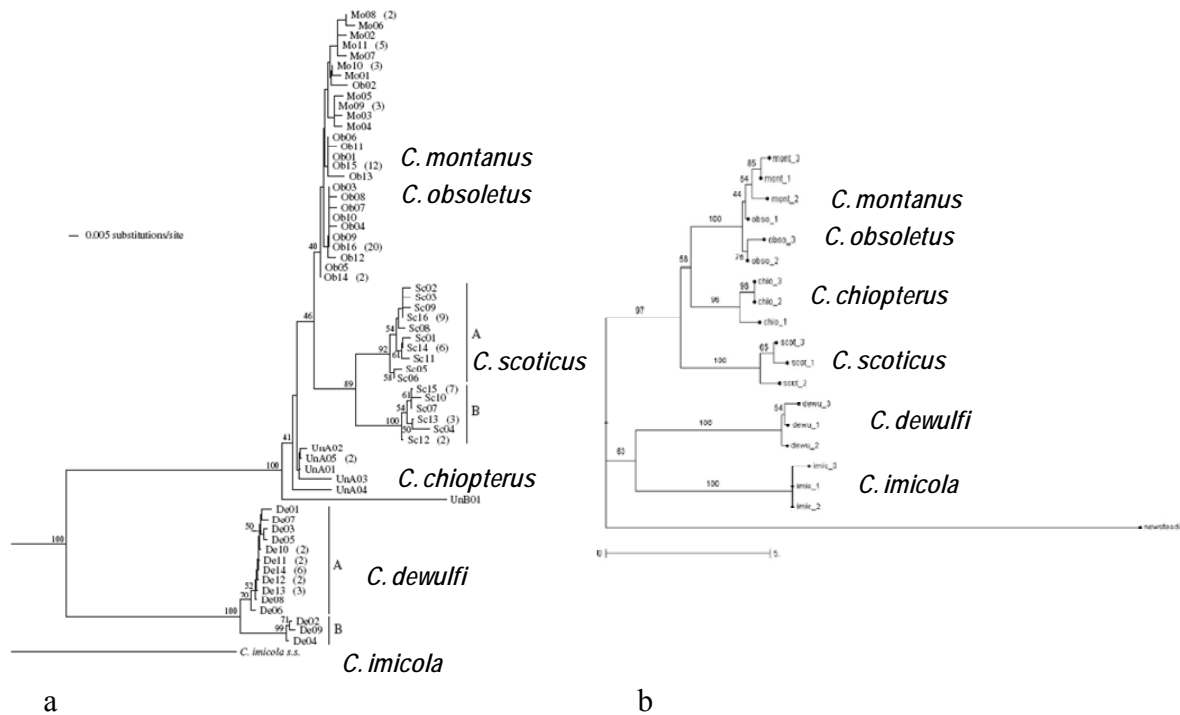


Figure 10 : Relations phylogénétiques d'espèces au sein du sous-genre *Avaritia* : a, basé sur les ITS2 (adapté de Gomulski *et al.* (2005)) et b, basé sur les ITS1 (adapté de Mathieu *et al.* (2007)). Les deux reconstructions présentées ont été réalisé en NJ et les valeurs de *bootstraps* sont données au-dessus des branches.

Basée sur le gène codant pour le cytochrome oxydase c sous-unité 1 (COI) du génome mitochondrial (ADNmt), une première étude confirme le statut d'espèces de chacune de quatre espèces proches de *C. imicola* : *C. bolitinos*, *C. kwagga*, *C. loxodontis* et *C. tuttifrutti*<sup>17</sup> (Linton *et al.*, 2002). Dallas (2003) explore la phylogénie de *C. imicola* en incluant des spécimens de quatre pays (Portugal, Rhodes, Israël et Afrique du Sud) auxquels ils ajoutent les mêmes espèces que l'étude précédente. L'ensemble des spécimens de différentes zones géographiques se regroupe dans le même clade *C. imicola*. La confirmation de la position phylogénétique de *C. tuttifrutti* sert de base à sa description en tant qu'espèce nouvelle (Meiswinkel et Linton, 2003). La morphologie de *C. kwagga* reste à ce jour non décrite.

Récemment, des études du polymorphisme des régions ITS1 et ITS2 (ADNr) (Matsumoto *et al.*, 2009a) et des régions COI et COII (ADNmt) (Matsumoto *et al.*, 2009b) comprenant sept espèces

<sup>17</sup> *Culicoides tuttifrutti* et *C. kwagga* sont dans cette étude mentionnée en tant qu'espèces provisoires *i.e.* non encore décrites

du sous-genre *Avaritia*, ainsi que des espèces d'autres genres, n'ont pas permis d'élucider un schéma phylogénétique du sous-genre qui intéresse la présente thèse.



# Cadre et objectifs

## Problématique

L'état des connaissances a permis de mettre en évidence que la classification systématique actuelle du genre *Culicoides* et des catégories subgénériques varie d'une région à l'autre puisqu'elle repose essentiellement sur les ressemblances morphologiques de la faune locale, bien souvent à partir d'observations d'un seul taxonomiste. Ce ne sont pas les qualités d'observations des experts qui font défaut, mais les limites inhérentes aux critères anatomomorphologiques à la base de l'alpha-taxonomie. Cette thèse participe à la révision systématique et taxonomique du genre *Culicoides* dans un cadre intégratif et évolutif. L'ancienneté des clés d'identification disponibles et le manque d'actualisation en relation avec les synonymies décrites et les espèces nouvellement publiées font défaut et constituent un challenge pour le maintien des compétences taxonomiques et de l'expertise pour ce groupe d'arthropode d'intérêt. De plus, le genre *Culicoides* est un bel exemple des limites de l'identification morphologique. Les membres d'un complexe d'espèces sont, par définition, difficiles voire impossibles à identifier. Par conséquent, l'identification précise en routine de chacune des espèces constitue un élément clé dans l'acquisition de données d'abondance et de distribution dans un contexte plus général de compréhension de la diffusion de la FCO par des espèces démontrées comme vecteurs.

La stratégie de ce travail consiste à confronter les classifications actuelles basées sur des ressemblances morphologiques à une nouvelle proposition de classification systématique basée sur des approches moléculaires à partir d'une représentation mondiale de la diversité, et d'utiliser cette représentation de la diversité pour développer de nouveaux outils d'identification ou les mettre à jour. Dans ce cadre, le sous-genre *Avaritia* est un modèle de choix car : (i) il regroupe une très grande majorité d'espèces vectrices ou suspectées d'être impliquées dans la transmission de virus du genre *Orbivirus*, (ii) il semble être un groupe monophylétique avec toutefois une validité à confirmer / démontrer avec des marqueurs moléculaires, (iii) les délimitations des groupes ou des complexes d'espèces ne sont pas uniformisés entre les auteurs, et (iv) enfin, il existe des complexes d'espèces jumelles / polytypiques dont le statut reste à clarifier.

## Objectif général

Ce travail de thèse propose une révision systématique et taxonomique des espèces appartenant au sous-genre *Avaritia* à l'échelle mondiale en respectant un cadre évolutif.

## Objectifs spécifiques et structure de cette thèse

Afin d'actualiser la liste des espèces appartenant au sous-genre *Avaritia* ainsi que la répartition géographique au niveau mondial de ces espèces, un échantillonnage des différentes espèces du sous-genre ou suspectées comme appartenir au sous-genre a été réalisé à partir de collectes *in situ* par des collègues et/ou des experts internationaux (**chapitre 4**).

Les études phylogénétiques récentes sur le sous-genre *Avaritia* n'apportent pas d'éléments réels permettant une révision systématique. En effet, les relations intergroupes, et intragroupes ne sont pas abordées (Dallas *et al.*, 2003; Gomulski *et al.*, 2005, 2006; Linton *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009a, b; Perrin *et al.*, 2006). De plus, l'ensemble de ces études présente certaines limites : (i) une zone géographique d'étude limitée à un ou quelques pays ; (ii) un faible nombre d'espèces traitées, et généralement issues d'un seul groupe d'espèces ; (iii) l'utilisation d'un seul ou de 2 marqueurs correspondant à des régions codantes ou non codantes. Ainsi, une phylogénie moléculaire à partir de 5 marqueurs moléculaires appartenant à des régions mitochondriales et nucléaires avec des méthodes de reconstructions phylogénétiques modernes trouve tout son intérêt (**chapitre 5**).

Comme il l'a été précisé en première partie de ce manuscrit, l'identification jusqu'à l'espèce de *Culicoides* provenant de piégeages dans un ensemble d'insectes collectés n'est pas une tâche facile et nécessite l'acquisition d'une certaine expertise. Ainsi, le développement et la validation d'une clé d'identification interactive des femelles du genre *Culicoides* présents dans la région Ouest paléarctique ont été menés afin de rendre plus accessible à un public expert et non-expert la détermination et l'identification des femelles du genre *Culicoides*. Une validation par l'identification de lames anonymes par différents utilisateurs, est réalisée et analysée (**chapitre 6**).

Bien que plus puissant qu'une clé dichotomique, le type d'outil interactif développé en chapitre 6 révèle ces limites dans le cas d'espèces jumelles. L'identification des deux espèces jumelles du complexe *Obsoletus* par exemple nécessite l'utilisation d'outils moléculaires pour la détermination correcte des espèces. Un outil de type PCR quantitative permettant

l'estimation de l'abondance relative de *C. obsoletus* et de *C. scoticus* simultanément à partir de lots groupés de femelles a été développé et validé. Du fait de la proximité phylogénétique des deux espèces, la mise au point d'un tel outil en duplex<sup>18</sup> a représenté un vrai défi technique et méthodologique (**chapitre 7**).

Une **discussion générale conclut ce travail** et permet de mettre en perspective la nouvelle révision systématique des espèces impliquées dans la transmission d'*Orbivirus*, avec un intérêt particulier pour la position taxonomique d'espèces non collectées. Une réflexion sur les hypothèses de diversité cryptique au sein du sous-genre et notamment au sein du complexe *Obsoletus* est proposée. Des recommandations pour la conservation des ADN génomiques obtenus à partir d'individus conservés sous différentes conditions sont faites.

---

<sup>18</sup> L'ensemble des amorces et sondes sont mélangées permettant la détection optique simultanée de la fluorescence des deux sondes dans un seul tube.

## **RÉSULTATS**



## Chapitre 4 : Composition et échantillonnage du sous-genre *Avaritia*

*Dans ce chapitre, ne sont mentionnés que les espèces et spécimens collectés pour mener à bien l'objectif général de révision systématique du sous-genre Avaritia. Les espèces et spécimens utilisés pour le développement d'outils de diagnostic sont mentionnés dans les chapitres concernés.*

L'état des connaissances met en avant le manque d'une liste actualisée et la distribution géographique des espèces qui composent le sous-genre *Avaritia*. Les désaccords entre les auteurs sur les différentes espèces le composant montrent bien la complexité de cette tâche. L'enjeu de ce travail bibliographique repose sur l'organisation d'échanges de spécimens entre experts ou sur l'organisation de collectes *in situ*. Au cours de ce travail de mise à jour de la liste des espèces, une première tentative de classification subgénérique de la faune mondiale a été proposée par Borkent. Cette classification subgénérique est disponible sur internet<sup>19</sup>.

### 1. Liste des espèces appartenant au sous-genre *Avaritia*

La première liste exhaustive des espèces du monde entier appartenant au sous-genre *Avaritia*, est dressée dans une revue de ce sous-genre incluant diversité, biologie, écologie, rôle vectoriel et identification (Boorman, 1991). Cette liste, qui comprend 63 espèces, a servi de document de base pour dresser la liste actualisée. La validité taxonomique de chacune des espèces est vérifiée dans le catalogue mondial des espèces (Borkent, 2009). Trois espèces citées ont depuis été mises en synonymie : *C. tainanus* (syn. *C. maculatus*)<sup>20</sup>, *C. obscurus* (syn. *C. pungens*) et *C. obsoletus* (syn. *C. seimi*). *Culicoides sikkimensis* Das Gupta, est une espèce décrite par l'auteur comme étant « proche de *C. orientalis* » avec comme différence « les épines du peigne tibial ». Or, dans la description originale, les figures et le texte mentionnent qu'elle présente des yeux séparés et une 2<sup>nd</sup>e cellule radiale sombre. Le premier caractère ne correspond pas à la définition du sous-genre (voir chapitre 3) et les deux caractères relevés

---

<sup>19</sup> <http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/Borkent.html>

<sup>20</sup> *Culicoides tainanus* n'apparaît pas dans la liste de Boorman, 1991.

diffèrent de *C. orientalis*<sup>21</sup>. L'espèce *C. sikkimensis* est donc retirée de la liste des *Avaritia*. Les comparaisons avec les descriptions des 59 espèces restantes présentes dans la liste de Boorman sont en accord avec les définitions du sous-genre décrites au chapitre précédent.

En 2005, la publication en chinois d'un catalogue des Ceratopogonidés de Chine (Yu *et al.*, 2005) a semé le trouble dans la systématique et notamment la taxonomie des *Culicoides*. La comparaison entre notre liste et celle de Yu (2005) révèle 24 espèces supplémentaires. Leurs positions au sein du sous-genre est étudiée par l'observation des figures de Yu (2005) et la recherche de mention de ces espèces dans d'autres références (annexe 4). Une seule espèce est retenue comme appartenant au sous-genre *Avaritia* : *C. trimaculatus*.

La nouvelle liste actualisée comprend donc désormais 83 espèces valides et correspond à la base de la présente étude (Tableau II). Un tableau synthétique de la répartition des 83 espèces du sous-genre *Avaritia* au sein des régions biogéographiques est donné en annexe 5. Le détail de la chorologie de ces espèces par pays est donné en annexe 6.

---

<sup>21</sup> Il est donc curieux que Das Gupta mentionne comme caractère discriminant le nombre d'épines du peigne tibial alors que les caractères « 2<sup>nd</sup>e cellule radiale et yeux séparés » sont des caractères très faciles à observer.

Tableau II : Liste actualisée des 83 espèces appartenant au sous-genre *Avaritia*.

- C. (A.) abchazicus* Dzhafarov, 1964  
*C. (A.) actoni* Smith, 1929  
*C. (A.) alachua* Jamnback & Wirth, 1963  
*C. (A.) albifascia* Tokunaga, 1937  
*C. (A.) alticola* Kieffer, 1913  
*C. (A.) andicola* Wirth & Lee, 1967  
*C. (A.) bolitinos* Meiswinkel, 1989  
*C. (A.) boophagus* Macfie, 1937  
\* *C. (A.) boydi* Wirth & Mullens, 1992  
*C. (A.) brevipalpis* Delfinado, 1961  
*C. (A.) brevitarsis* Kieffer, 1917  
*C. (A.) brosetti* Vattier & Adam, 1966  
*C. (A.) certus* Das Gupta, 1962  
*C. (A.) chiopterus* (Meigen), 1830  
\* *C. (A.) conaensis* Liu & Yu, 1990  
*C. (A.) dasyops* Clastrier, 1958  
*C. (A.) definitus* Sen and Das Gupta, 1959  
\* *C. (A.) dentiformis* Mc Donald & Lu, 1972  
*C. (A.) dewulfi* Goetghebuer, 1936  
*C. (A.) dlkhros* Tokunaga, 1962  
*C. (A.) dubitatus* Kremer, Rebholtz-Hirtzel & Delécolle, 1976  
*C. (A.) dumdumi* Sen & Das Gupta, 1959  
\* *C. (A.) filamentus* Liu, Yan & Liu, 1996  
*C. (A.) filicinus* Gornostajeva & Gachegova, 1972  
*C. (A.) flavipunctatus* Kitaoka, 1975  
*C. (A.) fragmentum* Tokunaga, 1962  
*C. (A.) fulvus* Sen & Das Gupta, 1959  
*C. (A.) glabripennis* Goetghebuer, 1935  
*C. (A.) glushchenkoeae* Glukhova, 1989  
*C. (A.) gornostaeva* Mirzaeva, 1984  
*C. (A.) grahamii* Austen, 1909  
*C. (A.) gulbenkiani* Caeiro, 1959  
\* *C. (A.) hasegawai* Kanasugi & Kitaoka, 2001  
*C. (A.) hayakawai* Kitaoka, 1984  
\* *C. (A.) hermani* Spinelli & Borkent, 2004  
*C. (A.) hirtulus* (Coquillett), 1900  
\* *C. (A.) holcus* Lee, 1980  
*C. (A.) hui* Wirth & Hubert, 1961  
*C. (A.) imicola* Kieffer, 1913  
*C. (A.) impulsilloides* Spinelli & Wirth, 1984  
*C. (A.) jacobsoni* Macfie, 1934  
*C. (A.) juddi* Cochrane, 1973  
*C. (A.) kanagai* Khamala & Kettle, 1971  
*C. (A.) kibatiensis* Goetghebuer, 1935  
\* *C. (A.) lengi* Yu & Liu, 1990  
\* *C. (A.) longirostris* Qu & Wang, 1994  
\* *C. (A.) loxodontis* Meiswinkel, 1992  
\* *C. (A.) mamaensis* Lee, 1979  
*C. (A.) minimus* Wirth & Hubert, 1989  
\* *C. (A.) miombo* Meiswinkel, 1991  
*C. (A.) montanus* Shakirzjanova, 1962  
\* *C. (A.) motoensis* Lee, 1978  
*C. (A.) nudipalpis* Delfinado, 1961  
\* *C. (A.) nujiangensis* Liu, 1990  
\* *C. (A.) nupurius* Kanasugi & Kitaoka, 2001  
\* *C. (A.) obscurus* Tokunaga & Murachi, 1959  
*C. (A.) obsoletus* (Meigen), 1818  
*C. (A.) orientalis* Macfie, 1932  
*C. (A.) orjuelai* Wirth & Lee, 1967  
\* *C. (A.) palauensis* Tokunaga, 1959  
*C. (A.) pastus* Kitaoka, 1980  
*C. (A.) pechumani* Cochrane, 1974  
*C. (A.) pseudopallidipennis* Clastrier, 1958  
*C. (A.) puracensis* Wirth & Lee, 1967  
*C. (A.) pusilloides* Wirth & Blanton, 1955  
*C. (A.) pusillus* Lutz, 1913  
\* *C. (A.) qionghaiensis* Yu & Liu, 1990  
*C. (A.) sanguisuga* (Coquillett), 1901  
*C. (A.) scoticus* Downes & Kettle, 1952  
*C. (A.) sinoensis* Tokunaga, 1937  
\* *C. (A.) sousa-diasi* Caeiro, 1961  
*C. (A.) suarezi* Rodriguez & Wirth, 1986  
*C. (A.) suzukii* Kitaoka, 1973  
\* *C. (A.) tainanus* Kieffer, 1916  
*C. (A.) tibetensis* Chu, 1977  
*C. (A.) tobaensis* Tokunaga, 1937  
\* *C. (A.) tororoensis* Khamala & Kettle, 1971  
*C. (A.) towadaensis* Okada, 1941  
*C. (A.) trifasciellus* Goetghebuer, 1935  
\* *C. (A.) trimaculatus* Mc Donald & Lu, 1972  
\* *C. (A.) tuttifrutti* Meiswinkel, Cornet & Dyce, 2003  
*C. (A.) wadai* Kitaoka, 1980  
\* *C. (A.) wandashanensis* Wang & Liu, 1999

\* indique les espèces ajoutées par rapport à Boorman (1991)

## 2. Échantillonnage des spécimens

Les spécimens d’Afrique du Sud, d’Australie, de l’est des Etats-Unis et de Taiwan ont été identifiés et envoyés par des experts nationaux de chacun des pays concernés. L’ensemble des échantillons collectés dans les autres pays ont été envoyés dans le cadre de collaborations mais triés et identifiés dans le cadre de cette thèse. Les prélèvements réceptionnés des pays suivants n’ont pas permis de collecte de spécimens du sous-genre *Avaritia* : Bolivie, côte ouest des Etats-Unis, Kazakhstan, Nicaragua, République de Djibouti, Sénégal, Sibérie et Ukraine.

Au total, 32 espèces du sous-genre *Avaritia* ont été collectées provenant de 23 pays différents situés sur l’ensemble des continents (Figure 11 et Tableau III). Cependant, les spécimens provenant du Botswana, de Grèce et une partie de ceux de Russie se sont révélés contaminés et non exploitables. Toutes les 14 espèces du sous-genre *Avaritia* impliquées dans la transmission de virus ont été collectées et exploitées. En considérant l’ensemble des pathogènes transmis par des espèces du sous-genre *Avaritia*, *i.e.* virus et filaires, seule l’espèce *C. trifasciellus* n’a pas pu être incluse dans ce travail.

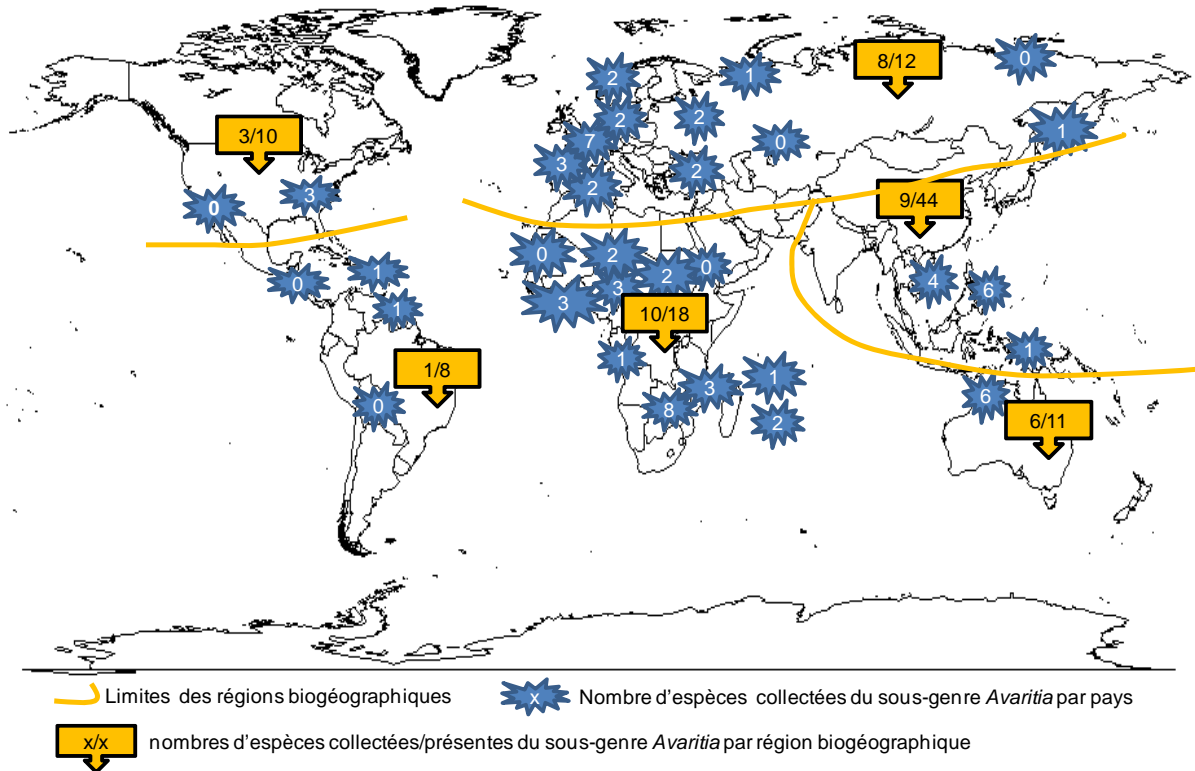


Figure 11 : Carte représentant l’échantillonnage des espèces collectées appartenant au sous-genre *Avaritia*.

Tableau III : Liste des espèces collectées du sous-genre *Avaritia* par région biogéographique.

Néarctique	Néotropicale	Éthiopienne	Paléarctique	Orientale	Australienne
<i>C. alachua</i>	<i>C. pusillus</i>	<i>C. bolitinos</i>	<i>C. abchazicus</i>	<i>C. actoni</i>	<i>C. actoni</i>
<i>C. obsoletus</i>		<i>C. grahamii</i>	<i>C. chiopterus</i>	<i>C. boophagus</i>	<i>C. brevipalpis</i>
<i>C. sanguisuga</i>		<i>C. gulbenkiani</i>	<i>C. dewulfi</i>	<i>C. dentiformis</i>	<i>C. brevitarsis</i>
		<i>C. imicola</i>	<i>C. imicola</i>	<i>C. fulvus</i>	<i>C. fulvus</i>
		<i>C. kibatiensis</i>	<i>C. montanus</i>	<i>C. imicola</i>	<i>C. obscurus</i>
		<i>C. loxodontis</i>	<i>C. obsoletus</i>	<i>C. jacobsoni</i>	<i>C. wadai</i>
		<i>C. miombo</i>	<i>C. scoticus</i>	<i>C. orientalis</i>	
		<i>C. pseudopallidipennis</i>	<i>C. sinanoensis</i>	<i>C. suzukii</i>	
		<i>C. tororoensis</i>		<i>C. tainanus</i>	
		<i>C. tuttifrutti</i>			

Au total, 300 spécimens dont 287 appartenant au sous-genre *Avaritia* ont été disséqués et leurs ADNg extraits selon le protocole décrit dans le chapitre 5 suivant. La liste complète des spécimens entre lame et lamelles et dont l'ADNg est disponible, classés par espèce, est donnée en annexe 7.

### 3. Conclusion

La liste actualisée des 83 espèces du sous-genre *Avaritia* a servi de base pour gérer l'échantillonnage des spécimens. L'effort d'échantillonnage réalisé dans le cadre de cette thèse a permis de collecter 32 espèces soit 38% de la faune mondiale. L'ensemble des 14 espèces du sous-genre *Avaritia* impliquées dans la transmission de virus est réuni dans cette étude. La collecte a permis de rassembler la majorité des espèces présentes dans les régions paléarctique, éthiopienne et australienne. Malgré nos efforts, les régions néarctique, néotropicale et orientale demeurent sous-échantillonnées.



## Chapitre 5 : Phylogénie moléculaire du sous-genre *Avaritia*

*Dans ce chapitre, sont étudiées les relations phylogénétiques existantes inter et intra-groupes pour les espèces appartenant au sous-genre Avaritia. Les points forts de ce travail sont : l'échelle faunistique mondiale et la phylogénie étudiée à partir de l'investigation basée sur plusieurs marqueurs moléculaires appartenant à des régions mitochondriales et nucléaires codantes ou non avec des méthodes de reconstructions phylogénétiques modernes.*

L'état des connaissances actuel a mis en évidence le trop faible nombre d'études phylogénétiques toutes réalisées sur un nombre réduit d'espèces (et généralement appartenant à un seul groupe) appartenant au sous-genre *Avaritia* et dans une zone géographique limitée à un ou quelques pays. Les études étaient jusqu'ici restreintes à un ou deux marqueurs issus de régions codantes ou non codantes.

Au démarrage de cette thèse, aucune révision systématique n'avait été proposée sur une base évolutive. Jusqu'ici les seuls travaux relatant de phylogénie moléculaire sur les *Culicoides* appartenant au sous-genre *Avaritia* sont basés sur quelques espèces du groupe *Obsoletus* et *C. imicola* en région paléarctique sur la base des régions ITS1 (Mathieu *et al.*, 2007) ou ITS2 (Gomulski *et al.*, 2005) ; sur cinq espèces du groupe *Imicola* en région éthiopienne utilisant la seule région barcode COI (Dallas *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2002) ; et sur quelques espèces du sous-genre *Avaritia* en relation avec des espèces d'autres sous-genres à l'aide des régions ITS1 et 2 (Matsumoto *et al.*, 2009a) ou des régions COI et COII (Matsumoto *et al.*, 2009b). Avant d'initier le séquençage de différentes régions sur un maximum de spécimens collectés, une première étape de criblage de plusieurs marqueurs est réalisée pour sélectionner au mieux les marqueurs présentant une bonne discrimination au niveau intra-subgénérique.

Pour le criblage des marqueurs, l'ensemble des gènes cités ci-dessous sont conservés, deux régions supplémentaires sont ajoutées, le cytochrome b (Cytb) de l'ADNmt et le domaine D3 de la région 28S de l'ADNr. Ces derniers n'avaient pas encore été investigués chez les *Culicoides* mais sont des marqueurs déjà utilisés pour d'autres insectes. En effet, le Cytb a été utilisé chez les phlébotomes où il s'est avéré être un bon marqueur pour comprendre les délimitations d'espèces (Pesson *et al.*, 2004), et pour étudier les relations entre populations (Hamarsheh *et al.*, 2009). Chez les anophèles du groupe *Minimus*, le domaine D3 de l'ADNr a été

utilisé en phylogénie d'espèces et s'est montré peu variable en intra-spécifique (Sharpe *et al.*, 2000).

## 1. Criblage de marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires évalués dans ce criblage sont :

- (i) le domaine D3 de la région 28S (région codante de l'ADNr),
- (ii) ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1, région non codante de l'ADNr),
- (iii) ITS2 (Internal Transcribed Spacer 1, région non codante de l'ADNr),
- (iv) 5,8S (région codante de l'ADNr),
- (v) COI, Cytochrome oxydase de type I, région barcode ADNmt (codant),
- (vi) COII, Cytochrome oxydase de type II de l'ADNmt (codant) et,
- (vii) Cytb, Cytochrome b de l'ADNmt (codant).

Les régions ITS1-5,8S-ITS2 sont amplifiées en un seul amplicon. Dans l'étude de Matsumoto (2009b), les fragments amplifiés correspondant aux régions COI et COII ont des tailles variant de 2 000 à 3 500 bp. Afin de générer des amplicons de taille inférieure à 1 000 bp plus facile à séquencer, de nouvelles amorces sont dessinées pour amplifier le COII et le Cytb. La liste des amorces, les conditions PCR utilisées ainsi que des notes sur l'amplification des régions sont données en annexe 8.

Le criblage est réalisé à partir d'un nombre de séquences obtenues entre 10 et 19 en fonction des régions. Les matrices d'identité des séquences en pourcentage sont générées à l'aide du logiciel Vector Nti (Invitrogen, USA). L'ensemble des matrices sont présentées en annexe 9. Seuls les marqueurs qui permettent d'appréhender les différences interspécifiques tout en n'ayant que peu de pouvoir discriminant en intra-spécifique seront conservés. Pour chacune d'elles, les pourcentages d'identité minimum et maximum en inter et intra-spécifique sont relevés (Tableau IV). Avec un minimum de 95% (par exemple entre *C. (Pontoculicoides) tauricus* et *C. (A.) obsoletus*) d'identité de séquences entre les espèces et un maximum de 100% (par exemple entre *C. (A.) dewulfi* et *C. (A.) imicola*), le domaine D3 se montre très conservé pour le genre *Culicoides*. Le second marqueur non encore investigué pour le genre *Culicoides*, le Cytb, apparaît très comparable à la région COI sur la base des identités de séquences. Le COII semble également un marqueur intéressant à conserver pour l'étude de phylogénie. Les pourcentages d'identité interspécifique pour la région ITS1-5.8S-ITS2 sont les plus forts entre 93 et 98% entre des espèces du groupe *Obsoletus*. En raison de



pourcentages plus faibles hors du groupe *Obsoletus* et des bons résultats lors d'études ultérieures (Gomulski *et al.*, 2005, 2006; Mathieu *et al.*, 2007; Perrin *et al.*, 2006), cette région est conservée. Le séquençage est poursuivi sur les 6 régions<sup>22</sup> ITS1-5.8S-ITS2, COI, COII et Cytb.

Tableau IV : Pourcentages minimum (Min) et maximum (Max) d'identité des séquences en interspécifique (inter-sp.) et en intra-spécifique (intra-sp.).

Région	Taille attendue (bp)	Identité inter-sp. Min-Max (%)	Identité intra-sp. Min-Max (%)	Séquences (Nb)	Référence
ITS1-5.8S-ITS2	700-820	83-98	98-100	10	(Cètre-Sossah <i>et al.</i> , 2004) (Gomulski <i>et al.</i> , 2005)
D3	320-336	95-100	99-100	19	(Litvaitis <i>et al.</i> , 1994)
COI	523	84-89	98-100	10	(Dallas <i>et al.</i> , 2003)
COII	601	75-84	98-100	10	cette étude*
Cytb	526	80-89	98-100	10	cette étude

\* amorce anti-sens modifiée à partir de (Beckenbach et Borkent, 2003).

## 2. Phylogénie moléculaire

*Cette partie est rédigée sous la forme d'un article en préparation ciblé pour une soumission dans Infection, Genetics and Evolution. Pour en faciliter la lecture, les tables et figures sont insérées dans le texte.*

<sup>22</sup> Amplifiées et séquencées ensemble, les 3 régions ITS1, 5,8S et ITS2 seront toutefois analysées séparément avec le jeu de données final.

**Molecular phylogeny of the biting midge genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae).  
Taxonomic implications for the subgenus *Avaritia***

Bruno MATHIEU<sup>ac\*</sup>, Claire GARROS<sup>b</sup>, Thomas BALENGHIEN<sup>b</sup>, Ermanno CANDOLFI<sup>a</sup>,  
Jean-Claude DELÉCOLLE<sup>a</sup>, Catherine CÊTRE-SOSSAH<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> IPPTS, Université de Strasbourg, EA 4438, 67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup> CIRAD, UMR Contrôle des maladies, 34398 Montpellier, France

<sup>c</sup> EID Méditerranée, 34184 Montpellier, France

\* Corresponding author: [bmathieu@unistra.fr](mailto:bmathieu@unistra.fr)

**Abstract**

Some major vectors of Orbivirus such as *C. imicola* and *C. brevitarsis*, belong to the subgenus *Avaritia*. Most authors remained unsatisfied of the subgenus classification of the genus *Culicoides* with a preferred usage of groups gathering species according a close morphology. As these groups were not defined based on phylogeny evidence, disagreements between authors have resulting in a taxonomic imbroglio. A molecular phylogeny of the subgenus *Avaritia* within the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) was conducted to revise the systematic of the subgenus *Avaritia*. Two nuclear genes of the ribosomal DNA (rDNA), internal transcribed spacer 1 and 2 (ITS1, ITS2), and three mitochondrial ones (mtDNA), cytochrome c oxydase I, II and cytochrome b oxydase (COI, COII and Cytb), were used independently and combined. COII and Cytb were newly used to study the *Culicoides* phylogeny and revealed to be useful for the investigation of cryptic species. Topology comparisons favored the Bayesian inference analysis with combined dataset using a partition for rDNA and mtDNA each as our best fit model of *Avaritia* evolution. The monophyletic status of the subgenus *Avaritia* was demonstrated. Obsoletus group was the most ancestral clade within *Avaritia* and was paraphyletic with the clade *Imicola* group. The *Actoni* and *Pusillus* groups were revised as a unique clade named *Grahami* group and a *Boophagus* group was erected. The clade *Orientalis* group remains unsatisfactory (CPP=93%) and further investigation intra-group with the addition of some lacking species would be necessary to improve the phylogeny of this clade.

Keywords: *Culicoides*, phylogeny, taxonomy, species group, systematics

## Introduction

Phylogenetic analysis of DNA sequence data, in conjunction with associated approaches such as identification of species based on DNA sequences (barcoding), has facilitated both the identification of robust taxonomic groupings and also helped to clarify their systematic interrelationships (Besansky *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2007). Such approaches have proven most useful in highly speciose taxa, especially where morphological similarity precludes identification of species using traditional cladistic approaches (Hebert *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006).

*Culicoides* biting midge species are responsible for the transmission of bluetongue virus (BTV), African horse sickness virus (AHSV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV), all viruses belonging to the *Orbivirus* genus, Reoviridae family. A clear understanding of disease transmission dynamics is needed in the context of emerging diseases and global warming (Maclachlan et Guthrie, 2010). The diversity of the genus *Culicoides* gathered more than 1,300 known species with around 63 species having a main or suspected role in transmission of pathogens including 26 involved in the transmission of orbiviral diseases (Borkent, 2005). This diversity is classified in 36 recognized subgenera (Borkent et Wirth, 1997) with one being of main importance for the number of vector species included. The subgenus *Avaritia* comprises certain palaeartic species involved in the emergence and establishment of BT in Europe. Between 1998 and 2005, bluetongue transmission was primarily related to the main Afrotropical vector *Culicoides imicola* Kieffer in the western Mediterranean basin. In 2006, outside the geographical distribution range of *C. imicola*, outbreaks of bluetongue occurred in northern Europe due to the serotype 8. It appeared that autochthonous palaeartic biting midge species were able to transmit BTV-8 effectively. Till date, several *Culicoides* species, mostly members of the subgenus *Avaritia*, have been suspected of being involved in BTV-8 transmission in Europe based on their abundance, vector competence, or the detection of BTV-8 in field collected individuals (Carpenter *et al.*, 2006; Dijkstra *et al.*, 2008; Hoffmann *et al.*, 2009; Meiswinkel *et al.*, 2007).

The internal taxonomy of the genus *Culicoides* has traditionally relied mainly on morphological identification based upon variation in wing pattern and male genitalia. Differentiation of *Culicoides* species based only on morphological characteristics of the female is difficult, and often for accurate species identification it is necessary to examine characters of the male genitalia and immature stages. Adult biting midge species

identification requires a highly specialized and specific knowledge of insect morphology. Sibling species or species groups, and phenotypic plasticity among individuals or populations limit correct species identification especially for females.

The subgenus *Avaritia* was erected by Fox (1955) and its definition was completed later based on adults morphology (Blanton et Wirth, 1979; Wirth et Hubert, 1989). Glukhova (1977) proposed a satisfactory scheme for the subgenus, in particular for the *Avaritia* one, based on adults characters of both sexes and more importantly larval stages (pupal stage do not appear to be as useful). Some authors agreed to *Avaritia* being a well-defined natural group (Boorman, 1988; Glukhova, 1977; Wirth et Hubert, 1989). However in the last decades, most authors remained unsatisfactory of the subgenus classification and preferred to gather species in groups, and sometimes without any assignments into subgenus (Blanton et Wirth, 1979; Campbell et Pelham-Clinton, 1960; Glick, 1990; Khamala et Kettle, 1971; Kremer, 1965). Based on some studies throughout the world (Boorman, 1991; Glick, 1990; Kremer, 1965; Wirth *et al.*, 1988; Wirth et Hubert, 1989), six main groups appeared: Actoni, Andicola, Imicola, Obsoletus, Pusillus and Orientalis. As a result, disagreements between authors to classify species can be noted. *Culicoides imicola* and related species belong to the Orientalis group for Wirth and Hubert (1989), whereas others authors clearly distinguished Imicola group and Orientalis group (Meiswinkel, 2004). Glick (1990) does not consider the subgenus *Avaritia* and gather directly the species in the Imicola group, including the non related with the species *C. Imicola* like *C. kanagai* Khamala & Kettle. *Culicoides grahami* was alternatively affected to the Imicola group (Khamala et Kettle, 1971) or to the Actoni group (Wirth et Hubert, 1989). In any case, the classifications into subgenus or into groups were not related to clades supported by phylogenetic studies.

Mitochondrial DNA has commonly been used for molecular evolutionary studies, mostly in arthropods (Hebert *et al.*, 2004). The cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene is the largest and the most conserved gene among the three cytochrome oxidase genes in mitochondrial DNA (Beard *et al.*, 1993; Clary et Wolstenholme, 1985). This gene has been widely used in taxonomy (Hajibabaei *et al.*, 2007), for differentiation of cryptic species (Patsoula *et al.*, 2007; Saeung *et al.*, 2008; Scarpassa et Conn, 2006), phylogeny (Sallum *et al.* 2002), and population and phylogeography studies in Culicidae (Scarpassa *et al.* 2008, Pedro and Sallum 2009). Concerning *Culicoides*, the COI region was used to investigate the phylogenetic relationships between *C. imicola* and few related species (Dallas *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2002), to differentiate cryptic species (Pagès *et al.*, 2009; Pagès et Sarto I Monteys, 2005; Schwenkenbecher *et al.*, 2009a), and finally to developed specific PCR-based assays (Nolan *et al.*, 2007; Schwenkenbecher *et al.*, 2009b). Sequence analyses

based on variations of the internal transcribed spacer regions I (ITS1) (Mathieu *et al.*, 2007; Perrin *et al.*, 2006) or II (ITS2) (Gomulski *et al.*, 2005, 2006) or both of them (Schwenkenbecher *et al.*, 2009a), have been used also to study the phylogenetic relationships of species between or within groups, and to develop diagnostic DNA-based assays. At the start of this study, the phylogeny within the *Avaritia* subgenus was investigated: (i) on few palaeartic species of the *Obsoletus* group based on ITS1 (Mathieu *et al.*, 2007) or ITS2 (Gomulski *et al.*, 2005); (ii) on few ethiopian species of the *Imicola* group based on COI (Dallas *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2002); (iii) and on relationships between six species belonging to *Avaritia* subgenus and some from others subgenus based on ITS1 and ITS2 (Matsumoto *et al.*, 2009a) or on COI and COII regions (Matsumoto *et al.*, 2009b).

For the first time, our work used a multi-marker approach to generate a molecular phylogeny of the subgenus *Avaritia* and to elucidate the phylogenetic relationships among the different species at the world wide level. The molecular markers used are the nuclear internal transcribed spacer 1 and 2 (ITS1, ITS2) region and the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI, barcode region), subunit II (COII), cytochrome B (Cytb) genes.

## **Materials and Methods**

### *Taxon sampling and species identification*

A total of 188 specimens from 32 species belonging to the subgenus *Avaritia* (out of 83 referenced species) were worldwide collected from 21 countries. The sampling effort was particularly important in the palaeartic and ethiopian regions. The identity was determined or confirmed by either the experts who kindly provide specimens or by the authors using the following morphological keys (Glick, 1990; Glukhova, 2005; Khamala et Kettle, 1971; Wirth et Hubert, 1989).

### *DNA extraction, PCR, sequencing*

A non-destructive method was used to extract DNA from specimen. As a first step, specimens were individually digested with 200 µL of Proteinase K at 1% (20 mg/ml , Qiagen, USA) overnight at room temperature. After an absolute ethanol washing, specimens were soaked in an alcool/phenol solution before dissection and mounting with Canada balsam (Wirth et Marston, 1968). Total genomic DNA was extracted from the digested supernatant using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions

In addition to the barcode region cytochrome oxidase subunit I (COI), the cytochrome oxidase subunit II (COII) and the cytochrome b (Cytb) as mitochondrial gene fragments (mt) were amplified. One ribosomal DNA (rDNA) gene fragment was studied: the non coding internal transcribed spacer 1 and 2 (ITS-1/ITS-2) including the coding 5.8S region. Primer sets used are listed in Table 1.

**Table 1:** Primers used to amplify the molecular regions studied. COI, was cytochrome c oxidase I; COII, cytochrome c oxidase II; Cytb, cytochrome b oxidase; ITS1-58S-ITS2, Internal Transcribed Spacer 1 5.8S and Internal Transcribed Spacer 2 (these 3 regions were amplified together). The primers designed in this study were named according the nomenclature proposed by Simon et al. (1994).

Gene	Primer name	Sequence 5'to3'	Fragment length	Original publication
COI	C1J1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT	-	(Dallas et al., 2003)
COI	C1N2191	CAGGTAAAATTTAAAATATAAACTTCTGG	523 bp	(Dallas et al., 2003)
COII	C2J3103	ATGGCAACTTGAGGAMATAT	-	This study
COII	C2N3665	CGCAGATTTCTGAACATTG	601 bp	modified from (Beckenbach et Borkent, 2003)
Cytb	CBJ10906	ATAGGAACTGCTTTTATAGG	-	This study
Cytb	CBN11387	CAATAGATATGACTAAAGCGATTACT	526 bp	This study
ITS1-5.8S-ITS2	PanCulF	GTAGGTGAACCTGCGGAAGG	-	(Cêtre-Sossah et al., 2004)
ITS1-5.8S-ITS2	28SR	ATTTGGGGGTAGTCACACAT	~785 bp	(Gomulski et al., 2005)

PCR reactions were performed in a total volume of 50 µL consisting of 1X PCR reaction buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 250 µM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Invitrogen, USA), 200 ng of each primer, and 2.5 U of HotStart Taq DNA polymerase (Qiagen, USA) and 1 µL of genomic DNA. PCR cycling conditions for mtDNA were: an initial denaturation step at 95°C for 15 min, then 5 cycles at 95°C for 40 sec, 45°C for 40 sec, 72°C for 1 min, followed by 45 cycles at 95°C for 40 sec, 50°C for 40 sec, 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 20 min. To amplify the ITS1-5.8S-ITS2 region, the PCR cycling conditions were: an initial denaturation step at 95°C for 15 min, then 40 cycles at 95°C for 30 sec, 54°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 20 min. PCR products were examined by electrophoresis in a 2.0% ethidium bromide agarose gel .

PCR products were sequenced in both directions by Eurofins MWG Operon (Edersberg, Germany) for the mtDNA gene fragments whereas the rDNA region was sequenced after

cloning from plasmids. The purified ITS1-5.8S-ITS2 specific-PCR products were cloned into PCR-Blunt vector (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen, USA), using chemically competent *E. coli*. Plasmid DNA was extracted using a Plasmid DNA Preparation Kit (Nucleospin® Plasmid, Macherey Nagel, USA). BamHI (Biolabs, UK) restriction endonuclease digestion and quantification of plasmid copies were carried out by determining DNA concentration at a wavelength of 280 nm.

#### *Alignment and phylogenetic analyses*

The mtDNA coding region sequences (COI, COII and Cytb) were aligned using Vector Nti v11.5.0 (Invitrogen, USA) and double checked with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Faced to the ambiguous alignment of non coding rDNA sequences (ITS1, 5.8S, ITS2) was performed with MAFFT (Katoh *et al.*, 2009). Gaps were removed by eye using Mega version 5 (Tamura *et al.*, 2011). Alignments of each mtDNA regions were translated into peptide sequences with Mega (Tamura *et al.*, 2011) in order to exclude putative NUMt copies.

Heterogeneity tests of nucleotide frequency among specimens were performed using DAMBE (Xia et Xie, 2001). Using the same software, potential saturation of each dataset was investigated graphically by plotting the absolute number of transition and transversion against Tamura-Nei model (referred as ML Composite TN93) distance for all pairwise comparisons of sequences. The sequences revealing a saturated phylogenetic signal were discarded from the final dataset. The remaining sequences were concatenated using Seaview (Gouy *et al.*, 2010) to be analysed as a whole fragment with a partitioning strategy as described below.

Phylogenetic reconstructions were performed for each dataset using both non-probabilistic and probabilistic approaches. The non-probabilistic, maximum parsimony (MP), was performed using MEGA with bootstrapping method (n=200), considering all sites informative (missing data non excluded) and with the Close-Neighbor-Interchange (CNI) search method on Random Trees. The probabilistic approaches were maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). To define model parameters, the best-fit model of nucleotide substitutions was calculated with JModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) using the selection of the Akaike information criterion (AIC). The general time reversible (GTR) +I+  $\Gamma$  model was indicated as the best-fit model for the COI, COII and Cytb as separated genes. The GTR+ $\Gamma$  model was the best-fit one for the ITS1 and the ITS2 considered separately whereas the Hasegawa Kishino and Yano (HKY) + $\Gamma$  one was indicated for the ITS1/ITS2 combined. The three mtDNA genes as a combined dataset followed the GTR+ $\Gamma$  model.

ML phylogenetic analyses were carried out with PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010) according to the respective best-fit model. The transition/transversion ratio, the  $\Gamma$  parameter and if necessary the proportion of invariant sites were estimated. The starting tree was determined by BioNJ analysis and the branch was tested by the Shimodaira-Hasegawa-like branch test.

Phylogenetic analyses were also carried out under Bayesian inference (BI) using MrBayes v3.1.2 (Ronquist et Huelsenbeck, 2003). To increase the fit of evolutionary models with data, we used partitioned analyses, which allow subsets of the data to evolve under distinct models and parameters (Nylander et al., 2004; Brandley et al., 2005). Three partitioning strategies were defined *a priori*: strategy P1, corresponding to an unpartitioned analysis; strategy P2, implementing one partition for the mitochondrial genes and one partition for the nuclear genes (ITS1+2); and strategy P3, which implements a partition for each gene COI, COII, Cytb and ITS1+2. For each partitioning strategy, independent runs of 2,000,000 generations were carried out applying appropriate models of evolution to each partition. 5,000 of the saved trees were discarded and the remaining 15,000 trees were used to construct the BI trees. Clade posterior probabilities (CPP) estimates were used to assess the robustness of tree nodes. The best-fit partitioning strategy was determined by comparing the Bayes factors ( $B_F$ ) estimated as twice the difference of harmonic means.

## Results

### *Datasets*

In this study, we collected 32 out of the 83 species of the subgenus *Avaritia* described throughout the world corresponding to 39% of the world fauna. Only one single species was unsuccessfully sequenced: *C. dentiformis* from Taiwan. The COI region of *C. kwagga* (accession number AF069237), a species not collected by our sampling, was added to our dataset, remaining then at 32 the number of species belonging to the *Avaritia* subgenus analysed. The complete list and accession numbers of the specimens - with non-identical sequences - collected in this study and those added from Genbank was given as supplementary data. For the barcode COI region, 174 specimens of 21 countries were sequenced (with 34 identical sequences removed from COI dataset). The 101 COII sequences were generated for 22 species from 18 countries (with 28 identical sequences were removed from COII dataset analysed). For COI and COII, 15 and 8 sequences from Genbank were respectively added. The Cytb fragment gene was generated with 138 sequences representing 27 species of 20 countries with 18 identical sequences which were removed from Cytb

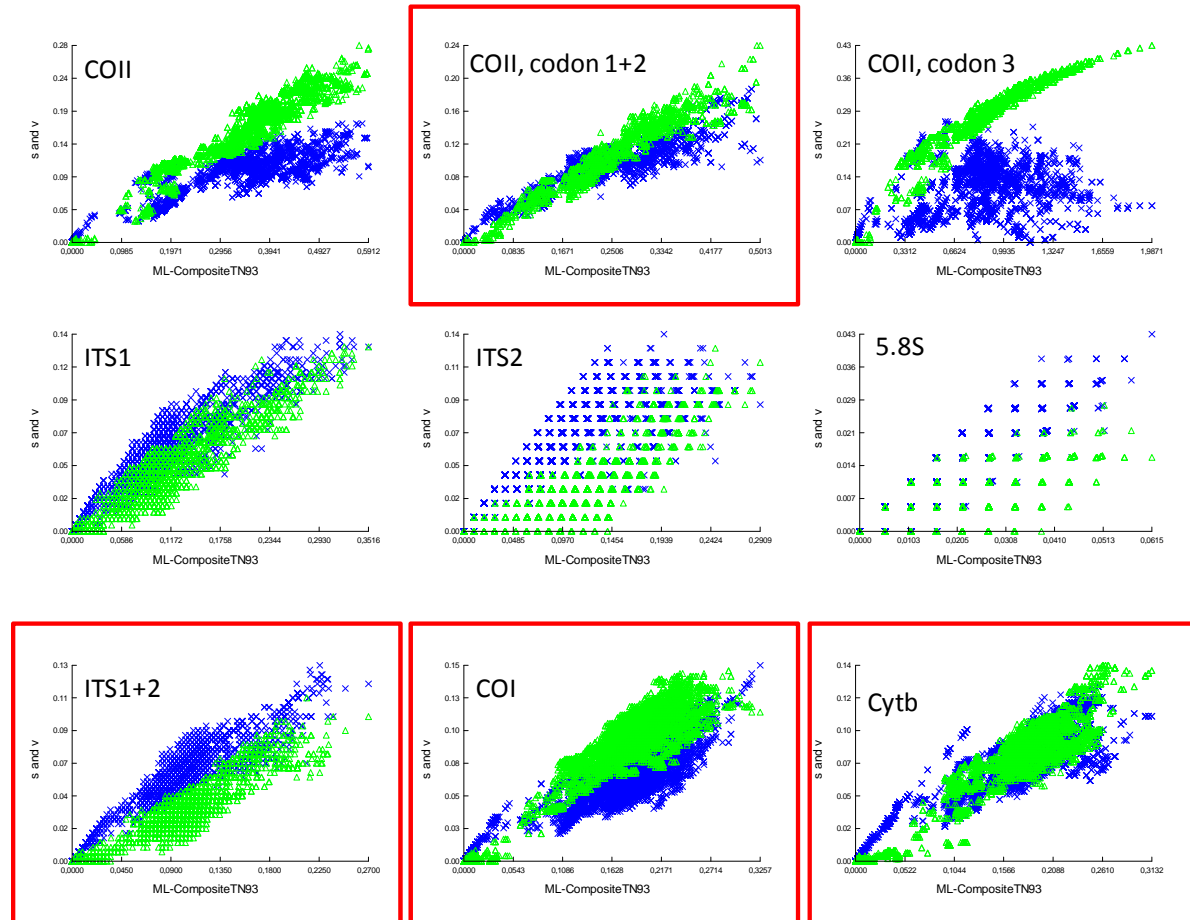


dataset. Concerning the rDNA, 67 sequences of ITS1-5.8S-ITS2 region representing 28 species of 17 countries were generated with the deletion of one identical sequence, and with the addition of nine sequences from Genbank. Sequences of *C. arakawae* for all gene studied here were added.

### *Phylogenetic signal*

Heterogeneity tests on nucleotide frequency were not significant ( $p=1$ ) for all the genes except for COII ( $\chi^2 = 607.43$ ,  $df=330$ ,  $p= 0$ ). The heterogeneity of nucleotide frequency for COII investigated by codon position showed heterogeneity on codon 3 ( $\chi^2 = 1672.44$ ,  $df=330$ ,  $p= 0$ ) and homogeneity on codon 1+2 ( $\chi^2 = 160.65$ ,  $df=330$ ,  $p= 1$ ). On the saturation plots (Figure 1), the whole COII showed transition reaching slowly a plateau. The COII on codon position 3 was shown to have transition information clearly saturated compared to position 1+2. The COII gene was therefore analysed only on codon position 1+2. The saturation plot for 5.8S gene showed transversion information saturated. Highly conserved, it was decided to remove this gene from the analysis. The exclusion of indels from alignments of the ITS1 and ITS2 datasets produce short fragments, respectively 221 bp and 127 bp. Both ITS were analysed independently and also combined as a unique fragment. Even with its short size, the ITS-2 fragment (127 bp) was kept as previous studies showed good phylogenetic results on *Culicoides* (Gomulski *et al.*, 2005, 2006). A concatenated ITS1/ITS2 fragment was then included in the analysis. The transition and transversion curves did not reach a plateau for the COI and the Cytb. The following datasets were included in the analysis: COI, COII on codon1+2, Cytb and ITS1+2, representing respectively 498, 352, 507 and 348 bp fragments. A combined dataset was also computed with all these alignments together giving a concatenated 1705 bp long fragment.

**Figure 1:** Saturation plots of the absolute numbers of transitions (blue) and transversions (green) for each gene and for ITS1 combining with ITS2. The red boxes enlighten the best phylogenetic signal by gene retained for analysis.



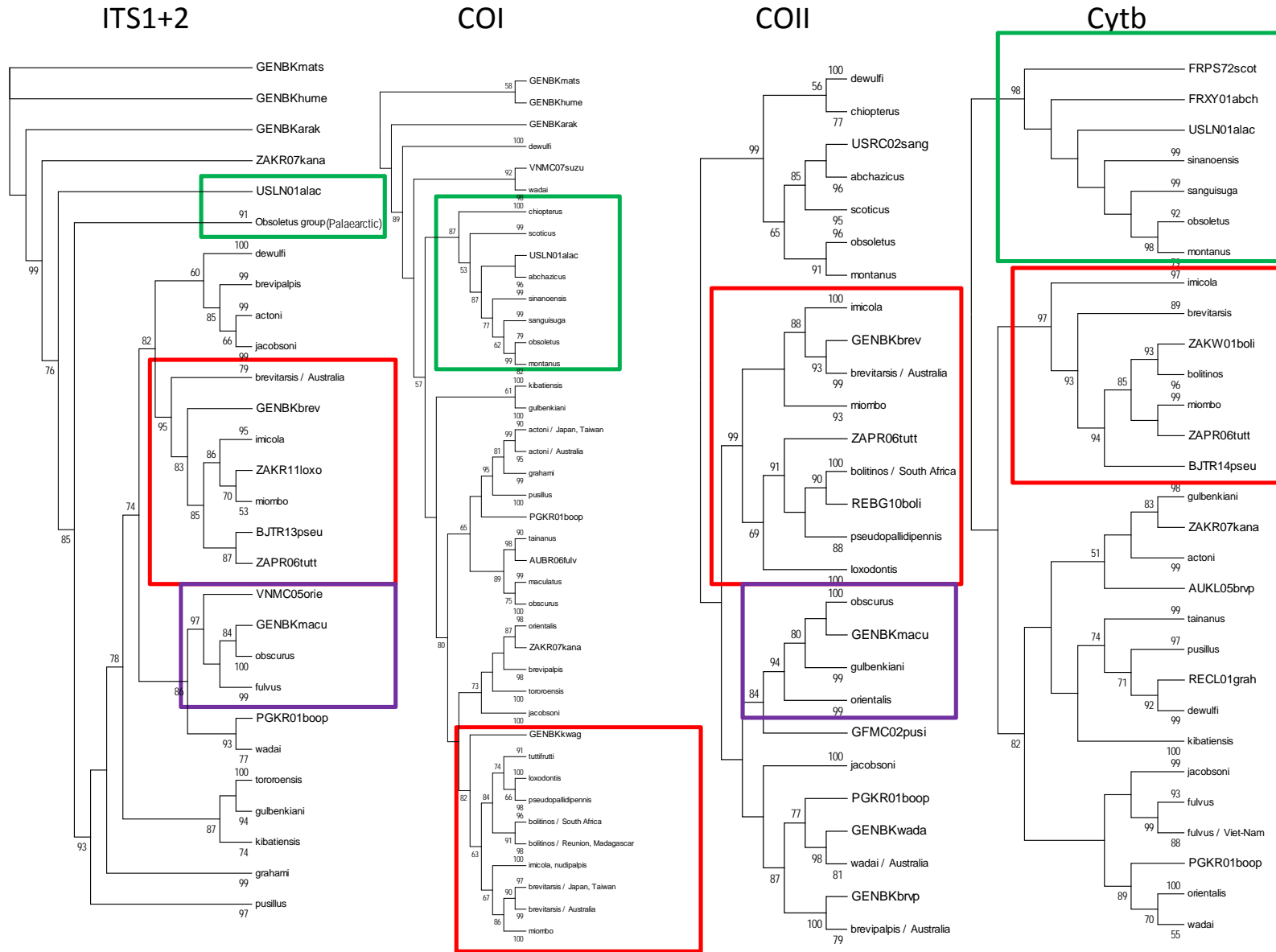
### *Reconstructions from each dataset*

Tree reconstruction using MP and ML gave similar topology and similar species composition of groups for the genes. Nevertheless, clades corresponding to species group were not supported with high values bootstrap (less than 50%) - except for the Cytb gene where the clade *Imicola* group was supported by a 92% value in MP reconstruction (data not shown).

Topologies of the ML reconstructions were congruent among considered genes. Figure 2 represents the ML reconstructions for each of the four genes analysed independently, boxes were designed outlining the three main groups present (*Obsoletus* group, *Imicola* group and *Orientalis* group). The ITS1+2 gene showed a basal topology and the three groups well supported with SH-Like values above 91%. Intra-groups nodes were quite well supported for *Imicola* and *Orientalis* group but not for the *Obsoletus* group with a mix of the species (not shown as this latest clade is collapsed to a better insight of topology). The tree topology based

on ML analysis of the COI gene is less well supported than ITS1+2 for the basal part of the tree. The clade *Obsoletus* group was supported by 87% value and intra-specific composition was supported with values from 53% to 99%. The clade *Imicola* group was well supported and two geographical clades for *C. bolitinos* and for *C. brevitarsis* were distinguished with respective values of 91 and 90%. The species currently defined as *Orientalis* group were not gathered in a clade. The COII showed a very well supported *Imicola* group 99% but the clades of *Obsoletus* group and *Orientalis* group included respectively *C. dewulfi* and *C. gulbenkiani* which presences were in disagreement with others genes. The species defined as part of the *Orientalis* group were scattered in the Cytb ML reconstruction whereas the *Obsoletus* and *Imicola* clades were well outlined.

**Figure 2:** Trees obtained by independent ML reconstruction for each region. Each data set did not include any gaps and missing data. Green, red and purple boxes outlining the three main group represented in this study respectively *Obsoletus*, *Imicola* and *Orientalis* groups. Boxes have been drawn only for groups represented by a clade supported by a SH-like value higher than 80%. SH-like percentages of 200 replicates are shown above the branches for values exceeded 50%



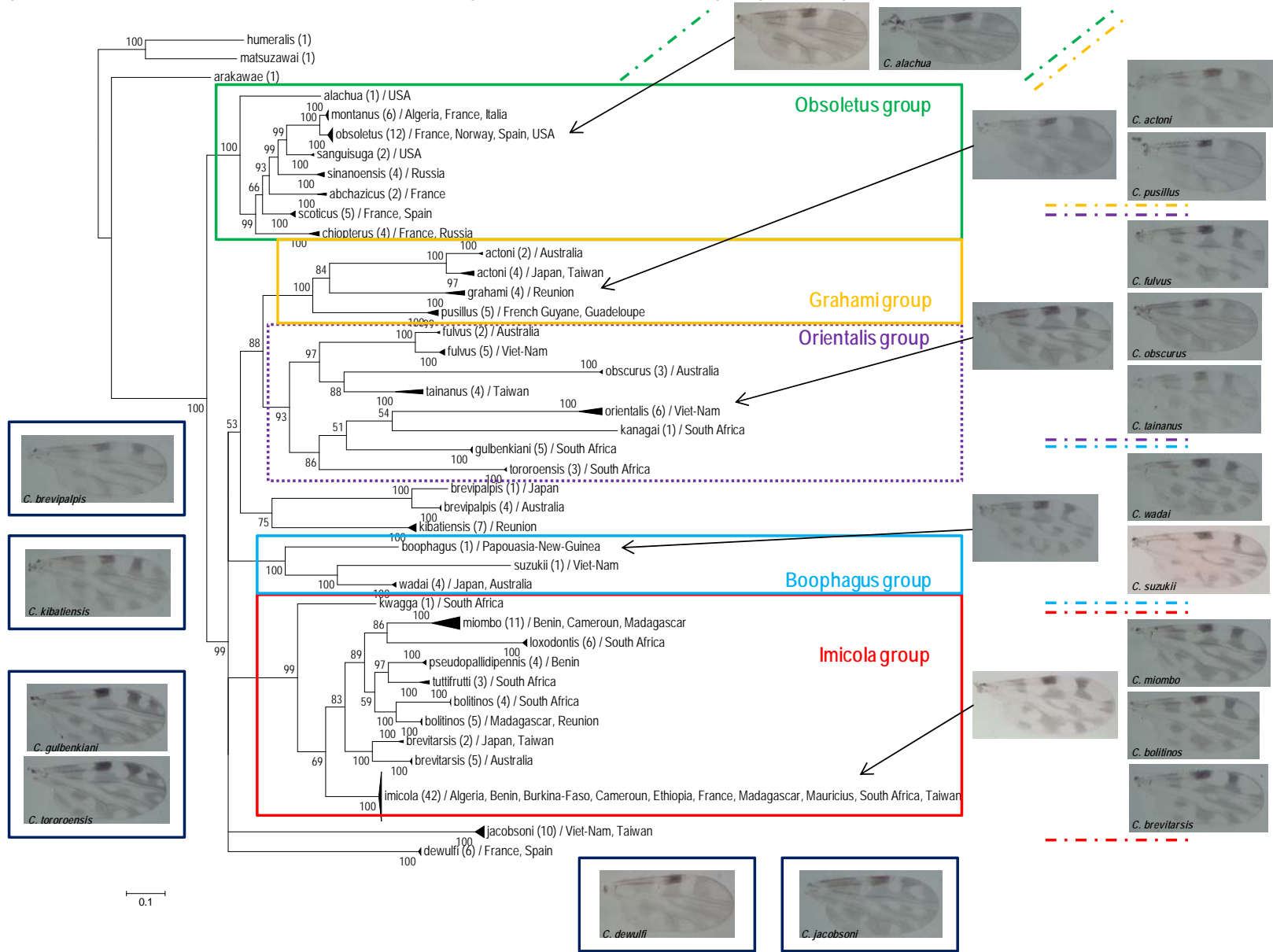
### *Bayesian Inference on combined dataset*

Comparison of the Bayes factor obtained from the three distinct partitioning strategies on the combined data run independently favours the strategy P2. Because, (i) no topology incongruence was shown between well supported nodes on separate ML analysis and the combined ones for the three BI strategies, and because (ii) the combined analysis showed well supported topology from deep node and terminal ones; the latest analysis (strategy P2) was considered as our best estimates of the phylogeny of the subgenus *Avaritia*. In the resulting topology (Figure 3), most nodes are supported by CPP values above 90%. These nodes with highest CPP values were congruent for all the tested strategies. Differences in topology remained for some particular taxa like *C. dewulfi*, *C. jacobsoni*, *C. brevipalpis*, *C. kibatiensis*. The Obsoletus group, Imicola group and Grahami group clades were congruent in each of the runs and were all supported by CPP of 100%, except for Grahami group in strategy P1 unpartitionned (CPP=86%). The three strategies were congruent with a CPP of 100%, to support a new group of species designated, by the name of the oldest species, as Boophagus group. All runs supported the monophyletic status of the clade *Avaritia* and the paraphyletic status between clades Obsoletus group and Imicola group (CPP=100%). Considering the actual species composition of the Orientalis group, topologies were conflicting and this group remains unclear.

### **Discussion**

Among the several genes of interest tested for species discrimination, the mitochondrial oxidase subunit II (COII) and cytochrome b (Cytb) genes gave a high phylogenetic signal to study closely related species and were shown to be less informative for basal topology. The combined non coding region ITS1+2 were shown to be useful to describe basal topology of trees and to support monophyletic status of a clade. The COI gene, defined as the barcode region was shown to quite well support basal topology and useful to separate closely related species. The COII and Cytb genes, newly tested for this model of insect, gave informative knowledge in terms of investigation of ingroup relationships for closely related clades. The suggestion to include these two new genes of interest for studying *Culicoides* phylogenetic relationships can be highlighted.

**Figure 3:** Bayesian tree resulting from the phylogenetic analysis of the concatenated dataset according the best-fit partitioning strategy. Robustness of nodes was indicated by the Clade Posterior Probability values (%). Boxes were drawn to gather species belonging to a group and the coloured name correspond to the colour box. Box with dotted line represent an undefined limit of group. Wings pictures of some species were added. Arrows link the wing picture with the species naming the group. Wings of species unplaced were surrounded with blue.



### *Phylogenetic relationships within the subgenus Avaritia*

Combined phylogenetic information from several distinct genes has given a ruling on the relationships within the subgenus and between species groups. Our results presented in Figure 3 support clearly the paraphyletic status between *Obsoletus* and *Imicola* groups. Wings patterns in Figure 3, illustrated the species naming the respective group, patterns from species represented in black boxes were not related to a group. Among the collected species, the *Obsoletus* group appeared as the most ancestral clade within the *Avaritia* subgenus. *Pusillus* group *sensu* Wirth and Hubert (1989) was described to be close to the *Orientalis* group, however with different morphological characters such as the second shaded radial cell and the hairy eyes. Based on our phylogenetic analysis, the clades *Orientalis* and *Grahami* groups were related by a CPP of 88%.

The species classified into the subgenus *Avaritia* with having the particular features of a second radial cell shaded and hairy eyes were phylogenetically discriminated. In one hand, the *Grahami* group gathering *C. actoni*, *C. grahami* and *C. pusillus*, and on the other hand *C. kanagai*. This later species is closer to *C. tororoensis* and *C. gulbenkiani* than the clade referred here as *Grahami* group with sharing the special feature of a second shaded radial cell (r2). *Culicoides tororoensis* and *C. gulbenkiani* are larger species than most of the *Avaritia* species with a shaded r2 (with r2 nervure of slightly for *C. gulbenkiani*), without interfacetal hairs, and are morphologically closely related with the particular feature of the presence of 3 pale spots in the fifth radial cell (r5). In Oriental region, *C. hui* has this latest feature but with a pale r2 on the half. This latest species, absent in this study, was linked to the *Orientalis* group based on morphology as described in (Meiswinkel, 2004) where the position of *C. gulbenkiani* and *C. tororoensis* as *Orientalis* group was not evaluated. Our phylogenetic results and personal observations of the dorsal pigmentation of the terga - given as discriminant character between *Orientalis* and *Imicola* group (Meiswinkel, 2004) - suggest the hypothesis they both belong to *Orientalis* group. However, the statistical support of this hypothesis was not very high with a CPP of 93%. The phylogeny within the *Orientalis* group need to be improved with further investigation including other species such as *C. hui*, *C. flavipunctatus*, *C. dumdumi*, *C. brosetti*, *C. dubitatus* and *C. trifasciellus*.

Several geographical variations have been observed and supported by CPP values of 100%. These variations concerned the following species between Oriental and Australasian region: *C. actoni*, *C. fulvus*, *C. brevipalpis* and *C. brevitarsis*. The *C. bolitinos* specimens originally from South Africa and La Reunion/Madagascar were also phylogenetically distinct. This

species seems to belong to a complex and would have to be studied deeper with more specimens from more populations to conclude whether these geographical divergences are explained by the existence of separate entities.

#### *Status of our C. nudipalpis specimens*

A major observation of our results remains the perfect molecular matching between specimens previously identified as *C. nudipalpis* and specimens of *C. imicola*. *Culicoides nudipalpis* is reported to be distributed in Indonesia, Philippines (Wirth et Hubert, 1989), China and Taiwan (Lien et al., 1998), whereas in the oriental region, *C. imicola* is mentioned in India, Laos, Sri Lanka and Thailand (Wirth et Hubert, 1989). Both species are always mentioned as morphologically closely related (Lien et al., 1998; Meiswinkel et Baylis, 1998; Wirth et Hubert, 1989). Meiswinkel and Baylis (1998) gave as a discriminant character for these two species the ratio of length of proboscis versus head (P/H ratio) which ranges from 0.82 to 1.02 for *C. imicola* and from 0.66 to 0.73 for *C. nudipalpis*. This latest study was robust for the number of *C. imicola* specimen studied (more than 100 from various locations), whereas *C. nudipalpis* was represented by only five specimens from two islands in the Philippines. Measurements of the P/H ratio for the three specimens of *C. nudipalpis* in hands for our study showed a proboscis length of 140.3, 154.1 and 144.9  $\mu\text{m}$  with respectively P/H ratio of 0.82, 0.90 and 0.87. When Lien (1998) gave as new record the presence of *C. nudipalpis* in Taiwan, he described this species by measuring eight females and one male from China and gave a P/H ratio of 0.68 which agreed with Wirth and Hubert (1989) and with Meiswinkel and Baylis (1998). But, in his discussion, Lien (1998) compared both species as “*C. (A.) nudipalpis* has a round pitlike area on the surface of the third palpal segment, but it lacks depth as in *C. (A.) imicola*” with no mention of the discriminant P/H ratio as it was published the same year. We think then our specimens of *C. nudipalpis* were misidentified and fit under *C. imicola* species and as a consequence, the distribution range of *C. imicola* was extended and both species were now present in a common area. In this case, *C. imicola* would probably be the most widely species distributed in the world with a range of around 77° of latitude (between South of France and South Africa) and 135° of longitude (between Senegal and Taiwan). A second consequence is the distribution of *C. nudipalpis* revised at China, Indonesia and Philippines.

#### *Taxonomic enlightenments and rearrangements*

The position of the *Obsoletus* group as a clade was phylogenetically identified with robustness including the 8 following species present in our study: *C. abchazicus*, *C.alachua*,



*C. chiopterus*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, *C. sanguisuga*, *C. scoticus* and *C. sinanoensis*. The Imicola group clade gathered the almost complete list given by Meiswinkel (2004): *C. bolitinos*, *C. brevitarsis*, *C. imicola*, *C. kwagga*, *C. loxodontis*, *C. miombo*, *C. pseudopallidipennis* and *C. tuttifrutti*.

We suggest that the Actoni and Pusillus groups were fused as a unique Grahami group which gathered *C. actoni*, *C. grahami* and *C. pusillus* supported by a robust CPP of 100%. Based on a similar well supported value, we propose to create a Boophagus group gathering *C. boophagus*, *C. suzukii* and *C. wadai*. Morphologically, we defined this group as having a 2<sup>nd</sup> median cell (m2) pale until wing margin, a pale area in distal part of the 1<sup>st</sup> median cell (m1) to connect the pale area on the distal part of m2 delimitating a quadrate dark spot on the distal part of the vein M2 (Figure 3).

As a perspective, the Orientalis group remains to be further investigated as in this study nodes were not highly well supported (CPP of 93%). Based on *C. gulbenkiani* and *C. tororoensis* personal morphological observations and based on the existence of *C. hui* as an intermediate species between these latter species and *C. orientalis*; this species could be placed part of the Orientalis group. Further intra-group Orientalis investigation with additional species not present in this study would improve the quality of our data and would be more informative for unaffiliated species. Species of Andicola group were endemic to high altitudes from 1,600 to 3,200m in the central and western ranges of the Andes (Rodriguez et Wirth, 1986; Spinelli et Borkent, 2004). Faced to their rarity and difficulty to access, no species belonging to Andicola group was included. Each specimen used were slide mounted in Canada balsam and kept in collection. A wider morphological study need to be implemented to complete the sensitivity of this study by comparing molecular and morphological data. In case of demonstration of a link between phylogeny and morphology, the phylogenetic status for rare species present in collections for which no molecular data exist could be investigated.

## Conclusions

The use of 5 distinct molecular markers belonging to nuclear, ITS1 and ITS2, or mitochondrial DNA, COI, COII and Cytb, had provided meaningful insights in relation with taxonomic studies and interesting directions for future studies. Newly studied for *Culicoides* phylogeny, the COII and Cytb genes appeared to be useful to investigate closely related species. The bayesian inference of the combined ITS1, ITS2, COI, COII and Cytb genes supported statistically (CPP=100%) the monophyletic status of the subgenus *Avaritia*. The

groups mentioned in this study represented monophyletic clades and the taxonomic rearrangement proposed was based on a phylogeny support. The *Obsoletus* group is shown to be the most ancestral group within the *Avaritia* and to be paraphyletic with the *Imicola* group. The revised group status of *Actoni* and *Pusillus* was in favour to create a unique named *Grahami* group and a *Boophagus* group is erected. The *Orientalis* group remains unclear and further investigations would be necessary to improve its definition based on phylogeny evidence. This study at a world scale, has allowed a better description of the subgenus *Avaritia* species and as such it constitutes a new step towards a global reassessment of the systematic and phylogenetics of the genus *Culicoides*.

### Acknowledgements

For making available numerous specimens and other useful material we are greatly indebted to X. Allève, J. Anderson, T. Baldet, D. Babary, G. Bellis, F. Biteau-Coroller, P. Boland, N. Brodskářa, M. Carrasquilla, C. Cotteaux, M. David, A. Desvard, M. Djerbal, I. Dusfour, A. Gerry, V. Glukhova, M. Goffredo, N. Grillet, N. Hunt, M. Keane, K. Labuschagne, F. Le Pont, Le Duc DO, J.C. Lien, R. Meiswinkel, B. Mullens, C. Ninio, N. Pagès, F. Pagès, M. Patakakis, C. Paupy, A. Przhiboro, N. Rahola, V. Robert, F. Schaffner, M. L. Setier-Rio, F. Simard, D.A. Swanson, R. Szadziwski, L. Tantely and M. H. Weng.

### References

- Beard, C.B., Hamm, D.M., Collins, F.H., 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol Biol* 2, 103-124.
- Beckenbach, A.T., Borkent, A., 2003. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Mol Phylogenet Evol* 27, 21-35.
- Besansky, N.J., Severson, D.W., Ferdig, M.T., 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends Parasitol* 19, 545-546.
- Blanton, F.S., Wirth, W.W., 1979. The sandflies (*Culicoides*) of Florida (Diptera: Ceratopogonidae). *Arthropods of Florida and Neighbouring Land Areas*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Gainesville, p. 204.
- Boorman, J., 1988. Taxonomic problems in *Culicoides* of southwest Asia, in particular of the Arabian peninsula, in: Service, M.W. (Ed.), *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Systematics Association, Special Volume No. 37, Clarendon Press, Oxford, pp. 271-282.
- Boorman, J., 1991. A review of *Culicoides* subgenus *Avaritia* species (Insecta, Diptera: Ceratopogonidae), vectors of viruses of sheep, cattle and horses, with particular reference to *Culicoides imicola* in Europe and the Mediterranean region. Report prepared for the Overseas Development Administration. The Natural History Museum, London, p. 54.
- Borkent, A., 2005. Chapter 10. The biting midges - The Ceratopogonidae (Diptera), in: Marquardt, W.C. (Ed.), *Biology and disease vectors*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, pp. 113-126.
- Borkent, A., Wirth, W.W., 1997. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull. Am. Natl. Hist. Mus.* 23, 1-257.
- Campbell, J.A., Pelham-Clinton, E.C., 1960. A taxonomic review of the british species of *Culicoides* Latreille (Diptera:

- Ceratopogonidae). Proc. R. Soc. Edinburgh 68, 181-302.
- Carpenter, S., Lunt, H.L., Arav, D., Venter, G.J., Mellor, P.S., 2006. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. J Med Entomol 43, 73-78.
- Clary, D.O., Wolstenholme, D.R., 1985. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J Mol Evol 22, 252-271.
- Dallas, J.F., Cruickshank, R.H., Linton, Y.M., Nolan, D.V., Patakakis, M., Braverman, Y., Capela, R., Capela, M., Pena, I., Meiswinkel, R., Ortega, M.D., Baylis, M., Mellor, P.S., Mordue Luntz, A.J., 2003. Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. Med Vet Entomol 17, 379-387.
- Dijkstra, E., van der Ven, I.J., Meiswinkel, R., Holzel, D.R., Van Rijn, P.A., 2008. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. Vet Rec 162, 422.
- Fox, I., 1955. A catalogue of the bloodsucking midges of the Americas (*Culicoides*, *leptoconops* and *lasiohelea*) with keys to the subgenera and nearctic species. Puerto Rico Univ. J. Agr., 214-285.
- Glick, J.I., 1990. *Culicoides* Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. Journal of Medical Entomology 27, 85-195.
- Glukhova, V., 1977. The subgeneric classification of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera, Ceratopogonidae), including morphological characters of the larva. Parazitologicheskii Sbornik 27, 112-118.
- Glukhova, V.M., 2005. *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) of Russia and adjacent lands. Dipterological Research 16, 75pp.
- Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2005. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera : Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. Systematic entomology, 13 pp.
- Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2006. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. Med Vet Entomol 20, 229-238.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol 27, 221-224.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol 59, 307-321.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A., Hebert, P.D., Hickey, D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends Genet 23, 167-172.
- Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 14812-14817.
- Hoffmann, B., Bauer, B., Bauer, C., Batza, H.J., Beer, M., Clausen, P.H., Geier, M., Gethmann, J.M., Kiel, E., Liebisch, G., Liebisch, A., Mehlhorn, H., Schaub, G.A., Werner, D., Conraths, F.J., 2009. Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. Emerg Infect Dis 15, 1481-1484.
- Katoh, K., Asiminos, G., Toh, H., 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. Methods Mol Biol 537, 39-64.
- Khamala, C.M., Kettle, D.S., 1971. The *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) of East Africa. Trans. R. ent. Soc. Lond. 123, 1-95.
- Kremer, M., 1965. Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. Encyclop. Ent. Serie A, Paris.
- Lien, J.C., Weng, M.H., Lin, C.C., 1998. A revision of the genus *Culicoides* in Taiwan Part. II. subgenus *Avaritia* (Diptera: Ceratopogonidae). J. Taiwan Mus. 51, 21-48.
- Linton, Y.M., Mordue Luntz, A.J., Cruickshank, R.H., Meiswinkel, R., Mellor, P.S., Dallas, J.F., 2002. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. Med Vet Entomol 16, 139-146.
- Maclachlan, N.J., Guthrie, A.J., 2010. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. Vet Res 41, 35.
- Mathieu, B., Perrin, A., Baldet, T., Delécolle, J.C., Albina, E., Cêtre-Sossah, C., 2007. Molecular identification of Western European Species of *Obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) by Internal Transcribed Spacer-1 rDNA Multiplex Polymerase Chain

- Reaction Assay. *J. Med. Entomol.* 44, 1019-1025.
- Matsumoto, Y., Yanase, T., Tsuda, T., Noda, H., 2009a. Characterization of internal transcribed spacer (ITS1)-ITS2 region of ribosomal RNA gene from 25 species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan. *J Med Entomol* 46, 1099-1108.
- Matsumoto, Y., Yanase, T., Tsuda, T., Noda, H., 2009b. Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Med Vet Entomol* 23, 47-55.
- Meiswinkel, R., 2004. Adult characters defining and separating the *Imicola* and *Orientalis* species complexes of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae). *Vet. Ital.* 40, 345-351.
- Meiswinkel, R., Baylis, M., 1998. Morphological confirmation of the separate species status of *Culicoides* (*Avaritia*) *nudipalpis* Delfinado, 1961 and *C. (A.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res* 65, 9-16.
- Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijts, P., Goffredo, M., 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec* 161, 564-565.
- Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P.S., Dallas, J.F., Mordue Luntz, A.J., Piertney, S.B., 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides* *obsoletus* and *Culicoides* *pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol* 124, 82-94.
- Pagès, N., Muñoz-Munoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C., Nunez, J.I., 2009. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Vet Parasitol* 165, 298-310.
- Pagès, N., Sarto I Montey, V., 2005. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera : Ceratopogonidae) based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I. *J. med. entomol.* 42, 1026-1034.
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., Vakalis, N.C., 2007. Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. *Med Vet Entomol* 21, 36-43.
- Perrin, A., Cêtre-Sossah, C., Mathieu, B., Baldet, T., Delécolle, J.C., Albina, E., 2006. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS-1rDNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology* 20, 219-228.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253-1256.
- Rodriguez, M.C., Wirth, W.W., 1986. A new species of man-biting *Culicoides* from the high Andes in Colombia (Diptera: Ceratopogonidae). *Florida Entomologist* 69, 311-314.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Saeung, A., Baimai, V., Otsuka, Y., Rattanaarithikul, R., Somboon, P., Junkum, A., Tuetun, B., Takaoka, H., Choochote, W., 2008. Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* Form A (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Parasitol Res* 102, 499-507.
- Scarpassa, V.M., Conn, J.E., 2006. Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi* sensu lato (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genet Mol Res* 5, 493-502.
- Schwenkenbecher, J.M., Mordue, A.J., Piertney, S.B., 2009a. Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bull Entomol Res* 99, 371-375.
- Schwenkenbecher, J.M., Mordue, A.J., Switek, K., Piertney, S.B., 2009b. Discrimination of *Culicoides* midge larvae using multiplex polymerase chain reaction assays based on DNA sequence variation at the mitochondrial cytochrome C oxidase I gene. *J Med Entomol* 46, 610-614.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Floors, P., 1994. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651-701.
- Smith, M.A., Woodley, N.E., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3657-3662.
- Spinelli, G.R., Borkent, A., 2004. New species of central America *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) with a synopsis of species from Costa Rica. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 106, 361-395.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Wirth, W.W., Dyce, A.L., Spinelli, G.R., 1988. An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *Culicoides*

(diptera:ceratopogonidae). *Contributions of the American Entomological Institute* 25, 71 pp.

Wirth, W.W., Hubert, A.A., 1989. The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 44, 1-508.

Wirth, W.W., Marston, N., 1968. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada Balsum. *Ann. Ent. Soc. America* 61, 783-784.

Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92, 371-373.

**Supplementary data:** List of specimens included in this study, along with their identification numbers (voucher code), countries and Genbank accession numbers for each DNA region. *rDNA* referred to sequences available for the ITS1-5.8S-ITS2 region together. *id*, referred to identical sequences removed from alignments of each gene for independent analysis (note that these specimens were not identical when genes considered as combined). At the end of this table, were the sequences from Genbank used in this study.

Species	Country	Voucher	COI	COII	Cytb	rDNA	Collector	Determinator	Reference
<i>C. (A.) abchazicus</i>	France	FRXY01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	C. Ninio	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) abchazicus</i>	France	FRXY02	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx	C. Ninio	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) actoni</i>	Australia	AUBR04	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) actoni</i>	Australia	AUBR05	xxxxxx	-	id	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) actoni</i>	Taiwan	TWSN01	xxxxxx	-	-	xxxxxx	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) actoni</i>	Taiwan	TWSN02	xxxxxx	-	-	-	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) actoni</i>	Taiwan	TWSN03	xxxxxx	-	xxxxxx	-	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) alachua</i>	United States (East)	USLN01	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	D.A. Swanson	D.A. Swanson	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	Madagascar	MGBN04	xxxxxx	-	xxxxxx	-	V. Robert	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	Reunion island	REBG01	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	Reunion island	REBG09	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	Reunion island	REBG10	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	Reunion island	REBG11	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	South Africa	ZAKW01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	South Africa	ZAKW02	xxxxxx	xxxxxx	id	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) bolitinos</i>	South Africa	ZAKW05	id	xxxxxx	id	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) boophagus</i>	Papua New Guinea	PGKR01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	P. Boland	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevipalpis</i>	Australia	AUKL01	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx	M. Keane	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevipalpis</i>	Australia	AUKL02	id	id	-	-	M. Keane	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevipalpis</i>	Australia	AUKL04	id	id	-	xxxxxx	M. Keane	G. Bellis	This study

<i>C. (A.) brevipalpis</i>	Australia	AUKL05	id	id	xxxxxx	xxxxxx	M. Keane	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Australia	AUBR01	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Australia	AUBR02	xxxxxx	id	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Australia	AUBR03	id	id	-	-	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Australia	AUBR08	xxxxxx	id	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Australia	AUBR09	id	xxxxxx	id	-	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Vietnam	VNMC23	xxxxxx	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) chiopterus</i>	France	FRPS28	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) chiopterus</i>	France	FRPS81	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) chiopterus</i>	France	FRVN01	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) chiopterus</i>	Russia	RUKR02	xxxxxx	-	-	-	N. Brodskaia	N. Brodskaia	This study
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Spain	ESBR01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	N. Pagès	N. Pagès	This study
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Spain	ESBR02	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	N. Pagès	N. Pagès	This study
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Spain	ESBR03	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	N. Pagès	N. Pagès	This study
<i>C. (A.) dewulfi</i>	France	FRFN01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) dewulfi</i>	France	FRMN01	id	id	id	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) dewulfi</i>	France	FRPS68	-	xxxxxx	xxxxxx	-		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) fulvus</i>	Australia	AUBR06	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) fulvus</i>	Australia	AUBR07	id	-	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) fulvus</i>	Vietnam	VNMC09	xxxxxx	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) fulvus</i>	Vietnam	VNMC10	id	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) fulvus</i>	Vietnam	VNMC11	id	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) fulvus</i>	Vietnam	VNMC17	xxxxxx	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) fulvus</i>	Vietnam	VNMC24	xxxxxx	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) grahamii</i>	Reunion island	REBG04	xxxxxx	-	-	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) grahamii</i>	Reunion island	REBG05	xxxxxx	-	-	xxxxxx	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study

<i>C. (A.) grahamii</i>	Reunion island	RECL01	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) grahamii</i>	Reunion island	RESR03	xxxxxx	-	-	xxxxxx	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	South Africa	ZAGR01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	South Africa	ZAGR02	xxxxxx	id	id	id		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	South Africa	ZAGR03	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	South Africa	ZAGR04	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	South Africa	ZAGR05	id	-	id	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Burkina faso	BFBB03	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	Fred SIMARD	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Benin	BJTR04	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Benin	BJTR05	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Benin	BJTR06	id	id	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Benin	BJTR12	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Cameroon	CMGB01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Cameroon	CMGB02	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Cameroon	CMGB03	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Cameroon	CMGB04	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Cameroon	CMGB06	xxxxxx	id	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Algeria	DZBZ03	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	M. Djerbal	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Algeria	DZBZ04	xxxxxx	id	id	-	M. Djerbal	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETFR01	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETFR02	-	id	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETFR03	xxxxxx	id	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETFR04	xxxxxx	id	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETFR05	xxxxxx	id	-	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETRM01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETRM02	xxxxxx	-	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study



<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETRM03	id	xxxxxx	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETRM07	xxxxxx	xxxxxx	-	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopia	ETRM08	xxxxxx	xxxxxx	-	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	France	FRPS17	-	-	xxxxxx	-		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	France	FRPS18	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	France	FRPS20	id	xxxxxx	xxxxxx	-		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	France	FRPS21	-	id	xxxxxx	-	B. Mathieu	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	France	FRRQ01	xxxxxx	xxxxxx	-	-	B. Mathieu	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Madagascar	MGBN01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	V. Robert	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Madagascar	MGBN02	id	id	xxxxxx	-	V. Robert	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Madagascar	MGBN08	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	V. Robert	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Mauritius	MUMD01	xxxxxx	xxxxxx	-	-	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Mauritius	MUMD02	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Mauritius	MUMD03	xxxxxx	xxxxxx	-	-	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Mauritius	MUPS23	-	-	xxxxxx	-	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Reunion island	RESP01	xxxxxx	xxxxxx	-	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Reunion island	RESP02	id	id	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Reunion island	RESP04	id	id	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	Reunion island	RESP05	id	id	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	South Africa	ZAPR01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	South Africa	ZAPR03	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	South Africa	ZAPR04	id	id	-	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) imicola</i>	South Africa	ZAPR05	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Taiwan	TWSN05	xxxxxx	-	xxxxxx	-	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Taiwan	TWSN06	xxxxxx	-	id	-	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Vietnam	VNMC01	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	Le Duc Do	B. Mathieu	This study

<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Vietnam	VNMC02	id	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Vietnam	VNMC03	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Vietnam	VNMC19	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Vietnam	VNMC20	xxxxxx	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Vietnam	VNMC21	id	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Vietnam	VNMC22	xxxxxx	-	xxxxxx	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) kanagai</i>	South Africa	ZAKR07	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Reunion island	REBG06	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Reunion island	REBG07	id	-	-	xxxxxx	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Reunion island	REBG08	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Reunion island	RESL01	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Reunion island	RESL02	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Reunion island	RESL03	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Reunion island	RESL04	xxxxxx	-	xxxxxx	-	A. Desvard	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) loxodontis</i>	South Africa	ZAKR01	xxxxxx	xxxxxx	-	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) loxodontis</i>	South Africa	ZAKR02	xxxxxx	id	-	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) loxodontis</i>	South Africa	ZAKR03	xxxxxx	xxxxxx	-	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) loxodontis</i>	South Africa	ZAKR11	xxxxxx	id	-	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Benin	BJTR02	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Benin	BJTR08	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Benin	BJTR09	xxxxxx	id	id	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Benin	BJTR11	id	-	id	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Cameroon	CMGB07	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Cameroon	CMGB09	xxxxxx	xxxxxx	id	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Cameroon	CMGB10	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Cameroon	CMGB11	id	xxxxxx	xxxxxx	-	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	This study

<i>C. (A.) miombo</i>	Madagascar	MGNR03	xxxxxx	-	-	-	L. Tantely	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Madagascar	MGNR04	-	-	xxxxxx	-	L. Tantely	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) miombo</i>	Madagascar	MGXX01	-	-	id	xxxxxx	L. Tantely	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) montanus</i>	Algeria	DZTZ01	xxxxxx	-	xxxxxx	-	M. Djerbal	J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) montanus</i>	France	FRPS29	-	-	xxxxxx	xxxxxx		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) montanus</i>	France	FRXX01	xxxxxx	-	xxxxxx	-		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) montanus</i>	France	FRXX02	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) montanus</i>	France	FRXX03	id	-	id	-		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) montanus</i>	Italy	ITLG01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx			This study
<i>C. (A.) montanus</i>	Italy	ITLG02	xxxxxx	xxxxxx	id	xxxxxx			This study
<i>C. (A.) montanus</i>	Italy	ITLG03	xxxxxx	xxxxxx	id	-			This study
<i>C. (A.) nudipalpis</i>	Taiwan	TWKN01	xxxxxx	-	xxxxxx	-	J.C. Lien	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) nudipalpis</i>	Taiwan	TWKN02	id	-	-	-	J.C. Lien	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) obscurus</i>	Australia	AUMN01	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx	J. Anderson	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) obscurus</i>	Australia	AUMN02	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx	J. Anderson	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) obscurus</i>	Australia	AUMN03	id	id	-	xxxxxx	J. Anderson	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Spain	ESBR04	xxxxxx	-	xxxxxx	-	N. Pagès	N. Pagès	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Spain	ESBR05	xxxxxx	-	xxxxxx	-	N. Pagès	N. Pagès	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	France	FRPS08	xxxxxx	-	-	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Algeria	FRPS25	-	-	xxxxxx	-		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	France	FRPS69	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	France	FRPS71	xxxxxx	-	id	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	France	FRPS73	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	France	FRPS75	xxxxxx	-	xxxxxx	-		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Norway	NOXX01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	F. Schaffner	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Norway	NOXX02	xxxxxx	-	xxxxxx	-	F. Schaffner	B. Mathieu	This study

<i>C. (A.) obsoletus</i>	United States (East)	USPC01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	D. Swanson	D. Swanson	This study
<i>C. (A.) orientalis</i>	Vietnam	VNMC12	xxxxxx	xxxxxx	-	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) orientalis</i>	Vietnam	VNMC14	xxxxxx	-	-	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) orientalis</i>	Vietnam	VNMC16	xxxxxx	-	-	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) orientalis</i>	Vietnam	VNMC25	xxxxxx	-	-	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) orientalis</i>	Vietnam	VNMC29	xxxxxx	-	-	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) orientalis</i>	Vietnam	VNMC30	id	xxxxxx	-	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>	Benin	BJTR13	xxxxxx	xxxxxx	-	xxxxxx	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>	Benin	BJTR14	id	id	xxxxxx	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>	Benin	BJTR17	id	-	id	-	T. Baldet	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) pusillus</i>	French Guyana	GFMC01	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	I. Dusfour	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) pusillus</i>	French Guyana	GFMC02	id	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	I. Dusfour	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) pusillus</i>	Guadeloupe	GPSL01	xxxxxx	-	-	xxxxxx		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) pusillus</i>	Guadeloupe	GPSL02	xxxxxx	-	-	-		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) pusillus</i>	Guadeloupe	GPSL03	xxxxxx	-	-	-		J.C. Delécolle	This study
<i>C. (A.) sanguisuga</i>	United States (East)	USRC01	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	D. Swanson	D. Swanson	This study
<i>C. (A.) sanguisuga</i>	United States (East)	USRC02	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	D. Swanson	D. Swanson	This study
<i>C. (A.) scoticus</i>	Spain	ESBR06	-	xxxxxx	-	xxxxxx	N. Pagès	N. Pagès	This study
<i>C. (A.) scoticus</i>	Spain	ESBR07	-	xxxxxx	-	-	N. Pagès	N. Pagès	This study
<i>C. (A.) scoticus</i>	France	FRPS70	-	xxxxxx	-	-		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) scoticus</i>	France	FRPS72	xxxxxx	id	xxxxxx	xxxxxx		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) scoticus</i>	France	FRPS74	xxxxxx	xxxxxx	-	-		B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) scoticus</i>	Norway	NOXX03	-	-	xxxxxx	-	F. Schaffner	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Russia	RUXX01	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	V. Glukhova	V. Glukhova	This study
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Russia	RUXX02	xxxxxx	-	xxxxxx	xxxxxx	V. Glukhova	V. Glukhova	This study
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Russia	RUXX03	xxxxxx	-	xxxxxx	-	V. Glukhova	V. Glukhova	This study

<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Russia	RUXX04	xxxxxx	-	-	-	V. Glukhova	V. Glukhova	This study
<i>C. (A.) suzukii</i>	Vietnam	VNMC07	xxxxxx	-	-	-	Le Duc Do	B. Mathieu	This study
<i>C. (A.) tainanus</i>	Taiwan	TWSN07	-	-	xxxxxx	-	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) tainanus</i>	Taiwan	TWSN08	xxxxxx	-	xxxxxx	-	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) tainanus</i>	Taiwan	TWSN09	id	-	xxxxxx	-	M.H. Weng	J.C. Lien	This study
<i>C. (A.) tororoensis</i>	South Africa	ZAKR04	xxxxxx	-	-	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) tororoensis</i>	South Africa	ZAKR09	xxxxxx	-	-	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) tororoensis</i>	South Africa	ZAKR10	id	-	-	-		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) tuttifrutti</i>	South Africa	ZAPR06	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		K. Labuschagne	This study
<i>C. (A.) wadai</i>	Australia	AUDG01	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) wadai</i>	Australia	AUDG02	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) wadai</i>	Australia	AUDG03	xxxxxx	id	xxxxxx	xxxxxx	N. Hunt	G. Bellis	This study
<i>C. (A.) actoni</i>	Japan	-	-	-	-	AB462259	-	-	Genbank
<i>C. (M.) arakawae</i>	Japan	-	NC009809	NC009809	NC009809	AJ489503	-	-	Genbank
<i>C. (A.) bolitinos</i>	South Africa	-	AF071929	-	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Japan	-	AB360995	AB360995	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (A.) brevipalpis</i>	Japan	-	AB360998	AB360998	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (T.) humeralis</i>	Japan	-	AB360993	AB360993	-	AB462282	-	-	Genbank
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Japan	-	AB360991	AB360991	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (A.) kwagga</i>	South Africa	-	AF069237	-	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (A.) loxodontis</i>	South Africa	-	AF069235	-	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (A.) loxodontis</i>	South Africa	-	AF069236	-	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (A.) tainanus</i>	Japan	-	AB360987	-	-	AB462263	-	-	Genbank
<i>C. (T.) matsuzawai</i>	Japan	-	AB364649	AB364649	-	AB462283	-	-	Genbank
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>	Côte d'Ivoire	-	AY286329	-	-	-	-	-	Genbank
<i>C. (A.) tuttifrutti</i>	South Africa	-	AF069244	-	-	-	-	-	Genbank

<i>C. (A.) tuttifrutti</i>	South Africa	-	AF069245	-	-		-	-	Genbank
<i>C. (A.) wadai</i>	Japan	-	AB360997	AB360997	-		-	-	Genbank

### 3. Conclusion

Cette étude de phylogénie moléculaire chez les *Culicoides* présente comme caractéristique originale l'utilisation de 2 régions nucléaires (ADNr) et de 3 régions mitochondriales (ADNmt) pour des espèces collectées à une échelle mondiale. Les régions ITS1 et ITS2 de l'ADNr présentent une bonne résolution phylogénétique permettant de décrire les nœuds profonds et à l'inverse, une puissance limitée voire nulle quant à la discrimination d'espèces cryptiques. Les régions COI, COII et Cytb de l'ADNmt montrent un signal phylogénétique moins fort pour décrire la topologie basale des arbres mais un signal plus puissant que les régions ITS pour décrire les nœuds terminaux pour la discrimination des espèces cryptiques. La combinaison et l'analyse des cinq marqueurs en un seul jeu de données a permis d'obtenir une reconstruction phylogénétique qui maximise la puissance de chaque marqueur en minimisant leurs faiblesses. La reconstruction en suivant une approche bayésienne et en considérant un jeu de données partitionné, ADNmt et ADNr a permis d'obtenir une topologie fortement soutenue sur la majorité des nœuds.

L'analyse de près de 40% de la faune mondiale des espèces du sous-genre *Avaritia* présente un sous-genre monophylétique statistiquement supporté (CPP=100%). Les 14 espèces vectrices de virus ne sont pas regroupées dans un seul et même clade ce qui aurait pu suggérer une certaine spécialisation virus/vecteur. Le clade des espèces du groupe *Obsoletus* correspond à la radiation la plus basale du sous-genre. Ce dernier est clairement paraphylétique avec le clade des espèces du groupe *Imicola* (CCP=100%).

La révision systématique propose de rassembler les espèces des groupes *Actoni* et *Pusillus* en un seul groupe *Grahami* défini comme un clade monophylétique robuste (CPP=100%). Ce travail propose également la création du groupe *Boophagus* sur la base d'une phylogénie robuste des espèces. Il est défini pour les femelles comme suit : 2<sup>ème</sup> cellule médiane (m2) avec une tâche claire s'étendant jusqu'au bord distal de l'aile, une tâche claire dans la partie distale de m1 qui s'étend jusque dans la partie distale de m2 formant ainsi une tâche sombre carrée sur la partie distale de la nervure M2 (Figure 12). Les mâles n'ayant pas été collectés, une étude future devra en préciser les caractéristiques morphologiques distinctives.



Figure 12 : Caractère alaire des espèces du groupe Boophagus.

Le groupe Orientalis n'est pas soutenu (CPP=93%). Ce groupe semble complexe, en effet, des éléments morphologiques et phylogénétiques semblent en faveur d'une intégration des espèces telles que *C. gulbenkiani*, *C. tororoensis*. Des investigations futures incluant l'ajout d'espèces non représentées ici telles que *C. hui*, *C. flavipunctatus*, *C. dumdumi*, *C. brosetti*, *C. dubitatus* et *C. trifasciellus* permettraient de préciser la composition de ce groupe et sa position phylogénétique par rapport aux autres. Les espèces du groupe Andicola, rares et endémiques aux hautes altitudes des Andes n'ont pu être incluses dans ce travail.



# Chapitre 6 : Clé d'identification interactive

*Cette clé interactive a été initiée dans le cadre du programme financé par la commission européenne MedReoNet<sup>23</sup>.*

Toutes les clés dichotomiques développées jusqu'ici chez les *Culicoides* sont remarquables mais n'ont pas été actualisées depuis leurs éditions avec les espèces nouvellement décrites et les espèces tombées en synonymie depuis leurs descriptions. De plus, la nomenclature de ces clés n'est pas adaptée à un novice en taxonomie, le *jargon* taxonomique utilisé est peu encourageant et une clé non illustrée écrite dans un style télégraphique riche en abréviations taxonomiques semble inaccessible. Premièrement pensées et réalisées par des spécialistes en taxonomie, l'utilisation de ces clés était bien souvent réservée et accessible aisément aux experts taxonomistes. Parmi les auteurs des principales clés dichotomiques existantes (Campbell et Pelham-Clinton, 1960; Forrattini, 1957; Glick, 1990; Glukhova, 2005; Khamala et Kettle, 1971; Kremer, 1965; Wirth et Hubert, 1989), seul Glukhova (2005) a rédigé en anglais une mise à jour de la faune et de la clé associée publiée précédemment en russe (Glukhova, 1989). Cet unique cas illustre bien là la difficulté de l'exercice de mise à jour de ce type de clé.

Au cours de la dernière décennie, le développement d'internet et des systèmes assistés par ordinateur a mis entre les mains des taxonomistes des outils puissants de diffusion des connaissances taxonomiques entre autres. Le développement de clés interactives a ainsi pu voir le jour. Comme présenté dans la partie « état des connaissances », ce type de clé a de multiples avantages et n'avait pas été développé pour la famille des Ceratopogonidae.

Dans ce cadre, une clé interactive multi-entrée nommée IIKC (Interactive Identification Key for *Culicoides*) a été développée.

---

<sup>23</sup> Surveillance network of Reoviruses, Bluetongue and African Horse Sickness, in the Mediterranean basin. FP6-2005-SSP-5-A

## 1. Approche méthodologique

Dans le cadre de cette thèse, la limite géographique de la région Ouest paléarctique a été choisie pour plusieurs raisons. D'une part, traiter la faune mondiale des 1300 espèces de *Culicoides* aurait grandement complexifié l'approche pour développer une première clé interactive dont les difficultés de validation restaient encore à apprécier. D'autre part, la récente émergence de la FCO en Europe et autour du bassin méditerranéen a soulevé le manque d'outils d'identification avec un réel besoin spécifique pour la région Ouest paléarctique. Ainsi la région Ouest paléarctique constitue une bonne base de travail à échelle raisonnable. Affiché comme un des objectifs du projet européen MedReoNet, le développement d'outils d'identification morphologique a fait l'objet d'un séminaire de taxonomie du genre *Culicoides* organisé à Strasbourg en Mars 2009 avec la participation de taxonomistes internationaux. Le choix des caractères et des états morphologiques permettant de décrire la faune Ouest Paléarctique a été discuté et validé au cours de ce séminaire par 27 entomologistes représentant 14 pays. Le compte rendu de ce colloque est présenté en annexe 10.

La clé d'identification interactive repose sur une base de connaissances taxonomiques éditée à l'aide du logiciel Xper<sup>2</sup> développé par le laboratoire d'informatique et de systématique (LIS) du MNHN, Paris qui génère lui-même automatiquement la clé. A titre d'exemple, l'interface d'édition des taxa est représentée pour l'espèce *C. imicola* (Figure 13). Après avoir édité les descripteurs et les taxa, l'interface d'édition permet pour chaque taxon (*Items* à gauche) de coder pour chaque descripteur (*Descriptors* au centre) les états de caractères (*States* à droite).

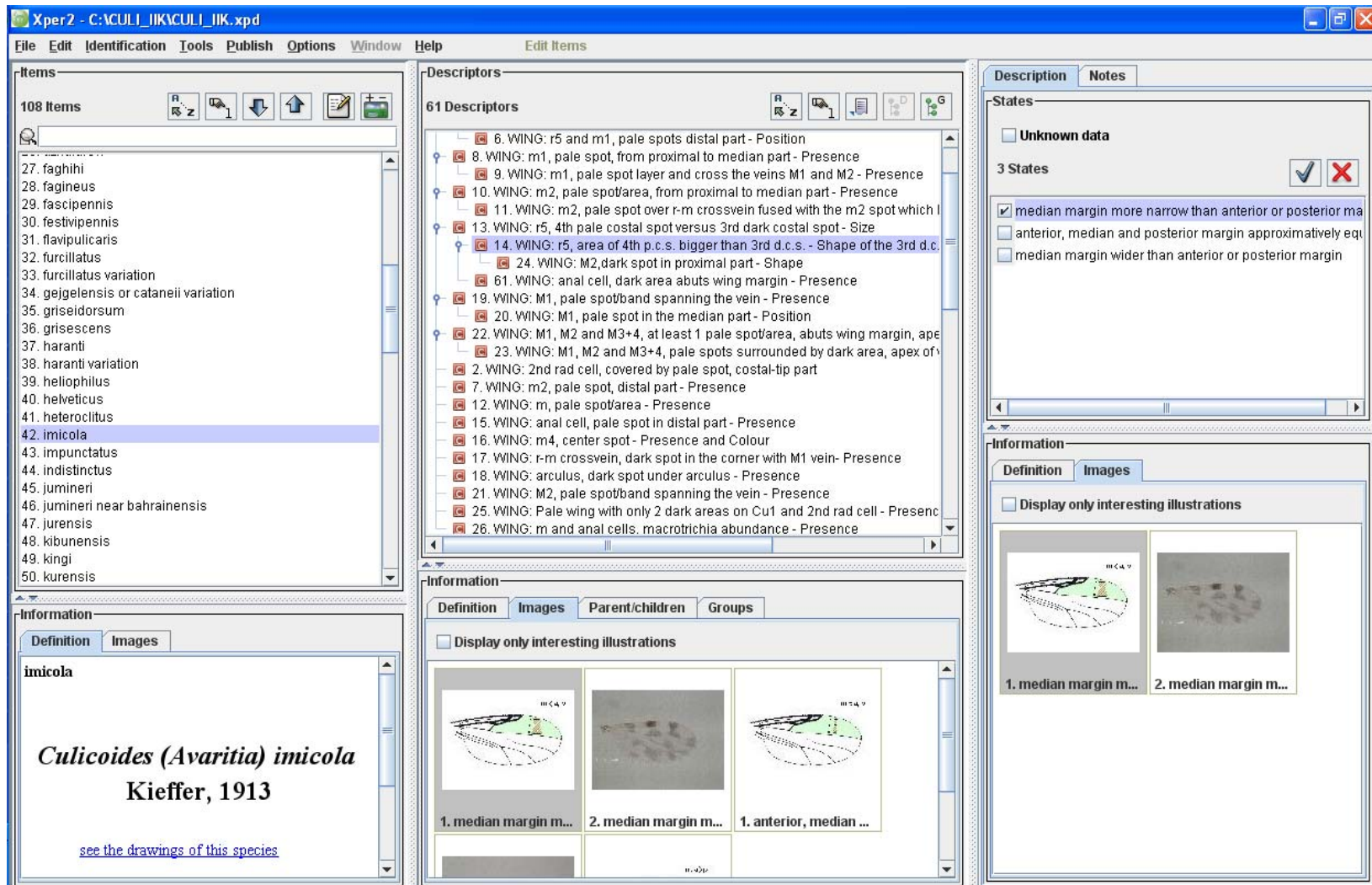


Figure 13 : Capture écran du logiciel Xper2 en mode édition des taxa.

Un site internet dédié à la diffusion de la clé est en ligne à l'adresse [www.iikculicoides.net](http://www.iikculicoides.net)

Un assistant d'installation est développé pour automatiser l'installation et la désinstallation d'IKC sur un ordinateur local (Figure 14). Trois documents d'aide sont produits sur comment ouvrir la base de données (annexe 11), comment utiliser la clé (annexe 12) et comment observer les caractères (annexe 13).

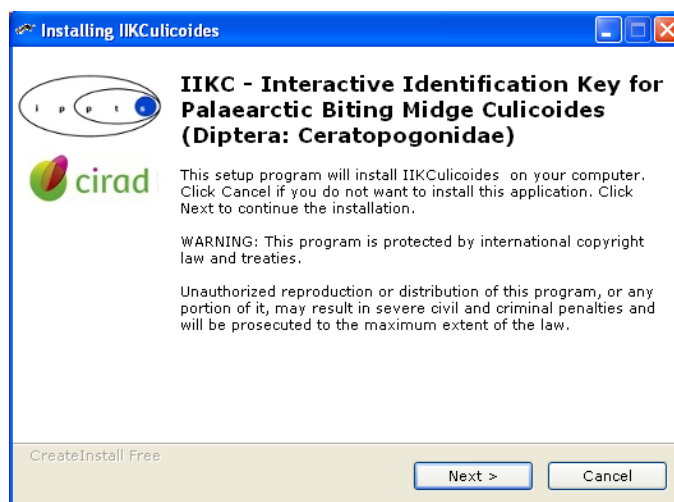


Figure 14 : Capture écran de l'assistant d'installation de IIC développé à l'aide du logiciel CreateInstall v5.6.0. (Gentee inc., Russie).

En plus du site internet, la clé a été présentée lors de 3 communications orales avec actes de congrès aux différentes étapes de sa construction.

Le développement et la validation de cette clé d'identification sont présentés sous forme d'un article très prochainement soumis dans le journal *Parasites and vectors*.

## 2. Résultats

**Development and validation of IIKC: an interactive identification e tool for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region.**

Bruno MATHIEU<sup>ad\*</sup>, Catherine CÊTRE-SOSSAH<sup>b</sup>, Claire GARROS<sup>b</sup> David CHAVERNAC<sup>b</sup>, Thomas BALENGHIEN<sup>b</sup>, Simon CARPENTER<sup>c</sup>, Marie-Laure SETIER-RIO<sup>d</sup>, Régine VIGNESLEBBE<sup>e</sup>, Visotheary UNG<sup>e</sup>, Ermanno CANDOLFI<sup>a</sup>, and Jean-Claude DELÉCOLLE<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IPPTS, Université de Strasbourg, EA 4438, 67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup> CIRAD, UMR Contrôle des maladies, 34398 Montpellier, France

<sup>c</sup> Institute for Animal Health, Pirbright, GU24 0NF, United Kingdom

<sup>d</sup> EID Méditerranée, 34184 Montpellier, France

<sup>e</sup> UMR 7207 CNRS-MNHN-Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

\* Corresponding author: iikculicoides@gmail.com

**Abstract**

*Background:*

The appearance of bluetongue virus (BTV) in 2006 within northern Europe exposed a lack of expertise and resources available across this region to enable the accurate morphological identification of *Culicoides* biting midges, the major vector of this pathogen, to species level. This work aims to organise extant *Culicoides* taxonomic knowledge into a database and subsequently to produce an interactive identification key for females of *Culicoides* in the Western Palaearctic (IIKC: Interactive identification key for *Culicoides*). We then validate IIKC using a ring trial carried out by entomologists based in this region with a variable degree of experience in identifying *Culicoides*.

*Results:* The current version of the key includes 98 *Culicoides* species with 10 morphological variants, 61 descriptors and 837 pictures and schemes. Validation was carried out by 6 entomologists as a blind ring trial with two users allocated to three classes of expertise (beginner, intermediate and advanced). Slides were identified using a median of seven steps and seven minutes and user confidence in the identification varied from 60% for failed identifications to a maximum of 80% for successful ones. By user class, the beginner group successfully identified 44.6% of slides, the intermediate 56.8% and the advanced 74.3%.

*Conclusions:* Structured as a multi-entry key, IIKC is a powerful database for the morphological identification of female *Culicoides* from the Western Palaearctic region. First developed to be used as an interactive identification key, it was revealed to be a powerful back-up tool for training new taxonomists and to maintain expertise level. The development of tools for arthropod involvement in pathogen transmission will allow clearer insights into the ecology and dynamics of *Culicoides* and in turn assist in understanding arbovirus epidemiology.

**Keywords:** multi-entry key, identification key, interactive key, bluetongue, African horse sickness, *Culicoides*, vectors.

## **Introduction**

During the last decade, the decline of fundamental entomological taxonomic expertise has become an increasing concern worldwide and has impacted directly upon disciplines as diverse as biodiversity conservation (Agosti, 2006), medical and veterinary entomology (Cuisance et Rioux, 2004; Oliver, 1988) and pest management (Song, 2010). The correct classification of subject species is a vital prerequisite to any biological study and is a primary requirement for comparability across studies. Despite this, morphological taxonomy, which is by far the most commonly used means of identification used by biologists worldwide, receives relatively little financial support.

Ideally, identification of a biological specimen can be conducted using direct comparison with existing named specimens, including the original type. This comparative approach is feasible only when type locality is known accurately, the original specimen has been suitably preserved, and species description written in easy-access articles. While this is possible in larger institutions with a long track record of experimentation on a specific taxon, it is more common for the specimen to be compared to written descriptions and whatever identifying material (e.g. photographs, diagrams etc), is available through previously published work. The power of identification of groups of related organisms through the use of contrasting statements concerning morphological characters, also known as identification keys, was first realised by Lamarck (1778).

The development of electronic communications has revolutionised taxonomy worldwide, initially through facilitating contact between workers worldwide and more recently by allowing the open-access publication of taxonomic data. In addition, a large number of interactive keys allowing accurate identification of vector species and groups are increasingly

available, either by downloading or directly through websites (e.g. Phlebotomine sandflies key (Vignes-Lebbe et Gallut, 1997) tsetse flies (Brunhes *et al.*, 2009) and mosquitoes (Schaffner *et al.*, 2001)). These not only allow direct sharing of information, but also provide a powerful training tool where specialised expertise is otherwise reliant upon single individuals.

The recent unprecedented bluetongue virus (BTV) outbreaks in Western Europe illustrates how a relatively neglected arthropod vector group can rapidly increase in interest. BTV causes bluetongue (BT), a disease that affects wild and domestic ruminants, and the virus is biologically transmitted almost entirely by competent *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). At the time of introduction of BTV in 2006, the number of groups working on *Culicoides* in northern Europe was small. Following the incursion, there was a substantial need to rapidly train workers in *Culicoides* taxonomy and this was in part accomplished through the use of online resources (e.g. [www.culicoides.net](http://www.culicoides.net)) and direct training by the limited number of experts available. It was clear, however, that improvements could be made to this system from the following observations: (1) many workers had difficulty in identifying the diversity of *Culicoides* present at sites (particularly those species that did not fall within what were perceived to be the main vector groups), (2) many lacked either appropriate identification tools, or did not know where to find them (3) there was a lack of continuity and succession planning in preserving skills in taxonomy within countries preventing capacity building in *Culicoides* taxonomy (2010).

In the case of the Western Palaearctic biting midge fauna, Campbell & Pelham-Clinton (Campbell et Pelham-Clinton, 1960) and Kremer (Kremer, 1965) (in French) contain the only dichotomous keys covering a wide range of species. In addition, Delécolle (Delécolle, 1985) (in French) published revised version of Kremer (Kremer, 1965) for a limited number of species fauna from the Northeast of France. At present these keys cover only very restricted areas, are not updated on new synonyms between junior and senior names and new species identified since their publication and are entirely dichotomous, limiting their use for non specialists. The aim of this work, therefore is to organise extant taxonomic knowledge for the Western Palaearctic into a database in order to create the first Interactive Identification Key (IIKC) for *Culicoides* females. A ring trial was then organized with 37 slides representing 34 species, which were then sent to six users from three different institutes and with different levels of expertise, with the objective of defining the descriptors required for accurate identification and evaluating the importance and efficiency of the key. The freely shared e-taxonomy

knowledge is discussed as a powerful tool to fill in the current taxonomic impediment to progress in understanding *Culicoides* ecology and hence arbovirus epidemiology.

## Materials and Methods

### *Biological material, illustrations and choice of descriptors*

Taxonomic information was collated from 98 slide-mounted *Culicoides* (table 1). Twenty of these species were characterised from types preserved in the Callot and Kremer collection, (Strasbourg, France). *Culicoides paradisionensis* was obtained from the type specimen of the Delécolle collection (Strasbourg, France), whereas the 77 others species were observed from slides kept in collection at IPPTS, (Strasbourg, France). To ensure a reliable key, uncertainty due to intraspecific variation in morphology was avoided by coding descriptors as polymorphic to ensure users did not discard the species erroneously. For ten species (mentioned as \* in table 1), the documented presence of a wide range of morphological variation led us to create a second entity of a species called a *variation*.

**Table 1.** List of the 98 species represented in IIKC. The species marked as \* are divided in two taxonomic entities: a typical form and a morphological variant form. The species annotated with *c* were observed from types of the Callot and Kremer collection and *d* for a type of the Delécolle collection. All others species were observed from specimens of the Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, France. CH, Switzerland; DZ, Algeria; FR, France; IT, Italia; KZ, Kazakhstan; MA, Morocco; TN, Tunisia.

Species	Type	Country
<i>C. (Avaritia) chiopterus</i> (Meigen, 1830)	-	FR
<i>C. (Avaritia) dewulfi</i> Goetghebuer, 1936	-	FR
<i>C. (Avaritia) imicola</i> Kieffer, 1913	-	FR
<i>C. (Avaritia) montanus</i> Shakirzjanova, 1962	-	FR
<i>C. (Avaritia) obsoletus</i> (Meigen, 1818) / <i>C. (A.) scoticus</i> Downes and Kettle, 1952	-	FR
<i>C. (Beltranmyia) circumscriptus</i> Kieffer, 1918	-	FR
<i>C. (Beltranmyia) desertorum</i> Gutsevich, 1959	-	KZ
<i>C. (Beltranmyia) salinarius</i> Kieffer, 1914	-	FR
<i>C. (Beltranmyia) sphagnumensis</i> Williams, 1955	<i>c</i>	FR
<i>C. (Culicoides) deltus</i> Edwards, 1939	-	FR
<i>C. (Culicoides) fagineus</i> Edwards, 1939	-	FR
<i>C. (Culicoides) flavipulcaris</i> Dzhafarov, 1964	-	FR
<i>C. (Culicoides) griseescens</i> Edwards, 1939	-	FR
<i>C. (Culicoides) impunctatus</i> Goetghebuer, 1920	-	FR
<i>C. (Culicoides) lupicaris</i> Downes and Kettle, 1952	-	FR
<i>C. (Culicoides) newsteadi</i> Austen, 1921	-	FR
<i>C. (Culicoides) pulcaris</i> (Linnaeus, 1758)	-	FR



Table 1 - Continue

Species	Type	Country
<i>C. (Culicoides) punctatus</i> (Meigen, 1804)	-	FR
<i>C. (Culicoides) remmi</i> Damian-Georgescu, 1972	-	IT
<i>C. (Culicoides) subfagineus</i> Delécolle and Ortega, 1998	-	FR
<i>C. (Monoculicoides) nubeculosus</i> (Meigen, 1830)	-	FR
<i>C. (Monoculicoides) parroti</i> Kieffer, 1922	-	FR
<i>C. (Monoculicoides) puncticollis</i> (Becker, 1903)	-	FR
<i>C. (Monoculicoides) riethi</i> Kieffer, 1914	-	FR
<i>C. (Monoculicoides) stigma</i> (Meigen, 1818)	-	FR
<i>C. (Oecacta) kingi</i> Austen, 1912	-	DZ
<i>C. (Pontoculicoides) saevus</i> Kieffer, 1922	-	DZ
<i>C. (Pontoculicoides) sejfadinei</i> Dzhafarov, 1958	-	DZ
<i>C. (Pontoculicoides) tauricus</i> Gutsevich, 1959	-	FR
<i>C. (Silvaticulicoides) achrayi</i> Kettle and Lawson, 1955	-	FR
<i>C. (Silvaticulicoides) fascipennis</i> (Staeger, 1839)	-	FR
<i>C. (Silvaticulicoides) pallidicornis</i> Kieffer, 1919	-	FR
<i>C. (Silvaticulicoides) picturatus</i> Kremer and Dedit, 1961	-	FR
<i>C. (Silvaticulicoides) subfascipennis</i> Kieffer, 1919	*	FR
<i>C. (Synhelea) corsicus</i> Kremer, Leberre and Beaucournu-S., 1971	c	FR
<i>C. (Synhelea) marclei</i> Callot, Kremer and Basset, 1968	-	DZ
<i>C. (Wirthomyia) minutissimus</i> (Zetterstedt, 1855)	-	FR
<i>C. (Wirthomyia) reconditus</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960	-	FR
<i>C. (Wirthomyia) riouxi</i> Callot and Kremer, 1961	-	FR
<i>C. (Wirthomyia) segnis</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960	-	FR
<i>C. alazanicus</i> Dzhafarov, 1961	c	FR
<i>C. albicans</i> (Winnertz, 1852)	-	FR
<i>C. albihalteratus</i> Goetghebuer, 1935	c	FR
<i>C. algeriensis</i> Clastrier, 1957	-	DZ
<i>C. azerbajdzhanicus</i> Dzhafarov, 1962	-	DZ
<i>C. begueti</i> Clastrier, 1957	*	FR
<i>C. brunnicans</i> Edwards, 1939	*	FR
<i>C. cameroni</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960	-	FR
<i>C. cataneii</i> Clastrier, 1957	-	FR
<i>C. caucoliberensis</i> Callot, Kremer, Rioux and Descous, 1967	c	FR
<i>C. clastrier</i> Callot, Kremer and Dedit, 1962	c	FR
<i>C. clintoni</i> Boorman, 1984	-	FR
<i>C. comosioculatus</i> Tokunaga, 1956	-	FR
<i>C. dendriticus</i> Boorman, 1976	-	FR
<i>C. derisor</i> Callot and Kremer, 1965	c	FR

Table 1 - Continue

Species	Type	Country
<i>C. duddingstoni</i> Kettle and Lawson, 1955	-	FR
<i>C. dzhafarovi</i> Remm, 1967	<i>c</i>	FR
<i>C. faghihi</i> Navai, 1971	-	DZ
<i>C. festivipennis</i> Kieffer, 1914	*	FR
<i>C. furcillatus</i> Callot, Kremer and Paradis, 1962	<i>c</i>	FR
<i>C. gejjelensis</i> Dzhafarov, 1964	-	FR
<i>C. griseidorsum</i> Kieffer, 1918	-	FR
<i>C. haranti</i> Rioux, Descous and Pech, 1959	*	FR
<i>C. heliophilus</i> Edwards, 1921	-	FR
<i>C. helveticus</i> Callot, Kremer and Deduit, 1962	<i>c</i>	CH
<i>C. heteroclitus</i> Kremer and Callot, 1965	<i>c</i>	FR
<i>C. indistinctus</i> Khalaf, 1961	-	FR
<i>C. jumineri</i> Callot and Kremer, 1969	* <i>c</i>	TN
<i>C. jurensis</i> Callot, Kremer and Deduit, 1962	<i>c</i>	FR
<i>C. kibunensis</i> Tokunaga, 1937	-	FR
<i>C. kurensis</i> Dzhafarov, 1960	-	FR
<i>C. landauae</i> Kremer, Rebholtz-Hirtzel and Bailly-Choumara, 1975	-	MA
<i>C. langeroni</i> Kieffer, 1921	-	DZ
<i>C. longipennis</i> Khalaf, 1957	-	FR
<i>C. maritimus paucisensillatus</i> Callot, Kremer and Rioux, 1963	* <i>c</i>	FR
<i>C. malevillei</i> Kremer and Coluzzi, 1971	<i>c</i>	FR
<i>C. maritimus</i> Kieffer, 1924	*	FR
<i>C. odiatus</i> Austen, 1921	*	FR
<i>C. pallidus</i> Khalaf, 1957	-	DZ
<i>C. paolae</i> Boorman, 1996	-	FR
<i>C. paradisionensis</i> Boorman, 1988	<i>d</i>	FR
<i>C. pictipennis</i> (Staeger, 1839)	-	FR
<i>C. poperinghensis</i> Goetghebuer, 1953	-	FR
<i>C. pseudolangeroni</i> Kremer, Chaker and Delecolle, 1981	-	DZ
<i>C. pseudopallidus</i> Khalaf, 1961	-	DZ
<i>C. ravus</i> de Meillon, 1936	-	DZ
<i>C. riebi</i> Delécolle, Mathieu, and Baldet, 2005	-	FR
<i>C. sahariensis</i> Kieffer, 1923	<i>c</i>	FR
<i>C. santonicus</i> Callot, Kremer, Rault and Bach, 1966	* <i>c</i>	FR
<i>C. semimaculatus</i> Clastrier, 1958	-	FR
<i>C. sergenti</i> Kieffer, 1921	-	DZ
<i>C. shaklawensis</i> Khalaf, 1957	-	FR
<i>C. simulator</i> Edwards, 1939	-	FR

*Table 1 - End*

Species	Type	Country
<i>C. submaritimus</i> Dzhafarov, 1962	-	FR
<i>C. truncorum</i> Edwards, 1939	<i>c</i>	FR
<i>C. univittatus</i> Vimmer, 1932	<i>c</i>	FR
<i>C. vexans</i> (Staeger, 1839)	-	FR
<i>C. vidourlensis</i> Callot, Kremer, Molet and Bach, 1968	<i>c</i>	FR

Morphological characters were imaged using a Zeiss® microscope equipped with a Motic® camera, and were processed with the Gimp© editor version 2.6.2. The list of morphological characters (table 2) and state of characters were chosen through discussion with international experts at a meeting on *Culicoides* taxonomy in Strasbourg in 2009 ([http://medreonet.cirad.fr/news/2009\\_taxonomy](http://medreonet.cirad.fr/news/2009_taxonomy)). A total of 73 taxa were characterised with 434 images (5.9 pictures/taxon) and 71 additional diagrams were also produced. Six rare taxa were not illustrated because of the poor quality of the specimens available. Among the 61 descriptors used, 60 were morphological characters (27 on the wings, 14 on the abdomen, 16 on the head and 3 on the legs) and one only referred to the known geographic distribution (table 2). The geographical descriptor was based on record publications and included the 16 countries gathered around a European project (<http://medreonet.cirad.fr/>): Algeria, Belgium, Denmark, France, Germany, Greece, Italy, Morocco, Netherlands, Portugal, Spain, Sweden, Switzerland, Tunisia, Turkey and the United Kingdom.

**Table 2.** Descriptors and descriptor code used for IIC. Concerning wing descriptors, the lower-case *r* and *m* referred to respectively radial and median cells and the upper-case *M* and *Cu* to the median and cubital nervures.

Descriptors	code
WING: Pale or dark spots - Presence	W01
WING: 2nd rad cell, covered by pale spot, costal-tip part	W02
WING: r5 and m1, pale spots, distal part - Presence	W03
WING: r5 and m1, pale spots, distal part - Size	W04
WING: r5 and m1, pale spots, distal part - Connection	W05
WING: r5 and m1, pale spots distal part - Position	W06
WING: m2, pale spot, distal part - Presence	W07
WING: m1, pale spot, from proximal to median part - Presence	W08
WING: m1, pale spot layer and cross the veins M1 and M2 - Presence	W09
WING: m2, pale spot/area, from proximal to median part - Presence	W10
WING: m2, pale spot over r-m crossvein fused with the m2 spot which layers and crosses vein M2 - Presence	W11
WING: m, pale spot/area - Presence	W12
WING: r5, 4th pale costal spot (p.c.s.) versus 3rd dark costal spot (d.c.s.) - Size	W13
WING: r5, area of 4th p.c.s. bigger than 3rd d.c.s. - Shape of the 3rd d.c.s.	W14

*Table 2 - Continue*

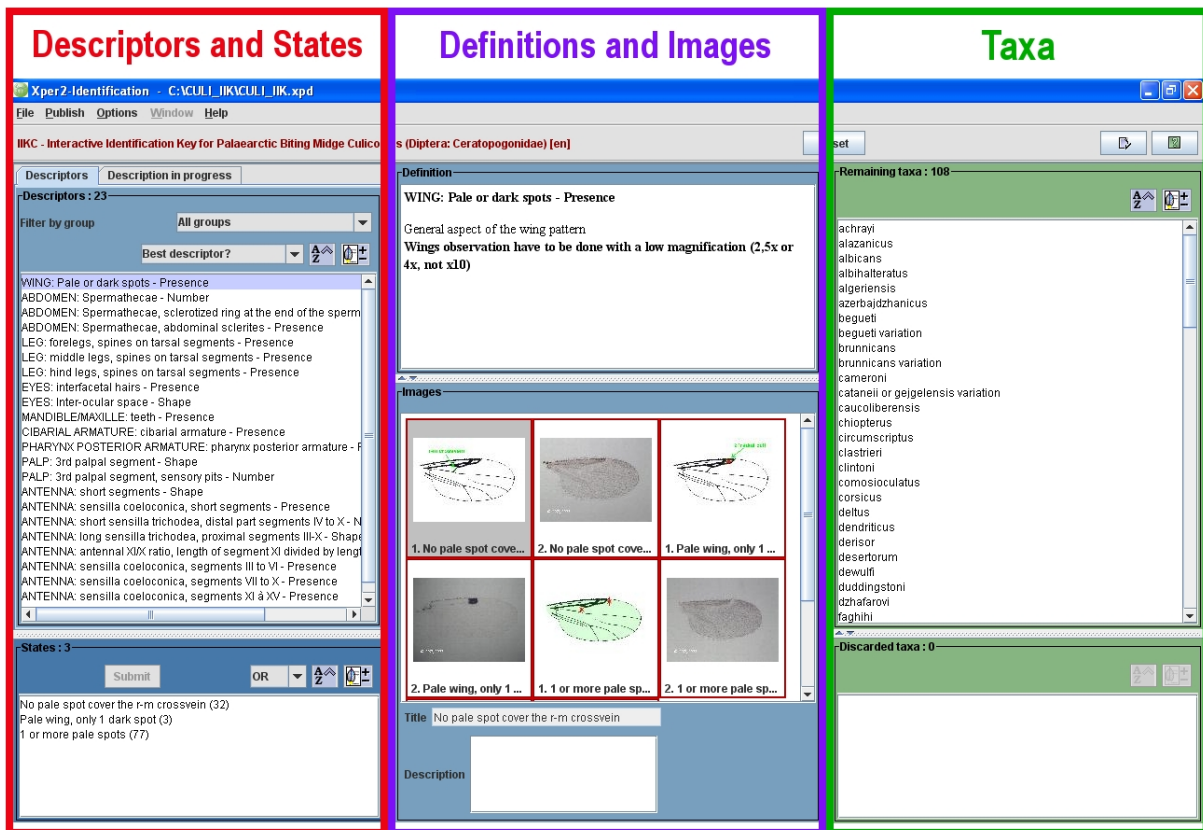
Descriptors	code
WING: anal cell, pale spot in distal part - Presence	W15
WING: m4, center spot - Presence and Colour	W16
WING: r-m crossvein, dark spot in the corner with M1 vein- Presence	W17
WING: arculus, dark spot under arculus - Presence	W18
WING: M1, pale spot/band spanning the vein - Presence	W19
WING: M1, pale spot in the median part - Position	W20
WING: M2, pale spot/band spanning the vein - Presence	W21
WING: M1, M2 and M3+4, at least 1 pale spot/area, abuts wing margin, apex of veins in distal part - Presence	W22
WING: M1, M2 and M3+4, pale spots surrounded by dark area, apex of veins - Shape	W23
WING: M2, dark spot in proximal part - Shape	W24
WING: Pale wing with only 2 dark areas on Cu1 and 2nd rad cell - Presence	W25
WING: m and anal cells, macrotrichia abundance - Presence	W26
WING: anal cell, dark area abuts wing margin - Presence	W27
ABDOMEN: Spermathecae - Number	A01
ABDOMEN: Spermathecae, sclerotized ring at the end of the spermathecal duct - Presence	A02
ABDOMEN: Spermathecae, sclerotized ring at the end of the spermathecal duct - Shape	A03
ABDOMEN: 1 or 2 spermathecae, pigmented neck - Presence	A04
ABDOMEN: 1 Spermatheca - Shape	A05
ABDOMEN: 1 spermatheca, curved shape - Presence	A06
ABDOMEN: 1 spermatheca, spermathecal duct swollen - Presence	A07
ABDOMEN: 1 spermatheca, spermathecal duct - Length	A08
ABDOMEN: 2 spermathecae - Shape	A09
ABDOMEN: Spermathecae, abdominal sclerites - Presence	A10
ABDOMEN: Spermathecae, abdominal sclerites - Shape	A11
ABDOMEN: 2 spermathecae - Size	A12
ABDOMEN: 3 spermathecae - Shape	A13
ABDOMEN: 3 spermathecae - Texture	A14
EYES: interfacetal hairs - Presence	H01
EYES: Inter-ocular space - Shape	H02
MANDIBLE/MAXILLE: teeth - Presence	H03
CIBARIAL ARMATURE: cibarial armature - Presence	H04
PHARYNX POSTERIOR ARMATURE: pharynx posterior armature - Presence	H05
PALP: 3rd palpal segment - Shape	H06
PALP: 3rd palpal segment, sensory pits - Number	H07
PALP: 3rd palpal segment, single sensory pit - Opening versus depth	H08
ANTENNA: short segments - Shape	H09
ANTENNA: sensilla coeloconica, short segments - Presence	H10
ANTENNA: short sensilla trichodea, distal part segments IV to X - Number	H11
ANTENNA: long sensilla trichodea, proximal segments III-X - Shape	H12
ANTENNA: antennal XI/X ratio, length of segment XI divided by length of segment X - Range	H13
ANTENNA: sensilla coeloconica, segments III to VI - Presence	H14
ANTENNA: sensilla coeloconica, segments VII to X - Presence	H15
ANTENNA: sensilla coeloconica, segments XI à XV - Presence	H16
LEG: forelegs, spines on tarsal segments - Presence	L01

Table 2 - End

Descriptors	code
LEG: middle legs, spines on tarsal segments - Presence	L02
LEG: hind legs, spines on tarsal segments - Presence	L03
GEOGRAPHICAL	G01

The graphical user interface is illustrated as a screenshot (Figure 1). The middle section of the interface was dedicated to definitions and images of both descriptors (on the left part) and taxa (on the right part). As a quick start guide, notices on “How to install” and “How to identify” were added.

**Figure 1.** Screenshot of IIKC. On the left side, the descriptor list and their states (red rectangle); on the right side the remaining and discarded taxa (green rectangle) and, in the middle definitions and pictures (violet rectangle) of either descriptors, states or taxa according to the selection.



### Database management system

Xper<sup>2</sup> version 2.0 (Ung *et al.*, 2010) was selected to edit and to manage the morphological database and to create the interactive key. It does not require advanced programming and can be freely downloaded at <http://www.infosyslab.fr/lis/?q=ressources/logiciels/xper2>. Xper<sup>2</sup> is a versatile software for editing, managing, storing and on-line publishing of taxonomic knowledge. Several tools are available in order to facilitate the daily work of its users: the

checkbase function prevents from inconsistencies, the summary function can be used to have an overview at a glance of the whole knowledge base, and items are easily compared within a matrix. In addition, Xper<sup>2</sup> allows the use of operators that take into account the treatment of polymorphism or uncertainty. The descriptors can be sorted according to their discriminant power using three indexes: one is unique to the software, (Xper<sup>2</sup> original sort) and two are well-known mathematical indexes the Sokal and Michener sort, and the Jaccard sort.

IHKC was validated by 6 users with different levels of expertise in *Culicoides* identification. Two were *beginners* on *Culicoides* taxonomy, defined as possessing little experience of identification keys in general (users 1 and 2); two were defined as of intermediate experience, with experience on mosquitoes and tick taxonomy, but no experience with *Culicoides* (user 3 and 4); and two were defined as *advanced* users with expertise on *Culicoides* taxonomy and identification keys (user 5 and 6). A total of 37 slide-mounted female *Culicoides* representing 34 species, were sent without identifying labels to users, having being morphologically confirmed by two experts. Slides were recorded with a reference number and the trapping location.

A questionnaire was sent to the users to record the final species identifications, the time required for identification and the level of confidence the user attached to each identification. To begin with the identification process, users activated the *Xper original sort* and then freely selected the descriptors among the list sorted in a decreasing order of discriminant power, *i.e.* from the descriptors that will best discriminate the taxa to the least. Identification slide orders were randomly selected for each user. After each specimen identification, users saved the identification pathway history (automatically generated by the Xper<sup>2</sup> software) with the state of characters selected. Each original step was checked afterwards to see whether each morphological state chosen by the user discarded the correct taxon or not. The selection of a morphological state was considered as an *error* if the correct taxon was discarded and as a *success* if not. Each morphological selection of the step *n* was checked independently of the results of the step *n-1* meaning a success due to a good morphological observation could be possible at the step *n* even if an error occur at *n-1* discarding the correct taxon. A step was considered as an observation - and then *success* and *error* were computed - if the step discarded one taxon at least. Each of the 222 identification pathway histories generated by the six users was then checked to compute the quality of user observations. An observation (a

step) was computed as *error* if the selected state discards the correct taxa and as *success* when the correct taxa remained in the taxa list.

### *Analysis*

Data from the validation step was analyzed with a factorial component analysis using the *ade4* package of R software (R Development Core Team, 2010). Graphics were produced under R software with the exception of the radar graphics which were prepared using Excel 2007 (Microsoft corp., USA). The statistical tests were computed with R software. Differences of success frequency between users and between the user classes were investigated by a chi-squared test. Normality of dataset and subsets were assessed with the Shapiro-Wilks test. The mean differences of non-normal data were explored using the Kruskal-Wallis test. In case of significance of the latest, *kruskalmc* function of the *pgirmess* R package and the Wilcoxon test were used to investigate multiple comparisons between classes and within two classes.

## **Results**

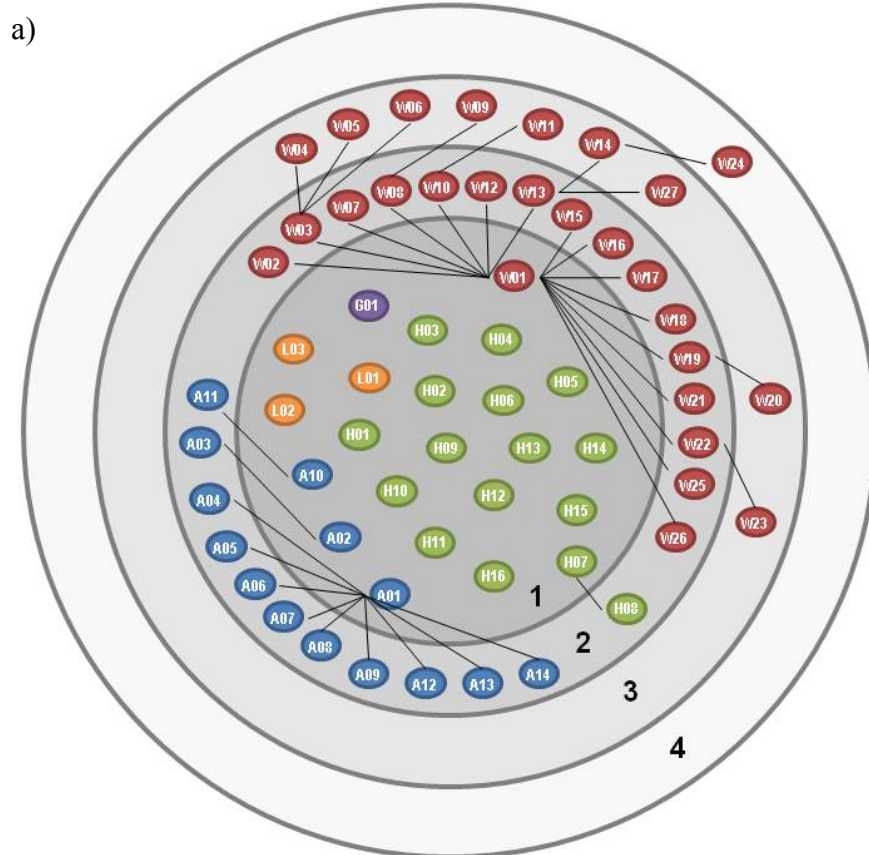
### *Database contents and structure*

IIRC database structure was based on descriptor dependency, with four hierarchical levels (figure 2.a). All identifications started with a choice of 23 descriptors (level 1), 28 on level 2, 9 on level 3 and only 1 on level 4. Descriptors for level 1 are not inter-related meaning that selection between each of them (Figure 2.a). Logical dependencies then determine the availability pathway of descriptors between levels 2-4 by removing redundant descriptors following the selection of particular characters.

As expected, identification pathways vary according to the user of the programme. As an illustration of this a comparison of the selection process by two users to identify correctly *C. newsteadi* is documented (figure 2.b) and compared with the optimised pathway following the “Xper original sort”. The intermediate user found the correct species using three abdominal characters and three on the wings (6 steps), while the *advanced* user selected only the wing pattern to identify *C. newsteadi* in seven steps. According to these two methods, the final descriptors allowing discrimination *C. newsteadi* were different (W21 and W24). Comparing the first step (a) of the three ways, the optimised way has discarded 62% of taxa compared to respectively 12% and 28% for the intermediate and advanced users.

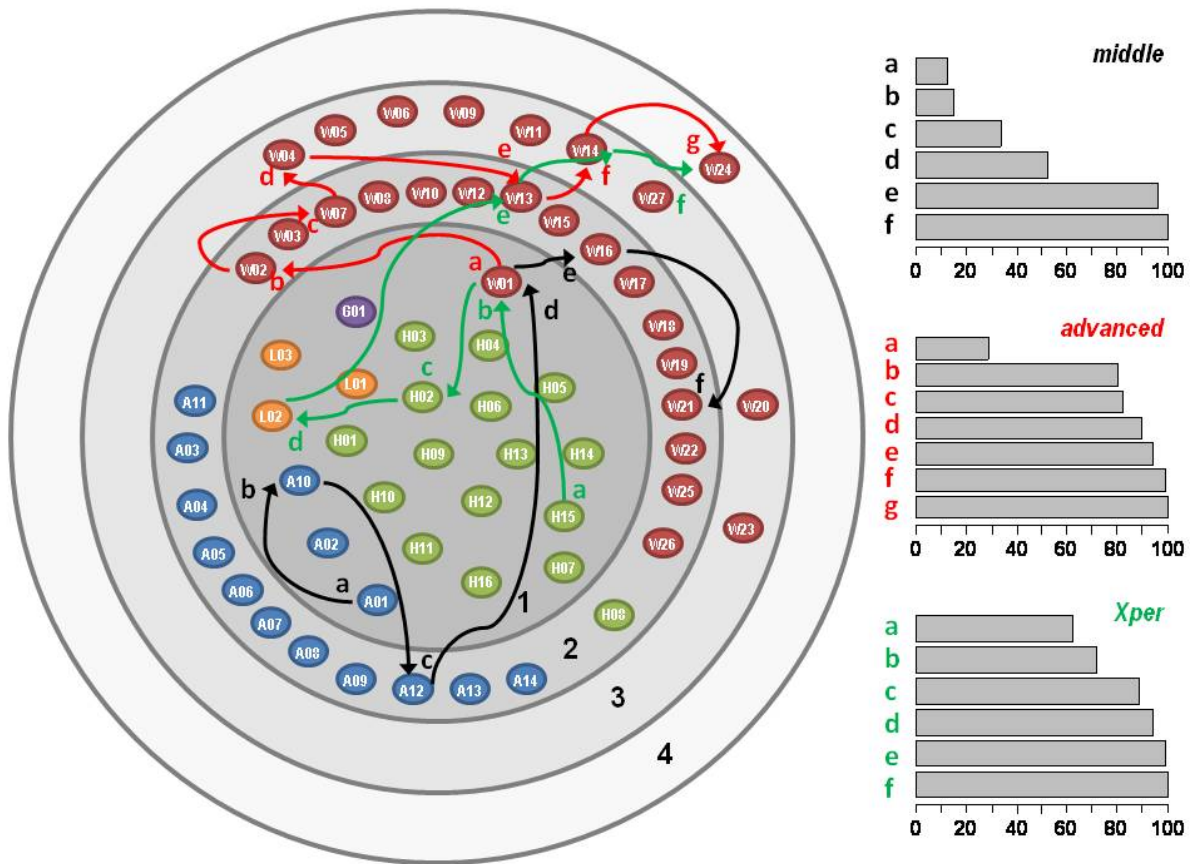
**Figure 2.** a) IIKC database structure. The four hierarchical levels are represented by grey circles and are numbered 1 to 4 (black). The first level gathered the 23 descriptors available at the start of identification. Descriptor logical dependency between two descriptors was showed by a black line meaning a particular state of the descriptor into level  $n$  have to be selected to “unlock” the one into the level  $n+1$ . The unlocked descriptors were incremented in the list of the descriptors available to user.

b) Examples of end user pathways, *middle* and *advanced* user, for the identification of *C. newsteadi*, and the pathway following the *xper* sort. Histogram showed the percentage of discarded taxa at each step for each pathway. Letters *a* to *f* or *g* corresponded to the identification step 1 to 6 or 7 on the scheme and on the histogram; the black, green and red letters/arrows corresponded to respectively *middle*, *advanced* user and the *xper* sort.





b)



### Analysis of IIC validation

A factorial component analysis between the different variables (slide order, identification time in minute, confidence percentage, and number of descriptors) was performed (data not shown). Identification time and the confidence percentage were negatively correlated. Slide order was not correlated with other variables. Projections of either slides or users to the factorial axis did not reveal any pattern. Identification data (identification time, success or failure to identify correctly the specimen, number of descriptors used) for each user was then individually analysed.

Succeeded slide identification took a median of seven steps (inter-quartile range of 3) and seven minutes (inter-quartile range of 5). Identification success rate varied according to the species concerned (Table 3.). Success rates differed significantly between users (chi-squared test,  $p=0.0033$ ) and between levels of experience (chi-squared test,  $p=0.0011$ ) and ranged from 35.1% to 81.1%. By level of experience, the beginners successfully identified 44.6% of slides, the intermediates 56.8% and the advanced 74.3%. Each slide, however, was correctly identified at least once within the group (table 3). *Culicoides nubeculosus*, *C. parroti*,

*C. saevus* and *C. semimaculatus* were all correctly identified by the six users; nine species by five users; three by four; 13 by three; two by two and six by only one user (see table 3 for species' name found by one to six users). For all three users categories, median confidence was 60% for failed identifications and 80% for successfully identified slides.

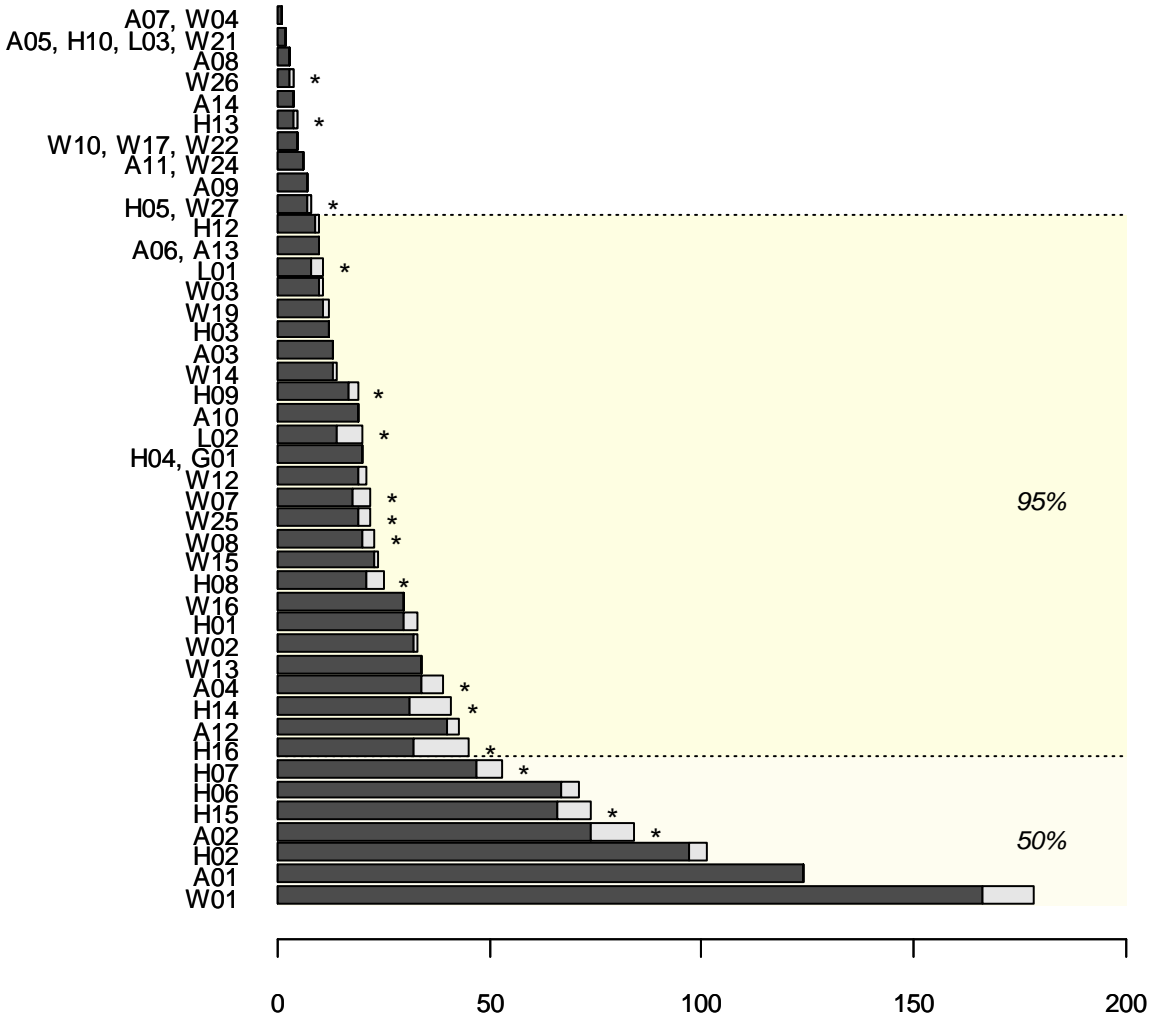
**Table 3.** For each species used for the validation, number of identification success, number of descriptors used by end user when the identification was correct, and theoretical number of descriptors following strictly the list of the Xper original sort. \* mentioned when the number of descriptor needed with Xper original sort is inferior to the mean number of descriptor used by end users.

Species	Nb of Success	Users' step				Nb Xper step
		Min	Mean	Max	Sd	
<i>C. begueti</i>	3	8	9.33	10	0.94	7*
<i>C. brunnicans</i>	3	3	6	9	2.45	6
<i>C. cameroni</i>	3	3	6.33	9	2.49	5*
<i>C. chiopterus</i>	3	4	6.33	10	2.62	7
<i>C. circumscriptus</i>	4	5	6	8	1.22	5*
<i>C. dewulfi</i>	4	9	9.75	11	0.83	10
<i>C. fascipennis</i>	2	9	9.5	10	0.50	8*
<i>C. fascipennis</i>	1	9	9	9	0	8*
<i>C. festivipennis</i>	4	5	7	10	1.87	6*
<i>C. haranti</i>	3	6	7.33	9	1.25	7*
<i>C. heliophilus</i>	3	7	8	10	1.41	7*
<i>C. imicola</i>	5	4	5.8	8	1.47	6*
<i>C. kibunensis</i>	1	11	11	11	0	9*
<i>C. longipennis</i>	3	5	8.67	11	2.62	7*
<i>C. lupicaris</i>	2	6	7.5	9	1.50	7*
<i>C. minutissimus</i>	3	3	4	5	0.82	5
<i>C. montanus</i>	5	5	6.8	9	1.33	9
<i>C. newsteadi</i>	4	6	8.5	14	3.20	7*
<i>C. nubeculosus</i>	6	3	3.67	5	0.75	5
Obsoletus complex	5	9	9.4	11	0.80	10
Obsoletus complex	3	7	8.33	10	1.25	10
<i>C. paradisionensis</i>	1	8	8	8	0	7*
<i>C. parroti</i>	6	3	4.17	5	0.90	5
<i>C. picturatus</i>	1	7	7	7	0	6*
<i>C. picturatus</i>	3	7	8.67	10	1.25	7*
<i>C. poperinghensis</i>	1	8	8	8	0	7*
<i>C. pulicaris</i>	5	6	7	8	0.89	7*
<i>C. punctatus</i>	5	6	8.4	15	3.38	7*
<i>C. riebi</i>	1	9	9	9	0	8*
<i>C. riethi</i>	3	6	7	8	0.82	6*
<i>C. riouxi</i>	5	4	4.8	5	0.40	6
<i>C. saevus</i>	6	2	3	4	0.82	4
<i>C. segnis</i>	5	3	6.2	8	1.94	6*
<i>C. sejfadinei</i>	5	3	3	3	0	6
<i>C. semimaculatus</i>	6	3	7	8	1.83	6*
<i>C. stigma</i>	3	4	4.33	5	0.47	4*
<i>C. vexans</i>	3	4	7	11	2.94	5*

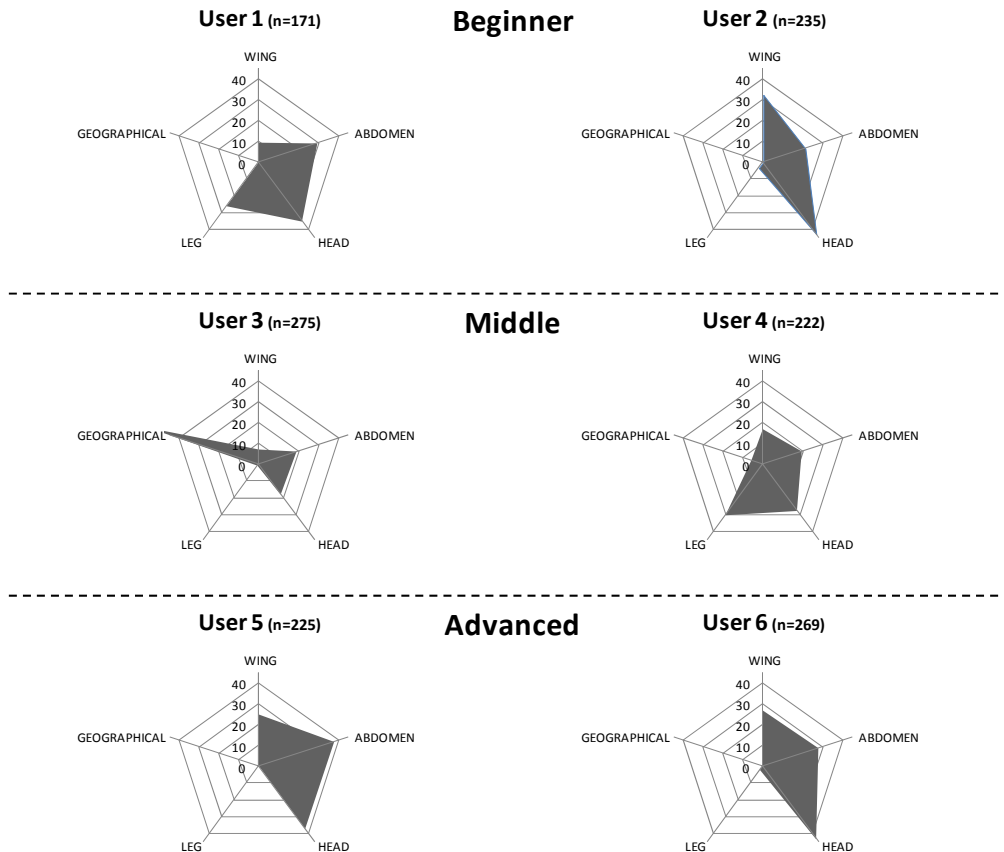
Following the most powerful descriptors according the Xper<sup>2</sup> sort, 25 out of 37 specimens (68%) would have been correctly identified quicker than following the user's choices. For users, successful identifications were achieved in an average of 6.6 steps, with a minimum of two steps (for *C. saevus*) and a maximum of 15 steps (for *C. punctatus*). No significant difference was observed between the number of descriptors used when identification failed, succeeded or both, either between users or user's class (Kruskal-Wallis test,  $p > 0.05$ ). For all users, the identification time was significantly higher when identification failed than when identification succeeded (one-sided Wilcoxon test,  $p = 0.0093$ ). No significant differences were noted, however, either between users or within the user's class (all Kruskal-Wallis tests,  $p > 0.05$ ) although complete data was not available for the beginner class.

Eight out of 61 descriptors were not used during the validation (wing characters: W05, W06, W09, W11, W18, W20, W23 and head character: H11) (Figure 3). Users selected a total of 1,397 character states for 53 descriptors of which seven descriptors represented 50% of the descriptors used, namely: wings spotted or not (W01), the number of spermatheca (A01), the inter-ocular space of the eyes (H02), the sclerotized ring (A02), the sensilli distribution on segments VII to X (H15), the shape of the third palpal segment (H06) and the number of sensory pits on the third palpal segment (H07). Most successful descriptors included the use of A01 and H02 which led to error in less than 5% of cases and W01 and H06 led to error in less than 10%. Similarly, the sclerotized ring (A02) sensilla distribution H15 and sensory pits (H07) were used with 12, 11 and 11% of error respectively. In all, 36 descriptors represented 95% of use of the key. Each user demonstrated a particular pattern of preference for use of descriptor groups (Figure 4). As an example only one user made an initial sort according the origin of the slide. The beginners and the middle users also utilised very different patterns of descriptor use. The advanced group had a more similar pattern, giving priority to observation of the head followed by the abdomen and the wings and additionally avoided observing legs and limitation by geographical descriptor.

**Figure 3.** Numbers of observation for each descriptor used (n=1,397). Black bars represent the succeeded observations and the grey ones the failed ones. The light area gathered the seven descriptors which represents 50% of total observation and the other one 95% of the whole. Bars were ordered from the above to the top by total decreasing. The stars were added for the descriptors leading to error superior to 10%.



**Figure 4.** Descriptor groups used by the different users (in percentage) with  $n$  as the total number of observations made by each user. As descriptor groups do not include the same number of descriptors, weights were affected before to compute percentages: abdomen 4.36 ( $n=14$ ), head 3.81 ( $n=16$ ), geographical 61 ( $n=1$ ), legs 20.33 ( $n=3$ ) and wings 2.26 ( $n=27$ ).



## Discussion

This study has produced and validated IIKC, the first open-access electronic key for *Culicoides* to be developed worldwide and has demonstrated some of the advantages and disadvantages in providing taxonomic information to a range of different users using e tools. The validation was carried out with the aim of investigating the impact that the key could have upon users ranging from beginners with no experience of either electronic keys or biting midge identification, to those carrying out *Culicoides* identification daily, but whom were trained in a different laboratory and country (in this case the United Kingdom). This was used to reflect the scenario that in the event of the incursion of an *Orbivirus* strain, groups with highly diverse levels of experience are expected to contribute to identification of *Culicoides* across a wide geographic range. In addition, rather than just including *Culicoides* species that

were expected, a priori, to act as vectors, the validation included a challenging and wide range of specimens that might be encountered at light in the region (allowing a fuller understanding of species diversity).

The validation results provided valuable information regarding the likely accuracy of surveys conducted by users of different levels of expertise and also highlighted improvements that could be made to improve IKC, allowing an assessment of the degree to which specialist coaching would still be required in an outbreak situation. Some species feel clearly easier to identify, even for beginner, due to particular features simple to observe such as the swollen duct of the unique spermatheca specific to *C. nubeculosus*. Except specific features, the species having wings with well marked spots were lesser problematic for users. On the contrary, the trickiest species were clearly the ones with only two little and faint spots on the wings such as *C. paradisionensis*. Without experience on the possible variations on the *Culicoides* wing pattern, the difficulty to judge such a wing as with or without spots is real.

The number and quality of images available in IKC guides users through identification and allows them to assess their confidence in the result produced. It's flexibility through the use of a multi-entry system is also demonstrated by the fact that different users can use two different pathways ways to identify *C. newsteadi*, depending upon the characters they feel confident in applying. This system also has an additional advantage in allowing avoidance of descriptors that correspond to a damaged/missed anatomical part in the specimen. Each user of the ring trial has utilised the key environment in a different way by using the group of descriptors where they feel more confident (Figure 4). With experience, the user behaviour seems to concentrate upon characters of the head and the abdomen than the wings and very few observed the legs. Advanced users additionally never used the geographical character, probably concluding through their experience that most of species are widely distributed.

Beyond the 36 descriptors that represented 95% of the whole observations, 8 descriptors were never used for several reasons. The sensilli distribution of the short trichodea (H11) was probably not used because of the difficulty to observe them without experience. W05 and W11 were special features specific to respectively *C. caucoliberensis* and *C. simulator* which were absent to the validation trial. The other five descriptors - W06, W09, W18, W20 and W23 – were not special features discriminant of species. In these cases the position on the list could have been a determining factor in uptake. At present it is not possible to add weights to the descriptors either in terms of ease of use or specificity, however, this is planned in

forthcoming developments and will be take into account the feedback of those involved in the trial.

Technically, the software itself is relatively straightforward to operate and assists accurate identification in several ways. Uptake of the various tools provided within the programme is of interest in approving the acceptability to different user groups. To assist in identification, the software allows three options: 1. To manage uncertainty by using logical operators (like AND, XOR, NOT) to select several choices within the key. Even though this could be useful on occasion for difficult or subjective characters (like sensilli distribution or the palp shape), the six users did not use this function during the validation perhaps through a lack of awareness or confidence. 2. The second option is to define a mismatch threshold when performing identification. Each value for this option was not evaluated and no recommendation could be made. Nevertheless, an observed effect to increase the mismatch threshold is to increase the number of steps to identify. This is balanced by the fact that the validation protocol reveals that long identification lead to a higher number of errors. (iii) The last option assisting in identification is to compare the selected taxa by producing a matrix summarizing descriptions easy to read by a colour-code whether a character is discriminating, partially or not. This later option is really useful to improve the user knowledge by checking which characters are discriminating among the selected taxa.

To date, all available identification tools for *Culicoides* are based upon single-access keys and are in specialist journals or PhD theses which are not easily available to new users. IIKC sits between very general databases that act as a repository for a wide variety of information concerning *Culicoides* biology (e.g. [www.culicoides.net](http://www.culicoides.net)) and these items, and will allow at least basic competence to be developed by users. While the identifications made by beginners will still require secondary confirmation by experts (and these confirmations in themselves are prone to the subjective biases), the provision of the key online and with access to other workers will significantly improve the consistency of *Culicoides* identification in Northern Europe. Taxonomy as a discipline has advanced substantially through internet-based resources as it is reliant upon both detailed description and high quality and images (Godfray, 2002). While not replacing the specialists role in training course IIKC provides a complementary mechanism as a back-up tool for experts. According to the ring trial results, IIKC will be improved by weighting descriptors that are easy to observe, by evaluating the mismatch thresholds for beginners, by developing definitions and images for difficult descriptors and by adding illustrations and information of particular features of species. A



scientific committee will be organised to validate updates, to discuss new species or synonymies and to evaluate new systematic or taxonomic changes.

**IIKC is available in a cd-rom format upon request to authors and can be downloaded from either the website dedicated to xper<sup>2</sup> bases (<http://lis-upmc.snv.jussieu.fr/xper2/infosXper2Bases/en/index.php>) or from the website dedicated to IIKC ([www.iikculicoides.net](http://www.iikculicoides.net)).**

## **Conclusion**

IIKC, an Interactive Identification Key for females *Culicoides* of the West Palaearctic region, is a multi-entry key gathering the taxonomic knowledge of 98 species and 10 variants with 837 photographic images and illustrations. In addition to the key, users can browse the database including morphological data of 60 characters, synonymies and geographical distribution among 14 countries. Validated by six users with a various range of experience, IIKC appears to be straightforward to use. In addition to the key, the huge amount of taxonomic information available acts back-up source for the e-taxonomy of the genus *Culicoides*. The development and the free sharing between beginners and experts of the e-taxonomy such as IIKC for *Culicoides* and more generally for arthropods involved in pathogen transmission will unlock the taxonomic knowledge to identify species and therefore will give better insights into the ecology and dynamics of these groups, helping to standardise vector surveillance strategies across countries.

## **Acknowledgements**

The development of IIKC was started in the framework of a surveillance network of reoviruses, bluetongue and African horse sickness in Mediterranean basin and Europe (acronym MedReoNet) Call FP6-2005-SSP-5-A Area 1.4. A part of this work was funded by the French Ministry of Agriculture. The authors would like to acknowledge all the partners of the MedReoNet Workpackage 2 and especially R. Meiswinkel, F. Schaffner, M. Miranda. A special thanks to R. Venail, J.B. Ferre, X. Allène, I. Rakotoarivony, L. Gardès, K. Huber, J. Barber and E. Denison for testing the beta version.

## References

- Agosti D. (2006), Biodiversity data are out of local taxonomists' reach. *Nature*, **439**, 7075: 392.
- Brunhes J., Cuisance D., Geoffroy B., Hervy J. (2009). Les glossines ou mouches tsé-tsé (réédition). In IRD Editions, Montpellier, France (CD-Rom).
- Campbell J. A., Pelham-Clinton E. C. (1960), A taxonomic review of the british species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proc. R. Soc. Edinburgh*, **68**: 181-302.
- Cêtre-Sossah C. (2010), Strengthening cooperation on vectorborne diseases in Europe. *Veterinary Record*, **166**, 13: 386-387.
- Cuisance D., Rioux J. A. (2004), Current status of medical and veterinary entomology in France: endangered discipline or promising science? *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **27**: 377-392.
- Delécolle J. C. (1985). Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Thèse d'état n°56, Université Louis Pasteur de Strasbourg I, Strasbourg, 229 p.
- Ferrattini O. P. (1957), *Culicoides* da região neotropical (Diptera: Ceratopogonidae). *Arq Fac Hig Saude Pub Univ São Paulo*, **11**: 159-526.
- Glick J. I. (1990), *Culicoides* Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *Journal of Medical Entomology*, **27**, 2: 85-195.
- Glukhova V. M. (1989), Blood-sucking midges of the genera *Culicoides* and *Forcipomyia* (Ceratopogonidae). *Fauna SSR*, **3**, 5: 408 pp.
- Glukhova V. M. (2005), *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) of Russia and adjacent lands. *Dipterological Research*, **16**, 1: 75pp.
- Godfray H. C. (2002), Challenges for taxonomy. *Nature*, **417**, 6884: 17-9.
- Khamala C. M., Kettle D. S. (1971), The *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) of East Africa. *Trans. R. ent. Soc. Lond.*, **123**, 1: 1-95.
- Kremer M. (1965). Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. Encyclop. Ent. Serie A, Paris, 299 p.
- Oliver J. H., Jr. (1988), Crisis in biosystematics of arthropods. *Science*, **240**, 4855: 967.
- R Development Core Team (2010), R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>.
- Schaffner F., Angel G., Geoffroy B., Hervy J., Rhaïem A., Brunhes J. (2001). The mosquitoes of Europe. An identification and training software. In IRD Editions and EID Méditerranée, Montpellier, France (CD-Rom).
- Song H. (2010), Grasshopper Systematics: Past, Present and Future. *Journal of Orthoptera Research*, **19**, 1: 57-68.
- Ung V., Dubus G., Zaragueta-Bagils R., Vignes-Lebbe R. (2010), Xper2: introducing e-taxonomy. *Bioinformatics*, **26**, 5: 703-4.
- Vignes-Lebbe R., Gallut C. (1997). Computer Aided Identification of Phlebotomine sandflies of Americas (CIPA). In Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. <http://lis-upmc.snv.jussieu.fr/xper2/infosXper2Bases/en/>.
- Wirth W. W., Hubert A. A. (1989), The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, **44**: 1-508.

### 3. Conclusion

IKC permet à l'utilisateur d'identifier une centaine d'espèces de *Culicoides* présents dans l'Ouest de l'Europe et autour du bassin méditerranéen. La structure multi-entrée de la clé autorise un libre cheminement au travers des caractères pour aboutir à l'identification d'une espèce. Le grand nombre d'illustrations (800) produites et intégrées dans la clé facilitent l'approche, l'appréhension et la compréhension du jargon taxonomique notamment pour les débutants. Toutefois, cette clé n'a pas la prétention de pouvoir remplacer l'expert dans son rôle dans l'enseignement de la taxonomie. Dans ce cadre, la richesse de la connaissance morphologique des espèces rassemblées font de la clé IKC un formidable support de cours pour les experts. Quelque soit la qualité de ce type d'outil morphologique, la compétence essentielle à acquérir pour les débutants est le sens de l'observation. Une mauvaise observation ne peut conduire qu'à des erreurs d'identification. Le soin apporté à la dissection, la préparation des spécimens et l'étiquetage complet (origine, date de collecte, etc.) pour l'observation microscopique est extrêmement important. Le site internet dédié à la distribution du produit et de ses mises à jour pourrait jouer un rôle sur ces éléments autour de l'identification. Un forum pourrait voir le jour visant à partager des expériences comme par exemple sur l'utilisation de divers milieux de montage ou le développement et le maintien de collections de références. De manière plus générale, le support que représente le *worldwide web* pour diffuser la connaissance taxonomique, *e-taxonomie*, permet le maintien et le développement de l'expertise taxonomique.



# Chapitre 7 : Identification et quantification d'espèces cryptiques

*« En entomologie médicale, l'existence de ces complexes d'espèces-jumelles pose un très délicat problème dans la mesure où, par exemple, les capacités vectorielles de chacune d'entre elles peuvent être très différentes. Il est donc obligatoire de reconnaître l'existence d'un tel complexe et de pouvoir identifier les espèces qui le constituent. » (Rodhain et Perez, 1985)*

## 1. Approche méthodologique

Par définition, les membres d'un complexe d'espèces sont difficiles voir impossibles à différencier sur la base de critères morphologiques. La citation de Rodhain et Perez (1985) replace très bien l'importance de l'identification précise des espèces qui constituent ces complexes. Face à ce délicat problème, le développement des outils moléculaires de type PCR à visée diagnostic a permis d'aller au-delà des limites de la morphologie. La capacité d'un vecteur à transmettre est liée à la sommation des aptitudes de celui-ci à s'infecter, à assurer le développement du pathogène et à le transmettre<sup>24</sup> (Rodhain et Perez, 1985). L'écologie du vecteur conditionne pour beaucoup la capacité à transmettre. Pour acquérir des données sur l'écologie des vecteurs telles que la densité relative par rapport aux hôtes ou la longévité, il est nécessaire d'identifier et de quantifier l'ensemble des spécimens collectés. Dès lors que des spécimens appartenant à un complexe d'espèces peuvent être collectés par milliers, l'utilisation des outils moléculaires sur chacun des spécimens peut rapidement devenir très longue et très coûteuse. Comment réaliser une identification précise en routine pour estimer l'abondance de chacune des espèces au sein d'un complexe ?

En entomologie médicale, des outils moléculaires ont été développés pour la plupart des arthropodes vecteurs ; par exemple, chez des groupes d'anophèles vecteurs du paludisme en Afrique et Asie (Garros *et al.*, 2004), mais aussi chez des phlébotomes vecteurs de leishmanies en Asie (Manonmani *et al.*, 2010), et également chez des tiques d'Europe et d'Asie (Rumer *et al.*, 2010). Chez les *Culicoides*, l'état des connaissances a mis en évidence l'existence de nombreux outils développés dans la dernière décennie pour l'identification du vecteur majeur

---

<sup>24</sup> conditionnés par les facteurs intrinsèques et extrinsèques

*C. imicola*, et des espèces des groupes Pulicaris et Obsoletus (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Cêtre-Sossah *et al.*, 2008; Deblauwe *et al.*, 2012; Gomulski *et al.*, 2005; Mathieu *et al.*, 2007; Monaco *et al.*, 2010; Nolan *et al.*, 2007; Pagès *et al.*, 2009; Pagès et Sarto I Monteys, 2005; Pili *et al.*, 2010; Schwenkenbecher *et al.*, 2009). Au sein de ce dernier groupe, deux espèces du sous-genre *Avaritia*, *C. obsoletus* et *C. scoticus* sont rassemblées au sein du complexe Obsoletus, l'identification des femelles restant problématique par la morphologie (les mâles quand à eux sont facilement différenciables). Or, des infections expérimentales tendent à montrer que deux sérotypes du virus de la FCO (BTV-8 et BTV-9) se répliquent plus intensément ( $3\log_{10}$ ) chez *C. scoticus* que chez *C. obsoletus* (Carpenter *et al.*, 2008). Ces deux espèces sont sympatriques et sont très abondantes dans les pays de l'Ouest de l'Europe. Toutefois, l'ensemble des données d'abondances collectées par les réseaux de surveillance des vecteurs de la FCO sont cumulées pour ces deux espèces. Comment établir la dynamique spatio-temporelle de ces deux vecteurs ? Cette question fondamentale concernant ces 2 espèces du sous-genre utilisées comme modèles dans cette thèse, est intégrée comme un objectif spécifique.

Pour répondre à cette question, nous émettons l'hypothèse que les systèmes PCR en temps réel, qui peuvent quantifier une fluorescence émise à chaque cycle, nous permettrait de trouver une relation entre quantité d'ADN spécifique détectée et nombre de spécimens. Nous optons pour la technologie des sondes TaqMan® pour développer un outil en duplex qui permettrait la détection et quantification simultanées de spécimens mélangés sous forme de lots composés de ces deux espèces.

Le développement et la validation de cette PCR quantitative duplex permettant de quantifier simultanément l'abondance de *C. obsoletus* et de *C. scoticus* a fait l'objet d'un article sous presse dans le journal *Veterinary parasitology* présenté ci-dessous.

## 2. Résultats

Cette partie a fait l'objet d'un article publié dans *Veterinary Parasitology*. Il est reproduit ci-après.



Contents lists available at ScienceDirect

# Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: Application to *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus

Bruno Mathieu<sup>a,c</sup>, Jean-Claude Delecolle<sup>a</sup>, Claire Garros<sup>b</sup>, Thomas Balenghien<sup>b</sup>, Marie-Laure Setier-Rio<sup>c</sup>, Ermanno Candolfi<sup>a</sup>, Catherine Cêtre-Sossah<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, Université de Strasbourg, EA 4438, 67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup> CIRAD, UMR Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Émergentes, 34398 Montpellier, France

<sup>c</sup> EID-Méditerranée, 34184 Montpellier, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 February 2011

Received in revised form 23 May 2011

Accepted 30 May 2011

#### Keywords:

*Culicoides obsoletus*

*C. scoticus*

Molecular identification assay

Quantitative PCR

Bluetongue

### ABSTRACT

The two sympatric sibling species *Culicoides obsoletus* (Meigen) and *Culicoides scoticus* Downes and Kettle (Diptera: Ceratopogonidae), are known to be competent vectors for bluetongue virus in the Palaearctic region. However, morphological identification of constituent species is only readily applicable to adult males and these two species distinguishing traits have overlapping character states. As their vector competence may differ in space and time, the correct identification and quantification of specimens of both species are essential for understanding bluetongue epidemiology. However, no molecular tools are available for high-throughput identification of the two species. We therefore developed a quantitative duplex real-time PCR assay to determine the relative abundance of each sibling species in a sample using TaqMan probes. For each species, standard curves were constructed from serial dilutions of purified plasmid DNA containing ITS1–5.8S–ITS2 (rDNA) in the range of  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  ng/ $\mu$ L. Standard curves were used to quantify samples of mixed *C. obsoletus*/*C. scoticus* specimens. Specificity was evaluated with 5156 specimens representing 62 species. Based on the DNA quantities detected according to the standard curves, a quadratic model developed on 1100 males and validated on 555 females was able to predict the relative abundance of each species simultaneously in a one-shot reaction (Pearson coefficient of 0.999). Our assay showed a requirement of two specimens or less for 95% of the predictions, making it highly applicable to field collections. Extensive use of this real-time PCR assay will provide a better understanding of geographical distribution, dynamics, and bionomics on a species level, which is essential for risk assessment. This approach is an important contribution to medical entomology for investigating the vector role of arthropod sibling species.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Bluetongue is a worldwide disease notifiable to the OIE and mainly affects ruminants. The bluetongue virus (family Reoviridae, genus *Orbivirus*, BTV) is transmitted between its vertebrate hosts by biting midges species of the genus

\* Corresponding author.

E-mail address: [cetre@cirad.fr](mailto:cetre@cirad.fr) (C. Cêtre-Sossah).

*Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Till date, 8 (BTV-1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 and 16) out of the 26 recognised serotypes of BTV have been described in the Mediterranean basin and Europe since 1998 (Wilson and Mellor, 2008; De Clercq et al., 2009). Between 1998 and 2005, bluetongue transmission was primarily related to the main Afro-Asiatic vector *Culicoides imicola* Kieffer in the western Mediterranean basin. In 2006, outside the geographical distribution range of *C. imicola*, outbreaks of bluetongue occurred in northern Europe due to the serotype 8. It appeared that autochthonous Palaearctic biting midge species were able to transmit BTV-8 effectively. Till date, several *Culicoides* species, mostly members of the sub-genus *Avaritia*, have been suspected of being involved in BTV-8 transmission in Europe based on their abundance, vector competence, or the detection of BTV-8 in field collected individuals (Carpenter et al., 2006, 2008; Meiswinkel et al., 2007; Dijkstra et al., 2008; Hoffmann et al., 2009). Carpenter et al. (2008) showed with experimental infections using BTV-8 and BTV-9 that, within the *Obsoletus* complex, *Culicoides scoticus* was infected with 3 log<sub>10</sub> higher virus titers than *Culicoides obsoletus*. This difference in terms of virus titers combined with the genetic structure and population dynamics of *C. obsoletus* and *C. scoticus* (Pili et al., 2010) highlight the need to look at the geographic distribution and the spatio-temporal variations for these two species.

Currently, two dichotomous keys are available for the identification of western Palaearctic *Culicoides* species (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Delécolle, 1985). These keys, however, do not differentiate between the females of *C. obsoletus* and *C. scoticus*. Based on the shape of the genitalia, the males of these two species can easily be distinguished from each other. Delécolle (1985) showed that female diagnostic characters overlap between the two species. A study comparing morphological identification (based on spermatheca size and genital aperture shape) as opposed to molecular identification with Cytochrome Oxidase I (COI) sequences reported an overlap of morphological characters (Pagès et al., 2005), whereas a similar study showed that morphological characters are diagnostic even though this method based on measurement of microscopic characters of slide mounted specimens cannot be used for high-throughput identification of *C. obsoletus* and *C. scoticus* (Augot et al., 2010).

To overcome short comings with morphological identification, PCR-based assays have recently been developed and routinely used for the identification of Palaearctic species. Most of them are based on species-specific PCR fragment sizes (Cêtre-Sossah et al., 2004; Gomulski et al., 2005; Mathieu et al., 2007; Nolan et al., 2007; Pagès et al., 2005, 2009; Schwenkenbecher et al., 2009) or real-time PCR (Monaco et al., 2010). They are qualitative and determine to which species a given individual belongs. However, despite their usefulness for species identification, they are not suitable for quantifying samples with large numbers of mixed species. Following the establishment of *C. imicola* populations in Corsica and along the French Mediterranean coastline, Cêtre-Sossah et al. (2008) developed a real-time PCR assay able to quantify the number of *C. imicola* specimens in large samples.

The aim of this study was to develop a duplex quantitative real-time PCR to estimate simultaneously the relative abundance of the two sibling species *C. obsoletus* and *C. scoticus* in large samples. TaqMan technology was selected to develop the assay based on the ITS1, 5.8S and ITS2 regions (hereafter referred to as the ITS1-5.8S-ITS2 region). Males of each sibling species were used to test probe sensitivity and specificity. The relative quantity of DNA in samples was related to the relative number of specimens of both species. Field samples collected in a sympatric area were then quantitatively identified to validate the method.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insect samples

Most of the midges were collected using OVI black light traps (Onderstepoort, South Africa) in various locations in France (mainland and Corsica). With the exception of females of the *Obsoletus* complex, the specimens were identified to a species level using morphological keys (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Delécolle, 1985). A total of 6811 *Culicoides* specimens belonging to 62 species were used to develop and validate the molecular tool. *Culicoides comosioculatus* Tokunaga, 1956, *Culicoides saevus* Kieffer, 1922 and *Culicoides sinanoensis* Tokunaga, 1937 were sent by colleagues from Switzerland, Algeria and Russia, respectively. Males of *C. obsoletus* and *C. scoticus* used for ITS1-5.8S-ITS2 plasmid construction came from Nuncq Hautecote (50°18'N, 02°17'E).

### 2.2. Extraction of genomic DNA and amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 region

Genomic DNA was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions. Unless otherwise specified, *Culicoides* were processed individually. The ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified using the forward primer PanCulF from Cêtre-Sossah et al. (2004) and the reverse primer 28SR from Gomulski et al. (2005). Reactions were performed in a total volume of 50 µL consisting of 10× PCR reaction buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 250 µM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Sigma-Aldrich, France), 200 ng of each primer, and 2.5 U of HotStart Taq DNA polymerase (Qiagen, USA) and 1 µL of genomic DNA. PCR cycling conditions were: an initial denaturation step at 95 °C for 15 min, then 40 cycles at 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were examined by electrophoresis in a 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide.

### 2.3. Construction of *C. obsoletus* and *C. scoticus* ITS1-5.8S-ITS2 PCR-blunt plasmids and sequencing

The purified ITS1-5.8S-ITS2 specific-PCR products for both *C. obsoletus* and *C. scoticus* were cloned into PCR-Blunt vector (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen, USA), using chemically competent *Escherichia coli*. Plasmid DNA were extracted using a Plasmid DNA Preparation Kit (Nucleospin® Plasmid, Macherey Nagel, USA). BamHI (Biolabs, UK) restriction endonuclease digestion



**Table 1**

Primers and probes specific to *C. obsoletus* and *C. scoticus*. The length of amplicons is given in base pairs (bp), sequences and locations are oriented from 5' to 3'.

Name	Sequence (5'–3')	Amplicon (bp)	Location (5'–3') <sup>a</sup>
<i>C. obsoletus</i>			
QObsF	TCG TTG TTA TTG CAG CAG CTT T	88	65–86
QObsR	ATC ACA GCA CCC GCT TAA GAC	–	152–132
ProbObs	(6FAM)-CAA TGC CCG TGA AGG-(NFQ-MGB)	–	102–88
<i>C. scoticus</i>			
QScotF	GGT ACA CAT GGT TGA GTG TCG TTA TT	85	507–532
QScotR	TGA TCA CAT CAT GCA CTT ATG CG	–	591–569
ProbScot	(VIC)-AAC TAT CTT GTG TGT CTC TT-(NFQ-MGB)	–	542–561

<sup>a</sup> Numbering according to GenBank accession number JF280792 for *C. obsoletus* and JF280793 for *C. scoticus*.

and quantification of plasmid copies were carried out by determining DNA concentration at a wavelength of 280 nm. Aliquots of this plasmid, stored at –20 °C, were used to establish a reproducible standard curve run in each plate. Sequencing of the ITS1–5.8S–ITS2 region was carried out by Eurofins MWG Operon (Edersberg, Germany). The sequences and references of the vouchers were submitted to Genbank with the following accession numbers: *C. obsoletus* JF280792 and *C. scoticus* JF280793.

#### 2.4. Primer and probe design

The forward and reverse sequences were aligned using Vector NTI software (Invitrogen Inc., USA). Primers and probes were designed using Primer Express™ software version 3.0 (Applied Biosystems, USA). The TaqMan® probes (Applied Biosystems, USA) were designed with minor groove binder (MGB) moiety and non-fluorescent quencher (NFQ) dye on the 3' end associated with, FAM™ or VIC® dye label on the 5' end. Primers and probes specific to *C. obsoletus* were designed on the ITS1 region and were detected by FAM™ dye. Primers and probes specific to *C. scoticus* were located on the ITS2 region and were detected by VIC® dye (Table 1).

#### 2.5. ITS1–5.8S–ITS2 quantitative real-time PCR amplification

Quantitative real-time PCR (qPCR) amplification was carried out using the 7000 SDS real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) with the TaqMan® Gene Expression master mix (Applied Biosystems, USA). Duplex amplification was performed in a total volume of 25 µL consisting of 2× PCR reaction buffer, 300 nM of each primer and, 200 nM of each probe. The PCR conditions were: incubation at 50 °C for 2 min (UNG), Taq activation for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of amplification comprising denaturation for 15 s at 95 °C and annealing and primer extension for 1 min at 62 °C. Each plasmid containing the *C. obsoletus* and *C. scoticus* construct was used in a ten-fold serial dilution as two independent standard curves. 1 µL of unknown DNA previously diluted 1:10 was added to each PCR reaction. All standard and unknown samples were analyzed in triplicate. Results were expressed in Cycle threshold (C<sub>t</sub>) values determined at a preset threshold. The C<sub>t</sub> value indicated the cycle where fluorescence detected

from amplification on the target gene exceeded the preset threshold.

#### 2.6. Sensitivity and specificity

The sensitivity and the specificity of qPCR were evaluated using 5156 specimens belonging to 62 species distributed in 206 samples. qPCR sensitivity was tested on 52 samples (called “individual samples”) with a single specimen of *C. obsoletus* or *C. scoticus*, and on 50 pools (“mixed samples”) of one specimen of the *Obsoletus* complex with 99 *Culicoides* of other species (5000 specimens). qPCR specificity was tested on 104 specimens of various species. Tables 2 and 3 provide information on the location and geographical coordinates of specimens used to test the sensitivity and specificity of qPCR, respectively.

#### 2.7. Estimation of relative abundance

The DNA quantities of each species were calculated by the real-time software using the two standard curves for 11 one-tube mixed samples with the following respective compositions of *C. obsoletus* and *C. scoticus*: 100/0, 99/1, 99/1, 95/5, 95/5, 70/30, 50/50, 30/70, 5/95, 1/99, 0/100 (Table 4). *Culicoides* were processed together for each composition, genomic DNA was extracted from the homogenised mixed samples. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions. Each composition was tested three times. In order to avoid any estimation error due to the total quantity of DNA extracted, we calculated the relative quantity of *C. obsoletus* DNA for each sample (RobsDNAq) by dividing the quantity of *C. obsoletus* DNA by the sum of the *C. obsoletus* and *C. scoticus* DNA quantities. We then related the relative quantity of *C. obsoletus* DNA with the relative number of *C. obsoletus* (RNobs = No. *C. obsoletus* / (No. *C. obsoletus* + No. *C. scoticus*) present in each sample using:

$$1 - RNobs = \alpha(1 - RobsDNAq)^2 \quad (1)$$

Eq. (1) was equivalent to  $RNscot = \alpha(RscotDNAq)^2$ , where RscotDNAq and RNscot are the relative quantity of DNA and the relative number of *C. scoticus* in the sample. The value of  $\alpha$  was determined by least square minimisation of differences between observed data and model predictions, using the R software *nls* function (R Development Core Team, 2010). The accuracy of model fit was assessed

**Table 2**

Origin of the *Obsoletus* complex females used to test the sensitivity of qPCR. Each “individual sample” was used with one single specimen and “mixed samples” were used as follows: 1 *C. obsoletus* with 99 *C. imicola* (15 samples), 1 *C. obsoletus* with 99 *C. newsteadi* (10 samples), 1 *C. scoticus* with 99 *C. imicola* (10 samples) and, 1 *C. scoticus* with 99 *C. newsteadi* (15 samples).

Species	Number of males	Number of females	Collection site	Geographic coordinates	
<b>Individual samples</b>					
<i>C. obsoletus</i> (Meigen, 1818)	12		Plasne	46° 47'N, 5° 39'E	
	5		Chauffour les Bailly	48° 12'N, 4° 17'E	
	3		Adam les Passavant	47° 17'N, 6° 21'E	
	1		Rubrouck	50° 49'N, 2° 22'E	
	2		Nuncq Hauteecote	50° 18'N, 2° 17'E	
	1		Ercourt	50° 02'N, 1° 43'E	
	3		Brognon	49° 55'N, 4° 18'E	
	<i>C. scoticus</i> Downes and Kettle, 1952	6		Hucqueliers	50° 34'N, 1° 55'E
		2		Adam les Passavant	47° 17'N, 6° 21'E
		2		Gambais	48° 47'N, 1° 41'E
1			Lachapelle sous Rougemont	47° 43'N, 7° 01'E	
2			Bonnay	49° 55'N, 2° 30'E	
1			Lochwiller	48° 41'N, 7° 24'E	
1			St Denis les Rebais	48° 50'N, 3° 11'E	
1			Caisnes	49° 31'N, 3° 04'E	
2			Brognon	49° 55'N, 4° 18'E	
1			Chanceaux	47° 31'N, 4° 43'E	
1			San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E	
1			Rubrouck	50° 49'N, 2° 22'E	
1			Nuncq Hauteecote	50° 18'N, 2° 17'E	
1			Ercourt	50° 02'N, 1° 43'E	
2			Bastelicaccia	41° 56'N, 8° 49'E	
<b>Mixed samples</b>					
<i>C. obsoletus</i> (Meigen, 1818)	15 <sup>a</sup>		Adam les Passavant	47° 17'N, 6° 21'E	
	10 <sup>b</sup>		Villers le Tourneur	49° 37'N, 4° 34'E	
<i>C. scoticus</i> Downes and Kettle, 1952	8 <sup>b</sup>		Bastelicaccia	41° 56'N, 8° 49'E	
	1 <sup>a</sup> , 5 <sup>b</sup>		Nompatelize	48° 20'N, 6° 50'E	
	2 <sup>a</sup>		Hucqueliers	50° 34'N, 1° 55'E	
	5 <sup>a</sup>		Orbey	48° 07'N, 7° 10'E	
	1 <sup>a</sup>		Moltifao	42° 28'N, 9° 07'E	
	2 <sup>b</sup>		Figari	41° 30'N, 9° 05'E	

<sup>a</sup> +99 *C. imicola*.

<sup>b</sup> +99 *C. newsteadi*.

by computing the Pearson coefficient between observed and predicted data.

### 2.8. Model validation

We used 555 *Obsoletus* complex females collected at three different sites to validate the model. Collections were carried out at St Denis les Rebais (48°50'N, 3°11'E) from 14 to 15 April 2009, at Bastelicaccia (41°56'N, 8°49'E) from 22 to 23 June 2009 and at Bonnay (49°55'N, 2°30'E) from 23 to 24 June 2009. We used 185 females from each collection site to compose mixed samples of 5 (3 replicates), 10 (2 replicates), 50 (1 replicate) and 100 (1 replicate) specimens to evaluate prediction accuracy with samples of various sizes. For each of the 21 samples, females were dissected and the heads pooled in the respective one-tube mixed sample. The remainder of each midge was individually identified using qPCR. One-tube mixed samples with heads were quantified in triplicate by the qPCR developed using the standard curves. *Culicoides* (or parts of *Culicoides*) present in each of the mixed sample were processed together for each composition, genomic DNA was extracted from the homogenised mixed samples. The probe detection data were imported to R software and the model

developed was used to predict the number of *C. obsoletus* in each sample.

## 3. Results

Quantitative real-time PCR was designed to be used in duplex (presence of all the primers and probes in the same reaction tube) enabling simultaneous detection of *C. obsoletus* and *C. scoticus* in one single tube containing a mixture of *Obsoletus* complex specimens. The melting temperature ( $T_m$ ) of the PCR products generated from the standard and the samples was approximately 77 °C for ITS1 and 73 °C for the ITS2. No non-specific amplification was observed in any of the samples. The qPCR protocol was then evaluated by testing DNA extractions from trap catches.

### 3.1. Linearity of the real-time PCR method

Two standard curves were used: one for *C. obsoletus* and one for *C. scoticus*. They were generated using the real-time PCR system software by measuring the crossing point of each standard point, the  $C_t$  value, and plotting against the logarithm of concentration. For each species, the standard curve was linear over the entire quantification range and

**Table 3**  
Non-Obsoletus complex specimens used to test specificity.

Species	Number of males	Number of females	Collection site	Geographical coordinates
<i>C. abchazicus</i> Dzhafarov, 1964	2		Jarsy	45° 40'N, 6° 14'E
<i>C. achray</i> Kettle and Lawson, 1955		1	Champignelles	47° 46'N, 3° 04'E
<i>C. alazanicus</i> Dzhafarov, 1961		1	Figari	41° 30'N, 9° 05'E
<i>C. begueti</i> Clastrier, 1957		1	Le Castellet	43° 12'N, 5° 45'E
<i>C. brunnicans</i> Edwards, 1939		1	Le Miroir	46° 33'N, 5° 20'E
<i>C. cameroni</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960		1	Ristolas	44° 46'N, 6° 57'E
<i>C. cataneii</i> Clastrier, 1957		1	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E
<i>C. chiopterus</i> (Meigen, 1830)	9		Orbey	48° 07'N, 7° 10'E
<i>C. chiopterus</i> (Meigen, 1830)	1		Chauffour les Bailly	48° 12'N, 4° 17'E
<i>C. circumscriptus</i> Kieffer, 1918		1	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E
<i>C. clastrieri</i> Callot, Kremer and Deduit, 1962		1	Bonnay	49° 55'N, 2° 30'E
<i>C. comosioculatus</i> Tokunaga, 1956		1	Juf	46° 26'N, 9° 34'E
<i>C. dendriticus</i> Boorman, 1976		1	Bastelicaccia	41° 56'N, 8° 49'E
<i>C. derisor</i> Callot and Kremer, 1965		1	Vidauban	43° 26'N, 6° 29'E
<i>C. dewulfi</i> Goetghebuer, 1936		9	LongevilleEn Barrois	48° 44'N, 5° 13'E
<i>C. dewulfi</i> Goetghebuer, 1936	1		Villers le Tourneur	49° 37'N, 4° 34'E
<i>C. fagineus</i> Edwards, 1939		1	Oberhaslach	48° 32'N, 7° 21'E
<i>C. fascipennis</i> (Staeger, 1839)		1	Mont le Vernois	47° 36'N, 6° 03'E
<i>C. festivipennis</i> Kieffer, 1914		1	Figari	41° 30'N, 9° 05'E
<i>C. flavipulicaris</i> Dzhafarov, 1964		1	Porto-Vecchio	41° 35'N, 9° 15'E
<i>C. furcillatus</i> Callot, Kremer and Paradis, 1962		1	Menton	43° 47'N, 7° 29'E
<i>C. griseidorsum</i> Kieffer, 1918		1	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E
<i>C. heliophilus</i> Edwards, 1921		1	Chiddes	46° 52'N, 3° 54'E
<i>C. heteroclitus</i> Kremer and Callot, 1965		1	Grimaud	43° 15'N, 6° 31'E
<i>C. imicola</i> Kieffer, 1913		10	Figari	41° 30'N, 9° 05'E
<i>C. impunctatus</i> Goetghenuer, 1920		1	Chiddes	46° 52'N, 3° 54'E
<i>C. indistinctus</i> Khalaf, 1961		1	Menton	43° 47'N, 7° 29'E
<i>C. jumineri</i> Callot and Kremer, 1969		1	St Martin de Crau	43° 37'N, 4° 49'E
<i>C. kibunensis</i> Tokunaga, 1937		1	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E
<i>C. kurensis</i> Dzhafarov, 1960		1	St Mitre Les Remparts	43° 26'N, 5° 00'E
<i>C. longipennis</i> Khalaf, 1957		1	Jonquières	43° 02'N, 2° 42'E
<i>C. lupicaris</i> Downes and Kettle, 1952		1	Jonquières	43° 02'N, 2° 42'E
<i>C. malevillei</i> Kremer and Coluzzi, 1971		1	Vidauban	43° 26'N, 6° 29'E
<i>C. maritimus</i> Kieffer, 1924		1	Serra di Ferro	41° 43'N, 6° 29'E
<i>C. montanus</i> Shakirzjanova, 1962		2	Cargese	42° 08'N, 8° 37'E
<i>C. montanus</i> Shakirzjanova, 1962		2	Fozzano	41° 41'N, 9° 00'E
<i>C. newsteadi</i> Austen, 1921		1	Sartene	41° 37'N, 8° 58'E
<i>C. nubeculosus</i> (Meigen, 1830)		1	Rubrouck	50° 49'N, 2° 22'E
<i>C. odiatus</i> Austen, 1921		2	Porto-Vecchio	41° 35'N, 9° 15'E
<i>C. pallidicornis</i> Kieffer, 1919		1	Geispolsheim	48° 30'N, 7° 38'E
<i>C. parroti</i> Kieffer, 1922		1	Les Pennes Mirabeau	43° 24'N, 5° 16'E
<i>C. pictipennis</i> (Staeger, 1839)		1	Mont le Vernois	47° 36'N, 6° 03'E
<i>C. picturatus</i> Kremer and Deduit, 1961		1	Vidauban	43° 26'N, 6° 29'E
<i>C. poperinghensis</i> Goetghebuer, 1953		4	Chauffour les Bailly	48° 12'N, 4° 17'E
<i>C. poperinghensis</i> Goetghebuer, 1953		1	Malzeville	48° 43'N, 6° 10'E
<i>C. pulicaris</i> (Linnaeus, 1758)		1	Argeles Sur Mer	42° 31'N, 3° 03'E
<i>C. punctatus</i> (Meigen, 1804)		1	Figari	41° 30'N, 9° 05'E
<i>C. puncticollis</i> (Becker, 1903)		1	Lucciana	42° 32'N, 9° 28'E
<i>C. reconditus</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960		1	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E
<i>C. riethi</i> Kieffer, 1914		1	Morsains	48° 48'N, 3° 31'E
<i>C. riouxi</i> Callot and Kremer, 1961		1	Brognon	49° 55'N, 4° 18'E
<i>C. saevus</i> Kieffer, 1922		1	Naama	33° 15'N, 0° 19'O
<i>C. sahariensis</i> Kieffer, 1923		1	Vic La Gardiole	43° 28'N, 3° 46'E
<i>C. santonicus</i> Callot, Kremer, Rault and Bach, 1966	1		Figari	41° 30'N, 9° 05'E
<i>C. segnis</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960		1	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E
<i>C. simulator</i> Edwards, 1939		1	Champignelles	47° 46'N, 3° 04'E
<i>C. sinanoensis</i> Tokunaga, 1937		6	Ussuriisk	43° 39'N, 132° 18'E
<i>C. stigma</i> (Meigen, 1818)		1	Hericy	48° 26'N, 2° 47'E
<i>C. subfagineus</i> Delécolle and Ortega, 1998		1	Porto Vecchio	41° 35'N, 9° 15'E
<i>C. submaritimus</i> Dzhafarov, 1962		1	Salses Le Chateau	42° 49'N, 2° 57'E
<i>C. tauricus</i> Gutsevitch, 1959		3	Saignon	43° 51'N, 5° 27'E
<i>C. tauricus</i> Gutsevitch, 1959		1	Ventavon	44° 20'N, 5° 55'E
<i>C. truncorum</i> Edwards, 1939	1		Venoy	47° 47'N, 3° 39'E
<i>C. univittatus</i> Vimmer, 1932	1		Figari	41° 30'N, 9° 05'E
<i>C. vexans</i> (Staeger, 1839)		1	Le Miroir	46° 33'N, 5° 20'E

**Table 4**

Origin of the males used to calibrate the predictive model of the relative abundance of *C. obsoletus* and *C. scoticus*. "Sample obs/scot" gives the total amount of specimens of *C. obsoletus* and *C. scoticus* present in the same mixed sample.

Sample <i>obsoletus</i> / <i>scoticus</i>	Species	Number of males	Collection site	Geographical coordinates		
100/0	<i>C. obsoletus</i>	100	Adam les Passavant	47° 17'N, 6° 21'E		
	<i>C. scoticus</i>	0	–	–		
99/1	<i>C. obsoletus</i>	57	Chiddes	46° 52'N, 3° 54'E		
		15	Ercourt	50° 02'N, 1° 43'E		
		13	Nuncq Hautecote	50° 18'N, 2° 17'E		
		9	St Denis les Rebais	48° 50'N, 3° 11'E		
		5	Chaussy	49° 07'N, 1° 41'E		
		1	Multifao	42° 28'N, 9° 07'E		
99/1	<i>C. obsoletus</i>	25	Lizy	49° 30'N, 3° 28'E		
		23	Villers le Tourneur	49° 37'N, 4° 34'E		
		23	Chanceaux	47° 31'N, 4° 43'E		
		16	Ercourt	50° 02'N, 1° 43'E		
		12	Zehnacker	48° 40'N, 7° 27'E		
		1	Lizy	49° 30'N, 3° 28'E		
95/5	<i>C. obsoletus</i>	60	Vandenesse en Auxois	47° 13'N, 4° 36'E		
		24	Villiers sur Marne	48° 19'N, 5° 08'E		
		11	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E		
		5	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E		
		5	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E		
95/5	<i>C. obsoletus</i>	22	St Hilaire au Temple	49° 03'N, 4° 23'E		
		20	Lachapelle sous Rougemont	47° 43'N, 7° 01'E		
		18	Venoy	47° 47'N, 3° 39'E		
		17	Hericy	48° 26'N, 2° 47'E		
		13	Vandenesse en Auxois	47° 13'N, 4° 36'E		
		5	Chauffour les Bailly	48° 12'N, 4° 17'E		
		3	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E		
		2	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E		
		70/30	<i>C. obsoletus</i>	70	Mont le Vernois	47° 36'N, 6° 03'E
		<i>C. scoticus</i>	15	La Chapelle-Thecle	46° 33'N, 5° 06'E	
				15	Ercourt	50° 02'N, 1° 43'E
50/50	<i>C. obsoletus</i>	50	Mont le Vernois	47° 36'N, 6° 03'E		
		17	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E		
		12	Cobonne	44° 44'N, 5° 04'E		
		11	Espagnac	45° 14'N, 1° 51'E		
		2	Multifao	42° 28'N, 9° 07'E		
		1	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E		
		1	Cargese	42° 08'N, 8° 37'E		
		1	Longeville en Barrois	48° 44'N, 5° 13'E		
		1	St Hilaire au Temple	49° 03'N, 4° 23'E		
		1	Filstroff	49° 19'N, 6° 32'E		
		1	Chiddes	46° 52'N, 3° 54'E		
		1	Nuncq Hautecote	50° 18'N, 2° 17'E		
		1	Chanceaux	47° 31'N, 4° 43'E		
		30/70	<i>C. obsoletus</i>	16	Champignelles	47° 46'N, 3° 04'E
14	Venoy			47° 47'N, 3° 39'E		
16	Adam les Passavant			47° 17'N, 6° 21'E		
13	Ercourt			50° 02'N, 1° 43'E		
11	Le Miroir			46° 33'N, 5° 20'E		
4	San Giuliano			42° 17'N, 9° 32'E		
3	Orbey			48° 07'N, 7° 10'E		
3	Venoy			47° 47'N, 3° 39'E		
2	St Hilaire au Temple			49° 03'N, 4° 23'E		
2	Bonnay			49° 55'N, 2° 30'E		
2	Vandenesse en Auxois			47° 13'N, 4° 36'E		
2	Frenelle la Grande			48° 21'N, 6° 05'E		
2	St Denis les Rebais			48° 50'N, 3° 11'E		
2	Hucqueliers			50° 34'N, 1° 55'E		
1	Catigny			49° 38'N, 2° 56'E		
1	Chaussy			49° 07'N, 1° 41'E		
1	Champignelles			47° 46'N, 3° 04'E		
1	Nompatelize			48° 20'N, 6° 50'E		
1	Bondues			50° 43'N, 3° 05'E		
1	Chiddes			46° 52'N, 3° 54'E		
1	St Germain Chassenay	46° 47'N, 3° 22'E				
1	Figari	41° 30'N, 9° 05'E				

Table 4 (Continued)

Sample <i>obsoletus/scoticus</i>	Species	Number of males	Collection site	Geographical coordinates
5/95	<i>C. obsoletus</i>	5	Lachapelle sous Rougemont	47° 43'N, 7° 01'E
	<i>C. scoticus</i>	36	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E
		24	Barjols	43° 32'N, 5° 58'E
		19	St Jeoire	46° 08'N, 6° 27'E
		16	La Bollene Vesubie	43° 58'N, 7° 19'E
1/99	<i>C. obsoletus</i>	1	Lachapelle sous Rougemont	47° 43'N, 7° 01'E
	<i>C. scoticus</i>	99	Douville en Auge	49° 15'N, 0° 00'W
0/100	<i>C. obsoletus</i>	0	–	–
	<i>C. scoticus</i>	27	Bastelicaccia	41° 56'N, 8° 49'E
		20	San Giuliano	42° 17'N, 9° 32'E
		19	Orbey	48° 07'N, 7° 10'E
		15	Figari	41° 30'N, 9° 05'E
		7	Nompateize	48° 20'N, 6° 50'E
		7	Abaucourt Hautecourt	49° 12'N, 5° 33'E
		3	Bonnay	49° 55'N, 2° 30'E
2	Champignelles	47° 46'N, 3° 04'E		

resulted in an error of less than 1.0, with a linear regression value  $R^2$  of 0.997, ( $Y = -3.910 \times \log(X) + 13.50$ ) and 0.998 ( $Y = -3.846 \times \log(X) + 13.51$ ) for *C. obsoletus* and *C. scoticus* respectively, indicating a strong correlation between the ranges used from  $10^{-1}$  ng to  $10^{-5}$  ng.

### 3.2. Sensitivity and specificity

Table 5 shows the qPCR assay results versus morphological identification performed on the 206 samples (52 individual samples and 50 mixed samples for sensitivity and 104 non-*Obsoletus* complex specimens for specificity). All *Obsoletus* complex specimens were correctly identified giving a sensitivity of 100%. Two of the four specimens of *C. montanus* (“other species” by morphology in Table 5) were erroneously detected as *C. obsoletus* by qPCR, giving a specificity of 98%.

### 3.3. Estimation of relative abundance

Estimation of the relative quantity of *C. obsoletus* DNA by the real-time system was highly reproducible, as illustrated by the superposition of replicate results (Fig. 1). Eq. (1) fitted the observed data perfectly (Pearson coefficient of 0.999). The validation set confirmed that the real-time system was reproducible. Indeed, prediction replicates did not give exactly the same results for only 4 out of 21 samples – with differences of only one specimen (Fig. 2). Predictions were correct for 10 samples (Fig. 2). Observed differences remained low (two specimens or less) in 10 samples, what-

ever the sample size. In only one large sample did the absolute difference reach seven specimens (error of 13%). The Spearman correlation coefficient between the numbers of *C. obsoletus* present and predicted was 0.996.

## 4. Discussion

The development of real time PCR techniques is a critical need for the diagnosis and surveillance programs of vectors such as *Anopheles gambiae* or *Anopheles funestus* complexes (Bass et al., 2008; Vezenegho et al., 2009) or diseases such as rabies, chikungunya, tick born encephalite and bluetongue (Gaumann et al., 2010; Smith et al., 2009; Vandebussche et al., 2010). It is especially crucial when dealing with closely related species or sibling species such as African and Asian *Anopheles* spp. groups (Garros et al., 2004). Other PCR-based assays have been developed to help difficult morphological identification of some Asian sand-flies that are vectors of leishmaniasis (Manonmani et al., 2010), and also on Euro-Asian vectors of tick-borne pathogens (Rumer et al., 2010). These assays have to be run on individual specimens and are time-consuming when quantifying large samples. The ability to determine easily the number of individuals of different sibling species in a mixed sample using a one-step reaction will greatly improve knowledge on the distribution and ecology of species complex members.

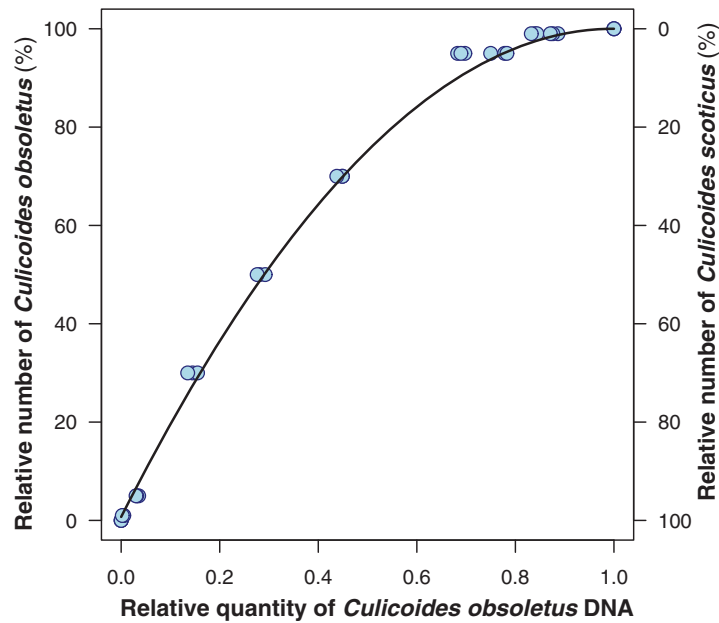
The potential of real-time PCR assays for quantifying DNA was explored to deduce the relative abundance of sibling species in a sample of mixed individuals when the limits of morphology were reached. Our findings showed a relation between the quantities of DNA (ng) calculated by quantitative real-time PCR and the number of *Obsoletus* complex specimens. We developed a quadratic model to predict, with confidence (Pearson coefficient of 0.999), the relative abundance of *C. obsoletus* and *C. scoticus* within specimens in a one-shot reaction. The evaluation of duplex qPCR was assessed with more than 6000 specimens with only 2 out of 4 *C. montanus* specimens detected as false positives of *C. obsoletus*. *Culicoides montanus* is a rare species phylogenetically closely related to *C. obsoletus* (Gomulski et al., 2005), for which the tax-

Table 5

Contingency table with the number of specimens identified both by morphology (gold standard) and with the quantitative real-time PCR assay. Specimen numbers were not quantified by qPCR.

	Morphology			Total
	<i>C. obsoletus</i>	<i>C. scoticus</i>	Other species	
Real-time PCR				
<i>C. obsoletus</i>	52	0	2	54
<i>C. scoticus</i>	0	50	0	50
Other species	0	0	102	102
Total	52	50	104	206



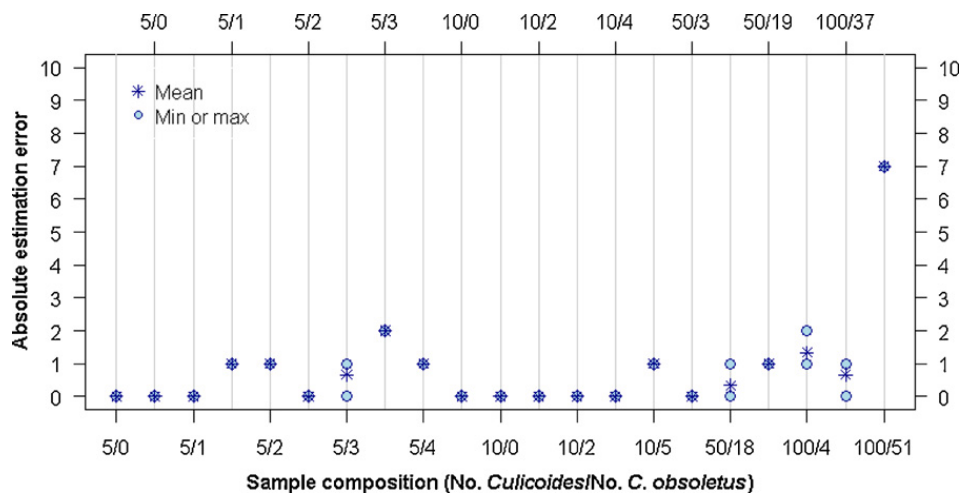


**Fig. 1.** Relative quantity of *C. obsolete* DNA estimated as a function of the relative number of *C. obsolete* or *C. scoticus* specimens present in 11 one-tube mixed samples of 100 males (3 replicates) with the following composition of *C. obsolete* and *C. scoticus* respectively: 100/0, 99/1, 99/1, 95/5, 95/5, 70/30, 50/50, 30/70, 5/95, 1/99, 0/100. A quadratic model (black line) correctly fitted the observed data (Pearson coefficient of 0.999).

onomic status is still controversial (Garros et al., 2010). Whilst *C. obsolete* is abundant and widely distributed over the holarctic region, *C. montanus* exists in low numbers in a more limited geographical distribution: Kazakhstan, Turkmenistan, Kirghizstan, Tajikistan, Uzbekistan, Israel (Remm, 1988), Yemen, Turkey, Morocco (Boorman, 1989), Spain (Delécolle, 2002), Italy (Boorman et al., 1995), Corsica (Mathieu et al., 2007) and Algeria (Delécolle, personal communication). Consequently, duplex qPCR is an efficient tool for countries where *C. obsolete* and *C. scoticus* are widely distributed in sympatry with high abundance. In areas where *C. montanus* is known to occur, the multiplex PCR-based assay of Mathieu et al. (2007), or the qualitative real-time PCR of Monaco et al. (2010), can be used to identify *C. montanus* individuals.

The quadratic model relating the relative quantity of DNA and the number of individuals was developed using

a total of 1100 *Obsoleteus* complex males. A single specimen of *C. obsolete* (or *C. scoticus*) within 99 specimens of *C. scoticus* (or *C. obsolete*) was detected without doubt. The same model successfully predicted the relative number of *C. obsolete* in pools of 5–100 females, with an absolute error below 2 individuals in 20 out of 21 cases (95%). This qPCR assay could thus be applied on pools of various numbers of individuals. However, its application to large samples will ensure that relative error is minimized. Indeed, for large samples (50 and 100 individuals, and number of *C. obsolete* > 5) the average error percentage ( $|\text{predicted number} - \text{correct number}| / \text{correct number}$ ) was 6% (min=0 and max=14%) – an error of less than 10% can be considered acceptable for population estimations in high-diversity groups (Southwood and Henderson, 2000). For small samples, the discrimination of *C. obsolete* and *C. scoticus* can be carried out individu-



**Fig. 2.** Absolute values (min, max and mean) of differences between model prediction and the correct number of *C. obsolete* in each sample. Samples were ordered following sample size.

ally by a conventional multiplex PCR assay based on COI (Nolan et al., 2007) or on ITS1 (Mathieu et al., 2007), or by a qualitative real-time system based on ITS2 (Monaco et al., 2010).

Quantitative real-time PCR assays constitute an important improvement in molecular identification techniques, as it offers a quicker and cheaper way of assessing species abundance than conventional PCR assays. Cêtre-Sossah et al. (2008) developed a quantitative PCR based on SYBR Green technology to estimate the abundance of *C. imicola* among all the insects caught in a light trap. Our new high-throughput qPCR assay based on TaqMan® probes was developed to simultaneously estimate the abundance of *C. obsoletus* and *C. scoticus* in a mixed sample containing a known number of *Obsoletus* complex individuals. Testing samples from other European countries will be the next stage of testing. Because it has no requirement for post-PCR processing, this method is simple, rapid to run and adapted for high throughput assays. The cost could be considered as a disadvantage of the TaqMan assay, both in terms of initial capital outlay and running cost per sample if few samples need to be analyzed. This huge amount of *Culicoides* treated individually using conventional PCR would be tedious in time with a 14 fold higher cost than a single run using the qPCR developed.

Extensive trapping surveys were implemented throughout Europe after the emergence of the BTV-8 serotype. These surveys collected a huge amount of distribution and dynamics data. However, *C. obsoletus* and *C. scoticus* individuals remained grouped under the taxon of the *Obsoletus* complex, which can amount up to 80% of the individuals collected in France annually (Balenghien, personal communication), due to the difficulty in morphologically separating these species. Using this new quantitative qPCR assay, it is now possible to retrospectively identify samples collected by a trapping network to determine the distribution and dynamics of both species, and thus to infer their potential roles in spreading BTV-8.

The same approach can be applied to complex species in other groups of vectors, to investigate the respective implication of sibling species in transmission.

## Acknowledgements

This work was partially funded by the French Ministry of Agriculture. We used specimens collected by the French surveillance network. Thus, the authors are grateful to all veterinary services for field collections and to X. Allène, L. Gardès, I. Rakotoarivony, R. Venail and D. Delécolle, who carried out *Culicoides* identification. We also thank I. Kayser and E. Lenotre from Applied Biosystems for their kind help in designing the MGB probes. Finally, we thank colleagues A. Przhiboro, N. Brodskaja from Russia, F. Schaffner from Switzerland and M. Djerbal from Algeria, for sending specimens from their countries.

## References

Augot, D., Sauvage, F., Jouet, D., Simphal, E., Veuille, M., Couloux, A., Kaltenbach, M.L., Depaquit, J., 2010. Discrimination of *Culicoides*

- obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect. Genet. Evol.* 10, 629–637.
- Bass, C., Williamson, M.S., Field, L.M., 2008. Development of a multiplex real-time PCR assay for identification of members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Acta Trop.* 107, 50–53.
- Boorman, J., 1989. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna of Saudi Arabia* 10, 160–224.
- Boorman, J., Coluzzi, M., Contini, C., Ferrarese, U., Rivosecchi, L., Rossaro, B., Sabatini, A., Wagner, R. (Eds.), 1995. Checklist Delle Specie della Fauna d'Italia. Società Entomologica Italiana, Roma, p. 33 (in Italian).
- Campbell, J.A., Pelham-Clinton, E.C., 1960. A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proc. R. Soc. Edinb.* 68, 181–302.
- Carpenter, S., Lunt, H.L., Arav, D., Venter, G.J., Mellor, P.S., 2006. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J. Med. Entomol.* 43, 73–78.
- Carpenter, S., McArthur, C., Selby, R., Ward, R., Nolan, D.V., Luntz, A.J., Dallas, J.F., Tripet, F., Mellor, P.S., 2008. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet. Rec.* 163, 589–592.
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., Albina, E., 2004. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Africa and Europe, by ITS1rDNA PCR amplification. *Vet. Res.* 35, 325–337.
- Cêtre-Sossah, C., Mathieu, B., Setier-Rio, M.L., Grillet, C., Baldet, T., Delécolle, J.C., Albina, E., 2008. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res. Vet. Sci.* 85, 372–382.
- De Clercq, K., Mertens, P., De Leeuw, I., Oura, C., Houdart, P., Potgieter, A.C., Maan, S., Hooyberghs, J., Batten, C., Vandemeulebroucke, E., Wright, I.M., Maan, N., Riocreux, F., Sanders, A., Vanderstede, Y., Nomikou, K., Raemaekers, M., Bin-Tarif, A., Shaw, A., Henstock, M., Breard, E., Dubois, E., Gastaldi-Thiery, C., Zientara, S., Verheyden, B., Vandenbussche, F., 2009. Emergence of bluetongue serotypes in Europe, part 2: the occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. *Transbound Emerg. Dis.* 56, 355–361.
- Delécolle, J.C., 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. In: Thèse D'état n°56. Université Louis Pasteur de Strasbourg I, Strasbourg, p. 238 (in French).
- Delécolle, J.C. (Ed.), 2002. *Catalogo de los Diptera de Espana, Portugal y Andorra* (Insecta). Monografias Sociedad Entomologica Aragonesa, Zaragoza, pp. 26–33 (in Portuguese).
- Dijkstra, E., van der Ven, I.J., Meiswinkel, R., Holzel, D.R., Van Rijn, P.A., 2008. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet. Rec.* 162, 422.
- Garros, C., Koekemoer, L.L., Coetzee, M., Coosemans, M., Manguin, S., 2004. A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 583–590.
- Garros, C., Mathieu, B., Balenghien, T., Cêtre-Sossah, C., Delécolle, J.C., 2010. Suggesting synonymies? Comments on Kiehl et al. (2009) "the European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?". *Parasitol. Res.* 107, 731–734.
- Gaumann, R., Muhlemann, K., Strasser, M., Beuret, C.M., 2010. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4241–4249.
- Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2005. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst. Entomol.* 30, 619–631.
- Hoffmann, B., Bauer, B., Bauer, C., Batza, H.J., Beer, M., Clausen, P.H., Geier, M., Gethmann, J.M., Kiel, E., Liebisch, G., Liebisch, A., Mehlhorn, H., Schaub, G.A., Werner, D., Conraths, F.J., 2009. Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1481–1484.
- Manonmani, A.M., Mathivanan, A., Srinivasan, R., Jambulingam, P., 2010. Species-diagnostic polymerase chain reaction assays for *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi*, vectors of Leishmania. *J. Med. Entomol.* 47, 743–747.

- Mathieu, B., Perrin, A., Baldet, T., Delécolle, J.C., Albina, E., Cêtre-Sossah, C., 2007. Molecular identification of Western European species of *obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J. Med. Entomol.* 44, 1019–1025.
- Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijts, P., Goffredo, M., 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet. Rec.* 161, 564–565.
- Monaco, F., Benedetto, L., Di Marcello, V., Lelli, R., Goffredo, M., 2010. Development and preliminary evaluation of a real-time polymerase chain reaction for the identification of *Culicoides obsoletus sensu strictu*, *C. scoticus* and *C. montanus* in the *obsoletus* complex in Italy. *Vet. Ital.* 46, 215–220.
- Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P.S., Dallas, J.F., Mordue Luntz, A.J., Piertney, S.B., 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet. Microbiol.* 124, 82–94.
- Pagès, N., Muñoz-Munoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C., Nunez, J.I., 2009. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Vet. Parasitol.* 165, 298–310.
- Pagès, N., Sarto, I., Monteys, V., 2005. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *J. Med. Entomol.* 42, 1026–1034.
- Pili, E., Carcangiu, L., Oppo, M., Marchi, A., 2010. Genetic structure and population dynamics of the biting midges *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*: implications for the transmission and maintenance of bluetongue. *Med. Vet. Entomol.* 24, 441–448.
- R Development Core Team, 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>.
- Remm (Ed.), 1988. Catalogue of Palaearctic Diptera. , pp. 1–114.
- Rumer, L., Sheshukova, O., Dautel, H., Mantke, O.D., Niedrig, M., 2010. Differentiation of medically important Euro-Asian tick species *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, doi:10.1089/vbz.2009.0191.
- Schwenkenbecher, J.M., Mordue, A.J., Switek, K., Piertney, S.B., 2009. Discrimination of *Culicoides* midge larvae using multiplex polymerase chain reaction assays based on DNA sequence variation at the mitochondrial cytochrome C oxidase I gene. *J. Med. Entomol.* 46, 610–614.
- Smith, D.R., Lee, J.S., Jahrling, J., Kulesh, D.A., Turell, M.J., Groebner, J.L., O'Guinn, M.L., 2009. Development of field-based real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for detection of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses in mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 679–684.
- Southwood, T.R.E., Henderson, P.A., 2000. *Ecological Methods*, Third edition. Wiley–Blackwell, p. 592.
- Vandenbussche, F., Vandemeulebroucke, E., De Clercq, K., 2010. Simultaneous detection of bluetongue virus RNA, internal control GAPDH mRNA, and external control synthetic RNA by multiplex real-time PCR. *Methods Mol. Biol.* 630, 97–108.
- Vezenegho, S.B., Bass, C., Puinean, M., Williamson, M.S., Field, L.M., Coetzee, M., Koekemoer, L.L., 2009. Development of multiplex real-time PCR assays for identification of members of the *Anopheles funestus* species group. *Malaria J.* 8, 282.
- Wilson, A., Mellor, P., 2008. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitol. Res.* 103 (Suppl. 1), S69–77.



### 3. Conclusion

La PCR quantitative développée permet de quantifier l'abondance relative de *C. obsoletus* et de *C. scoticus* simultanément à partir de lots de spécimens mélangés. Le modèle quadratique reliant quantité d'ADN détectée et nombre de spécimens à la base de cet outil opérationnel, a été développé à partir de 1 100 mâles et les prédictions du modèle validées à partir de 555 femelles. La spécificité de cette qPCR est évaluée avec 5 156 individus appartenant à 62 espèces. L'outil révèle une erreur de deux spécimens ou moins pour 95% des prédictions ce qui est minime pour une application en lots de 100 individus. Les limites pour la prédiction sont de connaître le nombre total de spécimens présents et appartenant au complexe *Obsoletus* utilisé. Cette limite est plus problématique dans le cas d'une application de cet outil en écologie larvaire. L'identification morphologique des larves est très difficile et il n'est pas envisageable d'identifier des lots de larves comme appartenant au complexe *Obsoletus*. Ainsi, la qPCR développée n'est pas applicable en l'état pour quantifier chacune des deux espèces (bien que largement applicable pour l'identification en individuel). Une perspective intéressante serait de dessiner une sonde générique et d'en construire le modèle de relation entre quantité d'ADN et nombre d'individus. Utilisé en duplex avec chacune des sondes spécifiques de *C. obsoletus* et de *C. scoticus*, la quantification des larves en lots de chacune des espèces serait alors possible. Sur le même principe, d'autres espèces pourraient être ciblées. L'avantage le plus important de cet outil est son application sur des lots de spécimens. S'il est vrai que pour l'identification d'un seul spécimen, le coût de revient de la qPCR est 10 fois plus important qu'une PCR classique, il n'en demeure pas moins que le travail en lots de spécimens diminue les coûts à 14 fois moins. Au-delà du coût, le travail en lot représente un gain de temps considérable en manipulation.

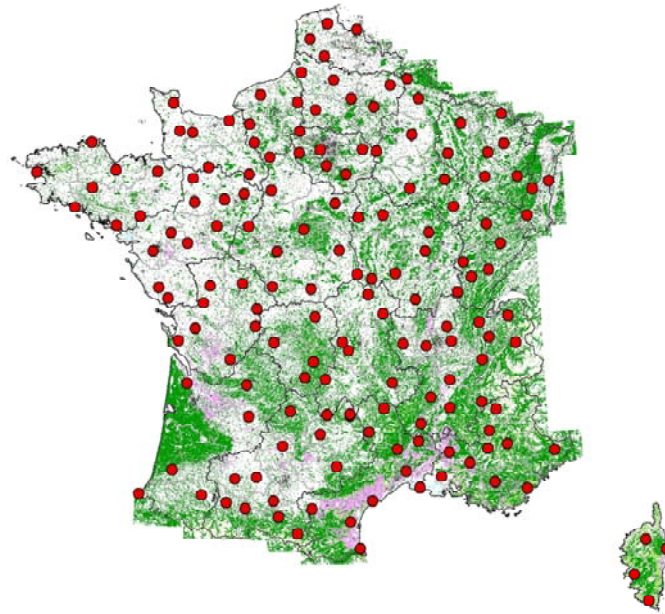
Prenons par exemple un échantillon de 100 femelles identifiées morphologiquement comme appartenant au complexe *Obsoletus*, *i.e.* soit *C. obsoletus* soit *C. scoticus*. Pour connaître la quantité relative de chacune de ces deux espèces dans cet échantillon par l'utilisation des PCR diagnostiques *qualitatives*<sup>25</sup> existantes, il faudrait extraire l'ADN de chacun des spécimens et appliquer la PCR sur chacun des 100 échantillons ADN. Avec la qPCR développée, une seule extraction d'ADN est réalisée pour le lot des 100 femelles et cet unique échantillon est soumis à la qPCR. Cet avantage permet de rendre possible la collecte de données d'abondance de ces

---

<sup>25</sup> Les PCR diagnostics existantes sont qualifiées de qualitatives car permettent de conclure une présence ou absence et donc ne sont applicable qu'uniquement par individu *i.e.* 1 puits est utilisé pour 1 spécimen.

deux espèces dans un vaste réseau de surveillance entomologique tel que celui opéré actuellement en France (Figure 15).

Figure 15 : Localisation des 160 pièges de la surveillance entomologique en France depuis 2009 (Source : Cirad).



A l'échelle d'un tel réseau, prenons l'exemple d'une campagne de piégeage qui collecte 100 femelles du complexe *Obsoletus* dans chacun des 160 pièges. Les 16 000 spécimens analysés en individuel en PCR classique nécessiteraient 166 réactions PCR, alors que passés en 160 lots ils nécessiteraient 4,2 réactions en qPCR<sup>26</sup>. Dans ce contexte, les gains de temps et de coûts sont considérables.

Pour conclure, la qPCR développée rend possible l'acquisition de données d'abondances de deux des vecteurs suspectés de la FCO *C. obsoletus* et *C. scoticus* à l'échelle d'un vaste réseau de surveillance. La distribution et la dynamique saisonnière de ces espèces peut alors être abordée et mise en relation avec l'épidémiologie de la maladie pour une meilleure compréhension de la transmission.

---

<sup>26</sup> Dans ce calcul, l'ensemble des mesures est réalisé en duplicat *i.e.* passé 2 fois pour vérifier l'homogénéité, et tient compte des échantillons, de la gamme étalon et des contrôles négatifs.

## DISCUSSION

L'objectif de ce travail de thèse était de proposer une révision systématique et taxonomique des espèces de *Culicoides* appartenant au sous-genre *Avaritia* à l'échelle mondiale en gardant un cadre évolutif. Cette discussion s'articule autour de plusieurs thèmes. Le nombre de spécimens rassemblés pour cette étude et la variété des modes de conservation oblige à une réflexion sur les méthodes disponibles pour extraire correctement l'ADN tout en conservant l'intégralité des individus. Cet aspect fondamental dans un contexte de *barcoding* des espèces est abordé dans la première partie de cette discussion. Le choix des régions moléculaires utilisées en fonction de l'objectif ciblé sont discutés dans une seconde partie. La dernière partie de cette discussion propose et discute une révision systématique et taxonomique et des hypothèses sur l'évolution du sous-genre *Avaritia*.

### ***Le Barcode of life et l'extraction d'ADN non-destructive.***

Afin de mener à bien mes travaux de thèse et notamment la révision systématique et taxonomique des espèces de *Culicoides* appartenant au sous-genre *Avaritia*, une approche morphologique et moléculaire des spécimens a été envisagée. Ainsi, la conservation des individus entiers et l'obtention d'ADN génomique pour chaque individu sont nécessaires. L'extraction d'ADNg se réalise à partir de spécimens entièrement broyés (méthode destructive) ou à partir du thorax de chaque spécimen (méthode partiellement destructive), organe qui porte généralement peu de caractères diagnostiques. Les autres organes du spécimen peuvent être alors montés entre lame et lamelle selon la technique de Wirth et Marston (1968). L'observation des espèces de la faune asiatique et éthiopienne a permis de mettre en évidence l'importance du thorax pour discriminer certaines espèces, soulignant ainsi que la méthode partiellement destructive n'est pas toujours appropriée. Une méthode non-destructive et permettant d'obtenir de l'ADNg est donc importante. Depuis plusieurs années, avec le développement du *barcode of life* comme standard de l'identification d'espèces, des méthodes non destructives ont été développées et validées pour générer des séquences de spécimens de référence déposés en collection. Rowley *et al.* (2007) proposent des ajustements de protocoles d'extraction non-destructifs pour différents arthropodes au stade adulte sur la région COI et fournissent des liens entre photos de la morphologie des spécimens de références (*MorphBank*) et leurs séquences ADN (*GenBank*). L'extraction d'ADN non-

destructive sur les stades larvaires, nymphaux et adultes a été étudiée pour deux espèces de simulies sur plusieurs régions moléculaires (Hunter *et al.*, 2008). Le protocole de cette dernière étude n'est toutefois pas applicable aux *Culicoides* puisqu'elle nécessite une étape de séchage qui altérerait la morphologie des spécimens. En Australie, Löcker (2009) décrit un protocole exonéré de cette étape de séchage des spécimens. C'est donc ce dernier protocole incluant principalement une étape de digestion enzymatique par la protéinase K que nous avons testé et utilisé (décrit dans le paragraphe résultat du chapitre 7).

### **L'âge des spécimens et les conditions de conservation influent-elles sur la qualité de l'ADN extrait ?**

Les premiers essais du protocole d'extraction non-destructif chez des adultes ont été concluants cependant, une recherche de l'efficacité de la méthode sur des individus conservés en alcool depuis 37 ans (espèce *C. sinanoensis*) a été menée. Une méthode d'extraction d'ADN classique par broyat du spécimen entier *versus* la méthode non-destructive a été testée sur des individus conservés plus de 30 ans dans de l'éthanol (annexe 14). Les deux méthodes ont permis l'amplification et le séquençage de l'ensemble des régions moléculaires étudiés ici (ITS1, ITS2, D3, COI, COII et Cytb). Toutefois, des adultes conservés sur une période moins longue de quelques années ont montrés des difficultés d'extraction et/ou de séquençage. L'expérience acquise au cours de ce travail permet de dégager quelques recommandations pour la conservation des spécimens en vue d'une utilisation ultérieure en biologie moléculaire. La congélation n'est pas recommandée car elle abîme fortement les spécimens qui deviennent très difficiles à exploiter pour des observations morphologiques. Le moyen de conservation idéal est de rassembler l'ensemble des spécimens en tube mono-spécifique, limitant ainsi les contaminations inter-espèces en alcool, à l'abri de la lumière et des écarts de température.

### **La méthode non-destructive permet-elle une bonne observation morphologique du spécimen ?**

Après l'étape de digestion enzymatique, les spécimens apparaissent vides. Ils sont rincés dans de l'éthanol puis plongés dans une solution saturée d'alcool/phénol avant la dissection. La fragilité de la tête rend difficile sa séparation du thorax tout en la conservant en bon état et elle est fortement éclaircie ce qui est un avantage pour détecter la présence ou non d'une fine pubescence entre les omatidies.

## Le choix des marqueurs moléculaires

Les gènes codant pour des protéines d'origine nucléaire sont des bons marqueurs pour les relations inter-famille ou inter-générique (Besansky et Fahey, 1997). Une étude sur l'ensemble des ordres d'insectes holométaboles basée sur deux régions nucléaires codantes : le 16S et le 18S, mais aussi sur la morphologie, a permis de démontrer la monophylie de la plupart des ordres (Whiting *et al.*, 1997). Récemment, l'étude des relations phylogénétiques au niveau générique au sein de la famille des Culicidae à l'aide de six gènes nucléaires codant pour des protéines (*arginine kinase*, *CAD*<sup>27</sup>, *catalase*, *enolase*, *hunchback* et *white*) montre une monophylie des tribus Anophelini, Aedini et Sabethini, mais ne permet pas de conclure quant aux relations entre les genres (Reidenbach *et al.*, 2009). Le domaine D3 de la région codant pour la sous-unité ribosomale 28S, est utilisé pour la phylogénie au sein des Culicidae. Ce marqueur s'est avéré utile dans le cadre d'espèces cryptiques de certaines anophèles appartenant aux groupes *Funestus* et *Minimus* où il a permis en association avec le COII et la morphologie, de proposer une classification des deux groupes (Garros *et al.*, 2005). Toujours chez les anophèles, l'absence de diversité intraspécifique pour le D3 a été observé au sein du groupe *Maculatus* en Chine (Ma *et al.*, 2006). Dans le cadre de cette thèse, le polymorphisme du domaine D3 était trop faible pour donner un signal phylogénétique intéressant. En revanche, ce domaine D3 pourrait s'avérer intéressant pour une étude inter-genre au sein de la famille des Ceratopogonidae ou peut être même pour une étude intersubgénérique. En effet, les pourcentages d'identité relevés étaient les moins élevés entre les espèces appartenant au sous-genre *Pontoculicoides* et d'autres appartenant au sous-genre *Avaritia*.

Par définition, les régions non codantes ne sont pas traduites en protéines. Ainsi, les erreurs de duplication qui engendrent des *indels* c'est à dire l'insertion ou la délétion de un ou plusieurs nucléotides, ne sont pas corrigées dans le génome. La présence d'*indels* est une des difficultés rencontrée lors de l'alignement des séquences. Ce problème a été rencontré pour les régions ITS1 et ITS2 étudiées au cours de cette thèse lors de l'ajout de séquences d'espèces externes au sous-genre étudié. La multiplicité et la taille des *indels* chez ces espèces ont éprouvé les logiciels d'alignements utilisés et le choix du meilleur alignement n'a pu être fait que de façon visuelle. Les séquences générées pour les régions ITS1 et 2 semblent trop éloignées, avec des pourcentages d'homologie trop élevés pour l'ensemble des espèces d'intérêt

---

<sup>27</sup> Le locus CAD code pour une protéine de fusion et son nom dérive des fonctions enzymatiques *carbamoylphosphate synthetase*, *aspartate transcarbamylase* et *dihydroorotase*.

accumulant de multiples mutations et *indels* saturant l'information, pour être utilisables dans l'étude des relations phylogénétiques au-delà de la famille. L'étude de Perrin (2006) à partir de la région ITS1 a révélé une bonne résolution des nœuds profonds et terminaux en intra-générique. En intra-subgénérique pour les espèces du sous-genre *Avaritia*, deux études respectivement à partir de la région ITS1 (Mathieu *et al.*, 2007) ou ITS2 (Gomulski *et al.*, 2005) ont montré toutefois une résolution limitée pour les espèces cryptiques telles que *C. obsoletus* et *C. montanus*. La région ITS2 s'est avérée par ailleurs limitée pour étudier les relations phylogénétiques des espèces au sein du sous-genre *Culicoides* (Gomulski *et al.*, 2006). En intersubgénérique, l'étude de Matsumoto (2009a) conclut à une résolution insuffisante pour décrire la phylogénie des *Culicoides*. Dans ce travail, les ITS1 associés aux ITS2 se sont avérés être de bons marqueurs pour décrire les nœuds profonds en intra-subgénérique au sein du sous-genre *Avaritia*. Toutefois, les nœuds terminaux n'ont pas toujours été résolus et notamment au sein du groupe *Obsoletus*.

L'ADN mitochondrial est de loin le plus largement utilisé pour des études moléculaires évolutives au niveau spécifique (Simon *et al.*, 2006) chez la plupart des arthropodes (Hebert *et al.*, 2004). Parmi les trois gènes codant pour des cytochromes c oxydase, le gène COI est le plus conservé de l'ADNmt (Beard *et al.*, 1993; Clary et Wolstenholme, 1985). Au niveau ADN mt, les relations phylogénétiques chez les *Culicoides* ont été les plus étudiées sur le COI seul au niveau spécifique et intra-subgénérique (Calvo *et al.*, 2009; Dallas *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2002; Pagès *et al.*, 2009), le COII seul en inter-générique (Beckenbach et Borkent, 2003) ou COI associé au COII au niveau spécifique et inter-générique (Matsumoto *et al.*, 2009b). Au démarrage de cette thèse, le polymorphisme de la région Cytb pour le genre *Culicoides* n'avait pas été évalué. Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'utilité de ces trois gènes COI, COII et Cytb dans la description du patron évolutif des *Culicoides*. Ces régions sont intéressantes pour décrire la phylogénie inter-spécifique avec une topologie des reconstructions robuste pour les nœuds terminaux mais moins efficace pour les nœuds profonds. La robustesse de ces trois gènes au niveau spécifique leur confèrent des possibilités intéressantes pour investiguer la diversité cryptique. Cette diversité cryptique est discutée dans le cas concret du complexe *Obsoletus*. Mais avant de l'aborder, il convient de discuter de la morphologie problématique de ce complexe et des idées émises par certains auteurs.

## Révision systématique proposée et hypothèses

L'absence de série de spécimens mâles et femelles pour chaque espèce ne nous a pas permis de traiter des caractères quantitatifs.

A l'issue de ce travail, douze espèces étudiées demeurent sans affiliation dans cette révision : *C. brevipalpis*, *C. dewulfi*, *C. dentiformis*, *C. fulvus*, *C. gulbenkiani*, *C. jacobsoni*, *C. kanagai*, *C. kibatiensis*, *C. obscurus*, *C. orientalis*, *C. tainanus* et *C. tororoensis*. Les quatre clades monophylétiques démontrés au cours de mon travail, permettent de proposer une révision systématique d'une partie du sous-genre *Avaritia*. La composition en espèces de ces groupes d'espèces monophylétiques est donnée et les espèces dont les hypothèses d'appartenance sont fortes, mais qui restent à démontrer, sont ajoutées (Tableau V). Chaque groupe est passé en revue et certaines hypothèses émises.

Tableau V : Liste des espèces qui composent les quatre groupes d'espèces monophylétiques identifiés dans cette étude. Nous émettons l'hypothèse que les espèces marquées d'une étoile \* appartiennent au groupe sur la base d'évidences morphologiques (voir texte).

<b>Groupe Obsoletus</b>	<b>Groupe Imicola</b>
<i>C. (A.) abchazicus</i> Dzhanfarov, 1964	<i>C. (A.) bolinos</i> Meiswinkel, 1989
<i>C. (A.) alachua</i> Jamnback & Wirth, 1963	<i>C. (A.) brevitarsis</i> Kieffer, 1917
<i>C. (A.) chiopterus</i> (Meigen), 1830	<i>C. (A.) imicola</i> Kieffer, 1913
* <i>C. (A.) filicinus</i> Gornostajeva & Gachegova, 1972	<i>C. (A.) kwagga</i> Meiswinkel, non publié
* <i>C. (A.) gornostaeva</i> Mirzaeva, 1984	<i>C. (A.) loxodontis</i> Meiswinkel, 1992
<i>C. (A.) sanguisuga</i> (Coquillett), 1901	<i>C. (A.) miombo</i> Meiswinkel, 1991
<b>Complexe Obsoletus</b>	<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i> Clastrier, 1958
<i>C. (A.) obsoletus</i> (Meigen), 1818	<i>C. (A.) tuttifrutti</i> Meiswinkel, Cornet & Dyce, 2003
<i>C. (A.) montanus</i> Shakirzjanova, 1962	
<i>C. (A.) scoticus</i> Downes & Kettle, 1952	<b>Groupe Grahmi</b>
<b>Groupe Boophagus</b>	<i>C. (A.) actoni</i> Smith, 1929
<i>C. (A.) boophagus</i> Macfie, 1937	<i>C. (A.) grahamii</i> Austen, 1909
<i>C. (A.) suzukii</i> Kitaoka, 1973 <i>sensu</i> Lien (1998)	* <i>C. (A.) minimus</i> Wirth & Hubert, 1989
<i>C. (A.) wadai</i> Kitaoka, 1980	* <i>C. (A.) impusilloides</i> Spinelli & Wirth, 1984
	* <i>C. (A.) pusilloides</i> Wirth & Blanton, 1955
	<i>C. (A.) pusillus</i> Lutz, 1913

Le groupe **Boophagus** est défini pour les femelles comme suit : aile avec la r2 entamé par une tache claire, 2<sup>ème</sup> cellule médiane (m2) avec une tache claire s'étendant jusqu'au bord distal de l'aile, une tache claire dans la partie distale de m1 qui s'étend jusque dans la partie distale de m2 formant ainsi une tache sombre carrée sur la partie distale de la nervure M2. Bien que non collectés et non observés, il semble que pour les mâles le corps de l'édéage soit

court, large, à apex arrondi et bilobé, particularité qui distinguerait ce groupe de l'ensemble des espèces du sous-genre *Avaritia*. Ce groupe *Boophagus* rassemble trois espèces et la revue de la littérature pour la faune orientale et australienne (Dyce *et al.*, 2007; Wirth et Hubert, 1989; Yu *et al.*, 2005), ainsi que celle des autres régions (Glick, 1990; Glukhova, 2005; Khamala et Kettle, 1971; Kremer, 1965; Wirth *et al.*, 1988), n'a pas permis d'inclure d'autres espèces. Il semblerait donc que ce clade soit exclusivement distribué en Asie ainsi qu'au Nord et à l'Ouest de l'Australie.

Toutefois, au cours de la revue de la littérature, nous avons pu noter trois descriptions différentes des mâles (Figure 16) et des femelles (Figure 17) de *C. suzukii*.

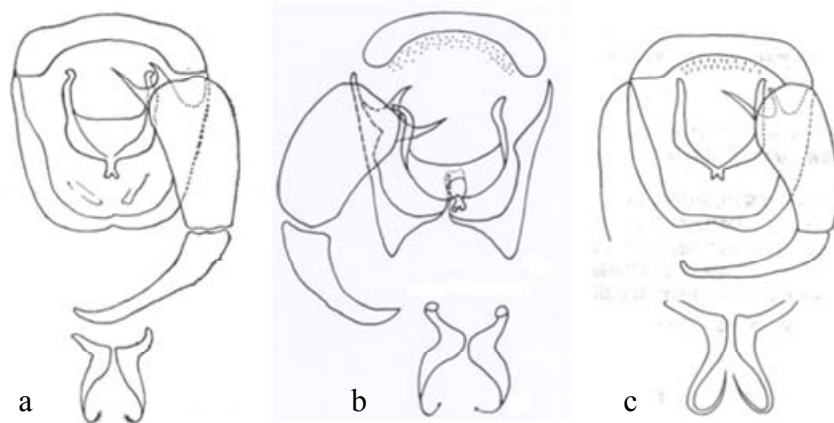


Figure 16 : Genitalia de *C. suzukii* selon : a, la description originale de Kitaoka (1973) ; b, décrit par Lien *et al.* (1998) et c, par Yu (2005).

Chez les mâles, trois formes d'édéages différentes sont reportés bien que toutes les trois aient une extrémité distale bilobée (cette caractéristique est également présente chez *C. boophagus* et *C. wadai*). La forme générale des tergites est semblable entre a et c mais pas avec b qui possède clairement des processus apico-latéraux et dont le tergite est légèrement fendu dans sa partie médiane. Cette dernière forme de tergite se retrouve chez *C. boophagus* avec toutefois des processus moins prononcés. La forme des paramères élargie à la base, a et b, se rétrécit brutalement jusqu'à une pointe très fine recourbée couverte d'une fine pubescence à l'extrémité distale. Les paramères de c sont de largeur modérée à la base et rétrécissent progressivement jusqu'à une extrémité distale fine et non pubescente et, qui se recourbe sur la moitié de la longueur des paramères. Bien que non mentionnée et non illustrée au cours de la description originale de *C. suzukii*, la présence de spicules sur la membrane basale est illustrée ultérieurement par le même auteur (Kitaoka, 1985) et ne constitue donc pas une différence entre les trois descriptions de cette espèce.

Les différences au niveau alaire sont plus marquantes chez les femelles (Figure 17).



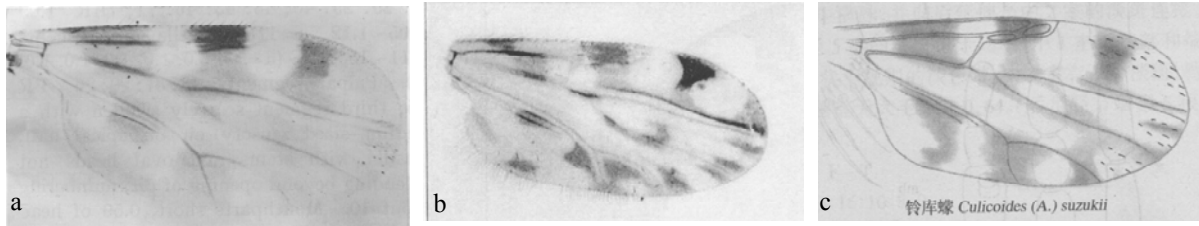


Figure 17 : Comparaison des ailes femelles de *Culicoides suzukii* selon divers auteurs : a, description originale de Kitaoka (1973) ; b, *sensu* Lien *et al.* (1998) ; c, *sensu* Yu *et al.* (2005).

L'aile, type c, décrite par Yu *et al.* (2005), est différente de la description originale de Kitaoka (1973), type a, par l'absence d'une bande sombre dans la cellule anale qui longe le bord de l'aile délimitant ainsi une continuité des zones claires de la partie distale et proximale de la cellule anale. La description de *C. suzukii* par Lien *et al.* (1998), montre une aile, type b, complètement différente des deux autres sur plusieurs points : la tache claire distale de r5 ne touche pas le bord de l'aile ; deux taches sombres longent le bord de l'aile dans la cellule anale ; la tache claire dans la partie distale de m1 s'étend au-delà de la nervure M2 jusque dans la partie distale de la cellule m2 délimitant ainsi une tache sombre carrée à l'extrémité distale de la nervure M2 ; et les nervures Cu1 et M3+4 sont chacune comprises dans une bande claire ne touchant pas le bord de l'aile.

Compte tenu de l'ensemble des éléments taxonomiques discutés ci-dessus pour les mâles et les femelles de *C. suzukii* (Kitaoka, 1973; Lien *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2005), notre hypothèse est que *C. suzukii sensu* Lien *et al.* (1998) et *sensu* Yu *et al.* (2005) ne correspondent pas à la description originale de Kitaoka (1973)<sup>28</sup>. Une révision des types de *C. suzukii* et de *C. wadai* permettrait d'éclaircir cette situation. Concernant l'espèce décrite comme étant *C. suzukii* par Lien *et al.* (1998), l'hypothèse de l'existence d'un complexe d'espèces cryptiques est forte. La diagnose des espèces traitées dans cette thèse appartenant au groupe Boophagus est donnée dans l'encadré n°3.

<sup>28</sup> C'est pourquoi le spécimen n°VNMC07 est nommé dans cette thèse « *C. suzukii* Kitaoka *sensu* Lien (1998) »

### Encadré n°3 : Diagnose des espèces du groupe Boophagus.

Sur la base des éléments discutés, une unique femelle collectée au Viet-Nam montre clairement une aile identique à *C. suzukii sensu Lien et al.* (1998). Toutefois, même si la phylogénie moléculaire réalisée la sépare clairement de notre spécimen, le rapprochement morphologique avec *C. boophagus* est net (Figure 18). Les trois espèces présentent la tache sombre quadratique à l'extrémité distale de la nervure M2 qui définit ce groupe comme indiqué précédemment. *Culicoides wadai* se séparent facilement des deux autres par l'absence de tache/bande claire sur la nervure Cu1. *Culicoides suzukii sensu Lien et al.* (1998) se distingue de *C. boophagus* par la présence d'une bande claire partant de la fourche des Cu1 et M3+4 et couvrant la quasi-totalité de la M3+4, la tache claire distale de r5 se détache du bord de l'aile par une zone sombre, la tache sombre couvrant les moitiés des cellules r1 et r2 n'atteint pas la partie proximale de r5 et, la tache sombre touchant la costale et traversant la cellule basale est extrêmement réduite.

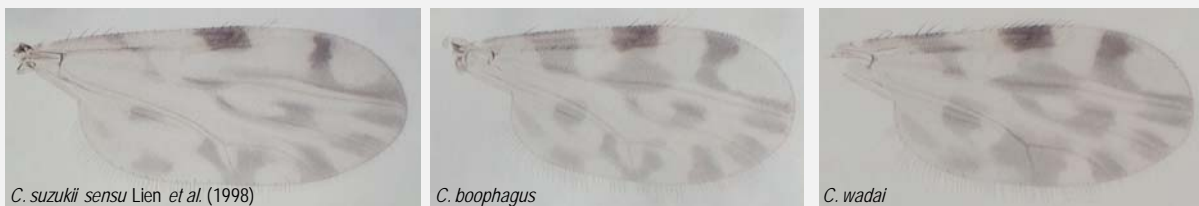


Figure 18 : Ailes des trois espèces du groupe Boophagus.

Le **groupe Grahami** rassemble six espèces qui présentent les particularités suivantes : présence d'yeux pubescents et d'une 2<sup>nd</sup>e cellule radiale entièrement sombre ou dont la nervure est légèrement entamée par une tache claire. En ce qui concerne la région Néotropicale, l'hypothèse que ce clade pourrait inclure *C. pusilloides* et *C. impusilloides* est forte puisque le rapprochement morphologique de ces espèces avec *C. pusillus* a déjà été soulevé par certains auteurs (Spinelli et Wirth, 1984; Wirth *et al.*, 1988). Du côté Asie, l'espèce *C. minimus* pourrait faire partie de ce clade puisque sa description est proche de *C. actoni*, ce rapprochement a déjà été rapporté par certains auteurs (Dyce *et al.*, 2007; Wirth et Hubert, 1989). En revanche, Wirth et Hubert (1989) signale *C. dasyops* comme une espèce africaine faisant partie du groupe Actoni. Il est vrai que *C. dasyops*, *C. alticola*, *C. kanagai*, sont des espèces qui présentent une forte pubescence des yeux et une deuxième cellule radiale non entamée par une tache claire. Toutefois, une autre hypothèse est préférée sur la base de plusieurs éléments.

Dans sa redescription de *C. kanagai*, Meiswinkel (1987) conclut que cette dernière est très proche de *C. dasyops*. En comparaison, les ailes des espèces du clade Grahami sont plus tachetées que ces deux dernières espèces qui ont des ailes très éclaircies (Figure 19). Dans cette figure, nous comparons les ailes de *C. actoni* (a) et de *C. kanagai* (b) (puisque la seule description de l'aile de *C. dasyops* n'est pas illustrée par Clastrier (1958)), ainsi que les génitalia de *C. actoni* (c) et de *C. dasyops* (d).

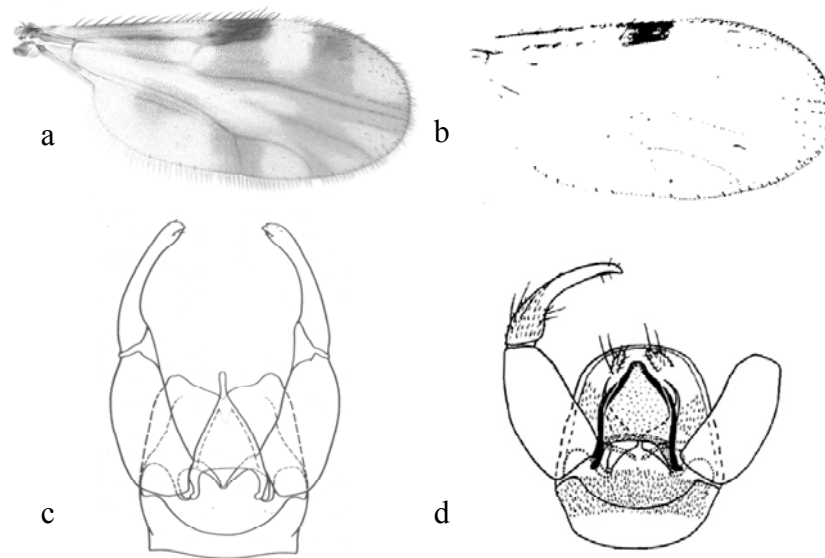


Figure 19 : Aile et génitalia de *Culicoides actoni* : a, aile d'après (Dyce *et al.*, 2007) et c, genitalia d'après Wirth et Hubert (1989). *Culicoides kanagai* : b, aile d'après Meiswinkel (1987). *Culicoides dasyops* : d, génitalia d'après Clastrier (1958).

La différence de patron alaire est très nette entre clade Grahami et les deux espèces en question. L'ensemble des espèces appartenant au clade Grahami présente un édéage de forme triangulaire alors que *C. dasyops* et de *C. kanagai* ont un édéage en forme de cloche. Dans la phylogénie moléculaire réalisée, *C. kanagai* n'est pas inclus dans le clade Grahami. Pour l'ensemble de ces raisons, nous pensons que l'hypothèse que les espèces *C. dasyops*, *C. kanagai* et *C. alticola*, fassent partie du clade Grahami est très faible. La diagnose des espèces traitées dans cette thèse appartenant au groupe Grahami est donnée dans l'encadré n°4.

#### Encadré n° 4 : Diagnose des espèces du groupe Grahami.

N'ayant pu observer les autres espèces pouvant se rapporter à ce groupe, nous nous limitons ici à la diagnose des espèces traitées dans cette étude. Les caractères discriminants qualitatifs chez les femelles des trois espèces sont synthétisés (Figure 20). L'absence de série importante de spécimens mâles et femelles n'a pas permis d'obtenir de mesures exhaustives.




 <p><i>C. actoni</i></p> <p>Aile à taches claires assez marquées, r2 non entamée mais apex de la costa légèrement éclaircie</p>	 <p><i>C. grahami</i></p> <p>Aile à taches claires floues, r2 non entamée mais apex de la costa légèrement éclaircie</p>						
 <p><i>C. pusillus</i></p> <p>Aile laiteuse à taches claires très estompées, cellules radiales fortement brunies, r2 non entamée</p>	<p>Distribution des sensilles coeloconiques :</p> <table> <tbody> <tr> <td><i>C. actoni</i></td> <td>III, XII-XV</td> </tr> <tr> <td><i>C. grahami</i></td> <td>III, XI-XV</td> </tr> <tr> <td><i>C. pusillus</i></td> <td>III, XIII-XV</td> </tr> </tbody> </table>	<i>C. actoni</i>	III, XII-XV	<i>C. grahami</i>	III, XI-XV	<i>C. pusillus</i>	III, XIII-XV
<i>C. actoni</i>	III, XII-XV						
<i>C. grahami</i>	III, XI-XV						
<i>C. pusillus</i>	III, XIII-XV						

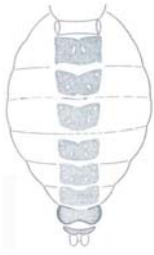











Figure 20 : Caractères qualitatifs discriminants des trois espèces traitées du groupe Grahami.

Toutefois, il semble que le ratio P/H peut permettre de discriminer *C. actoni* de *C. pusillus* et *C. grahami* avec des valeurs respectivement de 0,8 (Wirth et Hubert, 1989), 1,08 (Wirth *et al.*, 1988) et 0,95 (cette étude, n=6).

Au niveau du **groupe Imicola**, les reconstructions phylogénétiques montrent que l'espèce *C. kwagga* a la position la plus basale de ce clade. Malheureusement, la description de cette espèce n'est toujours pas publiée par Meiswinkel qui l'a identifiée et nommée, avec une séquence COI également disponible (Linton *et al.*, 2002). Ainsi il ne nous est pas possible de discuter la morphologie de cette espèce. Toutefois, la monophylie du groupe *Imicola sensu* Meiswinkel (2004) valide les caractères morphologiques utilisés par ce même auteur pour en définir les membres. Ces caractères donnés comme discriminants pour identifier les espèces

des groupes *Imicola* et *Orientalis* sont rassemblés dans le Tableau VI pour définir le groupe *Imicola* et pour servir d'éléments de discussion pour poser des hypothèses sur le groupe *Orientalis*.

Tableau VI : Caractères discriminants permettant d'identifier les espèces des groupes *Imicola* et *Orientalis* d'après Meiswinkel (2004).

	<b>Orientalis</b>	<b>Imicola</b>
<b>Femelles</b>	Pigmentation dorsale	
		
	Plaques sclérifiées entourant le gonopore	
		
<b>Mâles</b>	Paramères	
		
	Edéage	
		
	Gonocoxite	
		
	9 <sup>ème</sup> tergite	
		

Sur cette base morphologique, Meiswinkel (2004) a identifié 11 espèces comme appartenant au **groupe Orientalis**, seulement 5 d'entre elles ont été étudiées dans ce travail. Parmi les espèces afro-tropicales du groupe Orientalis non étudiées, deux se rapprochent d'un pseudo-clade Orientalis dans notre phylogénie moléculaire : *C. gulbenkiani* et *C. tororoensis*. Celles-ci sont des espèces de plus grande taille que la plupart des espèces du sous-genre *Avaritia* et présentent au niveau alaire une 2<sup>ème</sup> cellule radiale sombre (*C. tororoensis*) ou dont la nervure de r2 est très légèrement entamée par une tache claire (*C. gulbenkiani*). Mais la caractéristique très particulière qu'elles présentent est de posséder trois taches claires dans la cellule r5. En région orientale, une autre espèce, *C. hui* présente ce patron alaire particulier (Figure 21). Cette dernière est classée dans le groupe Orientalis par Meiswinkel (2004) sur la base de critères morphologiques (Tableau VI) mais les deux espèces afro-tropicales en question sont non étudiées/mentionnées.

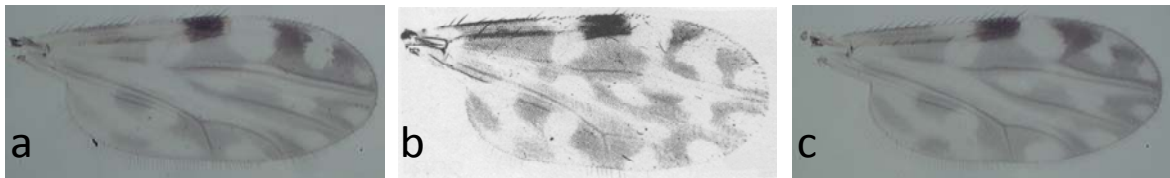


Figure 21 : Photographies des ailes de *C. gulbenkiani* (a), *C. hui* (b) et *C. tororoensis* (c). Sources : a et c origine B. Mathieu (2011) ; b extrait de Wirth et Hubert (1989).

Nos observations sur la pigmentation dorsale de *C. gulbenkiani* et *C. tororoensis* sont en faveur de leur affiliation au groupe Orientalis. Chez les mâles, la forme du 9<sup>ème</sup> tergite correspond également à la forme décrite pour Orientalis. Toutefois, l'observation des rares mâles en collection montre des paramères qui se terminent en pointe et ne présentent pas de fine pubescence à l'extrémité. La forme de l'édéage est également plutôt en faveur d'un groupement dans le groupe Imicola. D'après ces éléments, nous pensons que ces trois espèces formeraient un groupe Gulbenkiani dont la position phylogénétique par rapport aux espèces du groupe Orientalis reste à étudier. L'hypothèse d'un tel ensemble nommé « complexe » a déjà été soulevé et serait composé de *C. brevivalpis*, *C. gulbenkiani* et *C. tororoensis* (Meiswinkel *et al.*, 2004). *Culicoides brevivalpis* ne présente pas un patron alaire tel que présenté précédemment (Figure 21). La diagnose des espèces traitées dans cette thèse appartenant au groupe Imicola est donnée dans l'encadré n°5.

Encadré n°5 : Diagnose des espèces du groupe Imicola.

Les femelles des espèces du groupe Imicola se distinguent entre elles essentiellement par le patron alaire et la présence de sensilles trichoïdes hypertrophiées chez *C. pseudopallidipennis* et *C. tuttifrutti* (Figure 22).

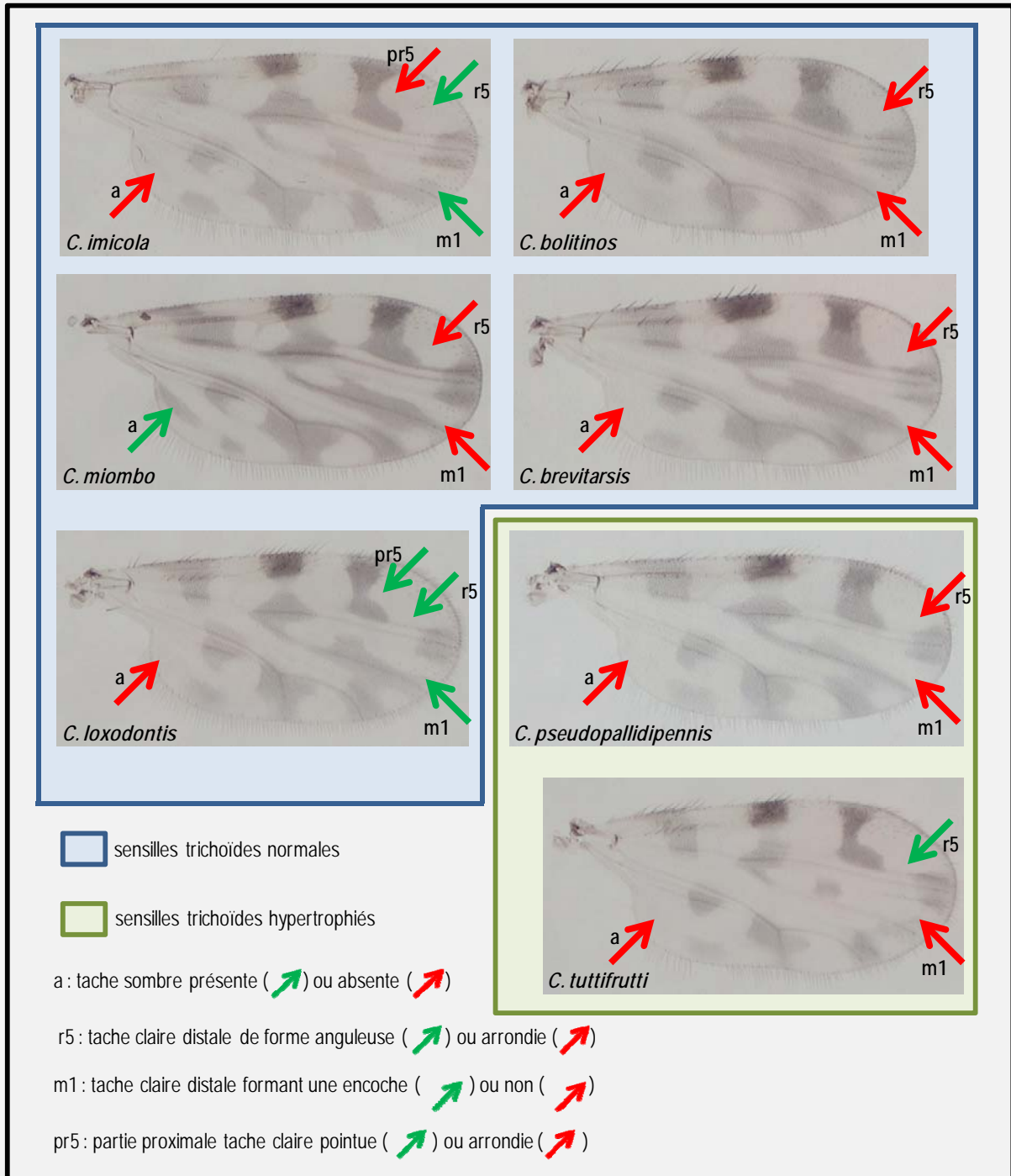


Figure 22 : Ailes des espèces du groupe Imicola étudiées. Les rectangles rassemblent les ailes des espèces ayant des sensilles trichoïdes normales (bleu) ou hypertrophiés (vert). Les flèches rouges pointent vers les zones d'observations.

Les mâles de *C. pseudopallidipennis* et de *C. tuttifrutti* sont qualifiés de « virtuellement inséparables » par Meiswinkel et Linton (2003). Le mâle de *C. loxodontis* présente un corps de l'édéage court avec une extrémité rugueuse par 5 à 8 minuscules papilles sombres (Meiswinkel, 1992), alors que les édéages des mâles des autres espèces du groupe sont plus long que le premier, arrondi et lisse (Delécolle et De La Roque, 2002; Meiswinkel, 1989, 1991). Le nombre de spicules sur la membrane basale du génitalia mâle peut avoir son importance pour séparer *C. bolitinos*, *C. imicola* et *C. miombo* avec respectivement 0-18 spicules (2,56 en moyenne), 8-145 (47 en moyenne) et 80-280 spicules (170 en moyenne) (Meiswinkel, 1989, 1991).

Le **groupe Obsoletus** constitue le clade le plus basal au sein du sous-genre *Avaritia*. Au sein de ce clade, il est frappant de constater que, à l'exception de *C.alachua* et de *C. chiopterus*, nombre d'espèces présentent des pinces génitales avec des parties exubérantes comparé à l'ensemble des espèces du sous-genre *Avaritia*. Deux espèces de Russie non présentes dans ce travail, *C. filicinus* et *C. gornostaeva*, présentent ce type de génitalia exubérant (Figure 23).

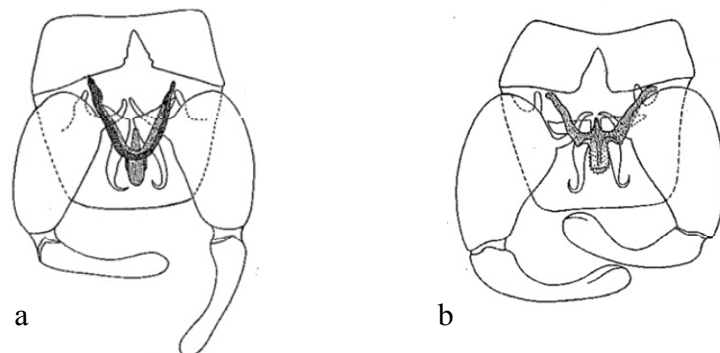


Figure 23 : Pinces génitales de *C. filicinus* (a) et de *C. gornostaeva* (b), d'après Glukhova (2005).

Au cours de ce travail, six espèces présentant ce type d'exubérance ont été étudiées : *C. abchazicus*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, *C. sanguisuga*, *C. sinanoensis* et *C. scoticus*. La phylogénie moléculaire robuste de ce clade permet d'émettre l'hypothèse forte que *C. filicinus* et *C. gornostaeva* pourraient faire partie de ce clade. Une autre espèce, *C. glushchenkoae* Glukhova, est décrite de Russie comme étant proche du groupe Obsoletus (Glukhova, 1989). En l'absence de la description du mâle décrit pour cette espèce, la position de *C. glushchenkoae* au sein du clade Obsoletus est trop hypothétique pour être incluse.



## Complexe *Obsoletus* et diversité cryptique

L'identification d'une espèce est principalement réalisée à l'aide de caractères anatomo-morphométriques. Toutefois lors d'évènements de spéciations récents, les « nouvelles » espèces présentent une morphologie extrêmement proche qui rend ces espèces cryptiques très difficiles à différencier d'un point de vue morphologique. Le cas des espèces cryptiques du complexe *Obsoletus* a suscité récemment beaucoup d'intérêt.

Le complexe *Obsoletus* est composé dans la région Ouest paléarctique de *C. abchazicus*, *C. montanus*, *C. obsoletus* et de *C. scoticus*. Avec seulement trois individus mâles trouvés très récemment en France (2009-2010)<sup>29</sup>, *C. abchazicus* n'a pour l'instant pas été étudié et la redescription de cette espèce est nécessaire. *Culicoides montanus* est une espèce collectée ponctuellement sur certains sites en faible abondance. Les espèces *C. obsoletus* et *C. scoticus* en sympatrie en Europe, sont des espèces abondantes dans les élevages (Baldet *et al.*, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008b). Ces deux espèces sont considérées comme des espèces jumelles en raison d'un chevauchement de valeur des tailles des spermathèques. Delécolle (1985) rapporte l'intérêt d'associer la taille des spermathèques et la forme des plaques chitineuses entourant l'orifice génital pour distinguer les deux espèces. Une étude associant des observations morphologiques au polymorphisme de la région barcode COI révèle que ces caractères diagnostics ne sont pas fiables (Pagès et Sarto I Monteys, 2005). En 2010, une étude qui analyse 15 variables morphométriques et le polymorphisme de la région COI, montre que la largeur des plaques chitineuses associée aux mensurations des spermathèques permet l'identification des deux espèces, bien que les auteurs mentionnent la présence de spécimens aux patrons variables (Augot *et al.*, 2010). Ces deux dernières études mettent en avant que la diagnose morphologique de ces 2 espèces *C. obsoletus* et *C. scoticus* au microscope reste délicate, confirmant leur statut d'espèces jumelles. Basé sur le même principe d'analyse des caractères morphologiques associé cette fois l'étude du polymorphisme de la région ITS1, Nielsen et Kristensen (2011) montrent que la diagnose de ces espèces est possible et précise à la loupe binoculaire. Toutefois, la représentation limitée de l'échantillonnage (20 spécimens par espèce), la capacité d'un observateur à estimer à la loupe un rapport entre longueurs et largeurs du 3<sup>ème</sup> article du palpe inférieures à 2,6 ou supérieures à 2,7 pour respectivement *C. obsoletus* et *C. scoticus* nous semble plus que délicate. L'étude statistique robuste basée

---

<sup>29</sup> Deux mâles ont été trouvés dans les Alpes par C. Ninio, doctorante à l'Université de Reims, et un mâle identifié en Alsace dans le cadre du réseau de surveillance entomologique des vecteurs de la FCO en France commandité par la Direction générale du ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire.

sur des mesures prises au microscope de Augot (2010) révélait par ailleurs que les longueurs et largeurs du palpe n'étaient pas des caractères discriminants pour ces espèces.

Face à ce constat contradictoire, l'identification moléculaire des femelles de *C. obsoletus* et de *C. scoticus* par l'une des PCR de diagnostic disponible (Gomulski *et al.*, 2005; Mathieu *et al.*, 2007; Nolan *et al.*, 2007; Pagès et Sarto I Monteys, 2005) demeure la technique d'identification la plus fiable de ces deux espèces jumelles. Des techniques récentes de PCR en temps réel (Monaco *et al.*, 2010; Wenk *et al.*, 2012), ou de puces à ADN (Deblauwe *et al.*, 2012), la spectrométrie de masse (Kaufmann *et al.*, 2011), se révèlent très fiables et semblent d'un avenir prometteur quant à l'identification moléculaire des *Culicoides*. La diagnose des espèces traitées dans cette thèse appartenant au groupe et complexe *Obsoletus* est donnée dans l'encadré n°6.

#### Encadré n°6 : Diagnose des espèces du groupe et complexe *Obsoletus*.

*Culicoides chiopterus* se distingue aisément des autres espèces du groupe par la présence d'une fine pubescence entre les ommatidies. Les mâles de *C. chiopterus* présente au niveau du génitalia, un 9<sup>ème</sup> sternite échancré mais non fendu et un édéage très similaire à celui de *C. imicola* (Figure 24). D'après la description de Blanton et Wirth, (1979), *C.alachua* semble avoir un génitalia plus proche de *C. chiopterus* que des autres espèces du groupe. La seule femelle en notre possession de *C.alachua* ne nous a pas permis de conclure avec précision sur des caractères discriminants.

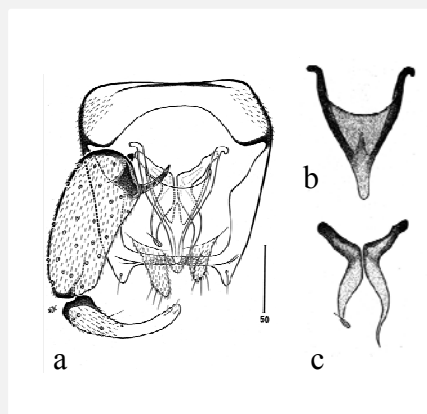


Figure 24 : Pince génitale (a), édéage (b) et paramères (c) de *C. chiopterus*.

Au sein du complexe *Obsoletus*, *C. montanus* se sépare des autres espèces par une fossette sensorielle très profonde et par la présence de sensilles trichoïdes hypertrophiées. Nos observations ont permis de nuancer ce caractère par la présence chez *C. sinanoensis* de

sensilles trichoïdes légèrement hypertrophiées et coudées à la base et chez *C. sanguisuga* ces mêmes sensilles sont légèrement hypertrophiées mais non coudées à la base (Figure 25).

Les récentes découvertes d'individus mâles de *C. abchazicus* et de *C. montanus* en France a permis de déterminer de manière précise les caractères discriminants au sein du complexe *Obsoletus* (Tableau VII). Aucune femelle de *C. abchazicus* n'a été collectée à ce jour en France et l'unique spécimen en collection ne nous a pas permis de conclure de manière précise quant à la discrimination des femelles de cette espèce.

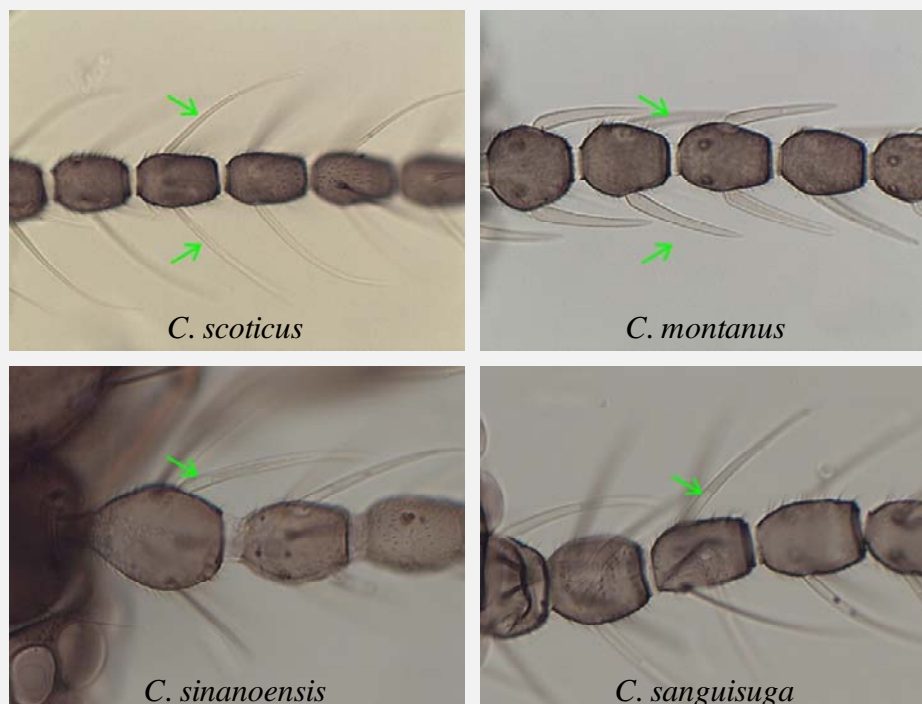
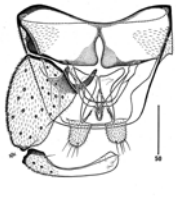
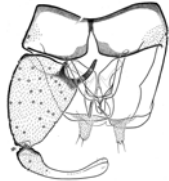
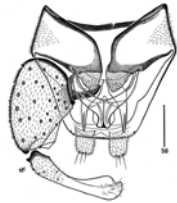
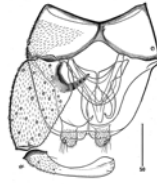

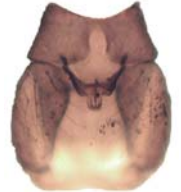








Figure 25 : Illustrations des sensilles trichoïdes « normales » chez *C. scoticus*, hypertrophiées et coudées à la base chez *C. montanus*, légèrement hypertrophiées et coudées, chez *C. sinanoensis*, et légèrement hypertrophiées et non coudées chez *C. sanguisuga*.

Tableau VII : Caractères discriminants au sein du complexe *Obsoletus*.

		<i>C. obsoletus</i>	<i>C. montanus</i>	<i>C. scoticus</i>	<i>C. abchazicus</i>	<i>C. sinanoensis</i>	<i>C. sanguisuga</i>
Mâles et Femelles	sensilles trichoïdes	Normales	Hypertrophiées	Normales	-	Légèrement hypertrophiées et coudées à la base	Légèrement hypertrophiées
	Fossettes sensorielles	Peu profondes	Très profondes	Peu profondes	-	Très peu profondes	Peu profondes
Mâles	Forme du 9 <sup>ème</sup> sternite	Fendu étroitement en son milieu, présence de lobes surélevés 	Fendu étroitement en son milieu, absence de lobes 	Franchement fendu en deux 	Largement échancré et non fendu 	Fendu en son milieu, présence de lobes surélevés + processus apico-latéraux sur le 9 <sup>ème</sup> tergite 	Fendu en son milieu, sans lobes proéminents 
	Edéage	Corps petit, arrondi à bords latéraux frangés, bras latéraux longs 	Corps petit, arrondi à bords latéraux lisses, bras latéraux longs 	Trapu, corps présentant latéralement des ailerons 	Base du corps masquée par une membrane des bras latéraux 	Corps trapu 	Corps trapu, d'aspect denté latéralement 

Malgré les différences morphologiques entre les mâles de *C. obsoletus* et de *C. scoticus*, l'hypothèse que cette dernière, ainsi que *C. montanus*, ne soient que des « races » de la première a été émise.

« [Thus] there is no molecular support for the existence of a separate species *C. montanus* » et  
« [Therefore] probably *C. scoticus* should be considered only as a race of *C. obsoletus* » (Kiehl *et al.*, 2009)

Dans cet article, Kiehl *et al.* (2009) basent leur hypothèse sur une étude phylogénétique des régions ITS1, ITS2 et une partie de la région 18S. Les auteurs n'explorent pas les variations inter et intra-spécifiques qui dans le cas d'un chevauchement permettraient de démontrer la présence d'une seule espèce. La région barcode COI est un marqueur souvent sélectionné pour investiguer la diversité intra et interspécifique au sein de complexe d'espèces cryptiques (Patsoula *et al.*, 2007; Saeung *et al.*, 2008; Scarpassa et Conn, 2006). Basées sur une trentaine de séquences COI disponibles pour chacune des deux espèces *C. obsoletus* et *C. scoticus* (Nolan *et al.*, 2007; Pagès *et al.*, 2009), les variations inter et intra-spécifiques de ces deux espèces ont été récemment investiguées (Garros *et al.*, 2010) (Figure 26).

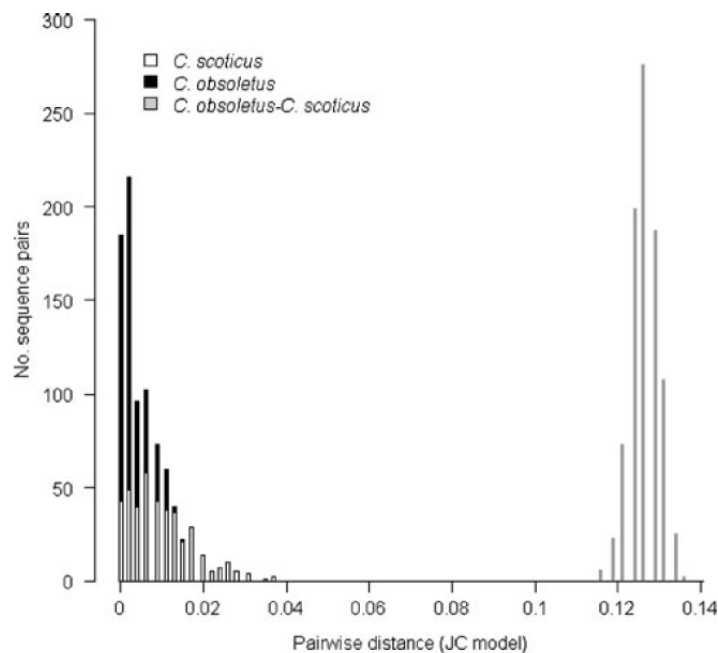


Figure 26 : Distances génétiques deux à deux des séquences COI pour *C. obsoletus* et *C. scoticus* (source : Garros *et al.* (2010))

La comparaison des distances génétiques entre *C. obsoletus* et *C. scoticus* (distances génétiques inter-spécifiques) montre une distance moyenne qui est supérieure aux distances génétiques intra-spécifiques (*C. obsoletus* ou *C. scoticus*). L'hypothèse qualifiant *C. scoticus*

de « races » de *C. obsoletus* émise par Kiehl *et al.* (2009) est clairement infirmée. Le faible nombre de spécimens de *C. montanus* disponibles n'a pas permis de statuer vis-à-vis de l'hypothèse de « races » de ces mêmes auteurs. Toutefois, la phylogénie moléculaire réalisée lors de ce travail à partir des séquences de 6 mâles de *C. montanus* révèle un nœud statistiquement très bien supporté (CPP=100%) entre cette espèce et *C. obsoletus*.

### Relations phylogénétiques entre les clades

La monophylie du sous-genre *Avaritia* a été démontrée au cours de ce travail et les relations phylogénétiques pour les trois clades monophylétiques *Obsoletus*, *Boophagus* et *Imicola* ont été résolues (Figure 27). Un quatrième clade, le groupe *Grahami*, est mis en évidence mais sa position dans l'arbre évolutif reste hypothétique.

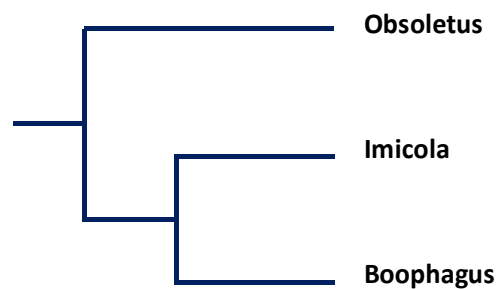


Figure 27 : Phylogramme de l'arbre évolutif des trois clades résolus.

La phylogénie moléculaire s'est révélée robuste au niveau des nœuds profonds et terminaux, mais elle n'a pas permis de résoudre pleinement les nœuds intermédiaires. En conséquence, la position du groupe *Grahami* reste non résolue et trois hypothèses peuvent être formulées (Figure 28).

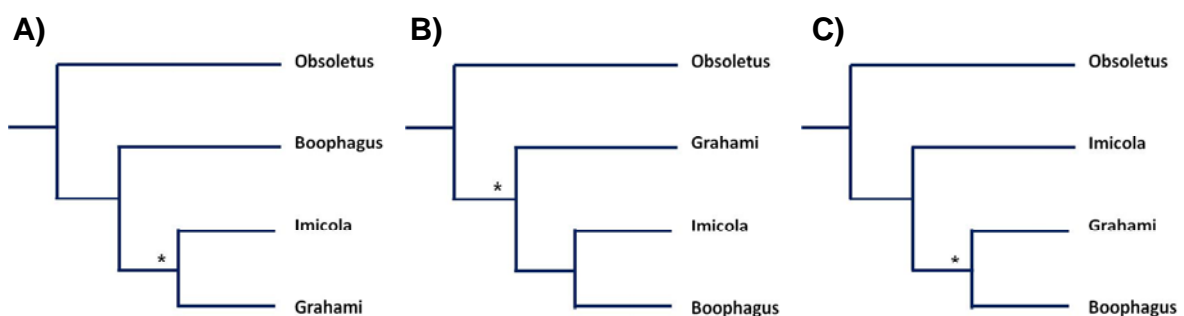


Figure 28 : Hypothèses phylogénétiques, A, B et C sur la position du groupe *Grahami*. Les nœuds hypothétiques sont marqués d'une \*.

Etant donné que le clade *Obsoletus* est basal au sein des espèces du sous-genre *Avaritia*, une quatrième hypothèse qui placerait le groupe *Grahami* comme ancestral est écartée. Plusieurs éléments peuvent être soulevés pour essayer de déterminer quelle est l'hypothèse la plus probable parmi les trois proposées. (1) La phylogénie moléculaire réalisée tend à montrer que les groupes *Orientalis* et *Grahami* sont liés ce qui a été morphologiquement suggérés (Wirth et Hubert, 1989). (2) L'évidence des similitudes entre les patrons alaires des groupes *Imicola* et *Boophagus* par rapport au groupe *Orientalis*, laisseraient penser que ces trois ensembles sont plus proches entre eux que des deux autres. (3) Les ailes des espèces présentent dans les groupes *Obsoletus* et *Grahami* ont des taches claires mal délimitées contrairement aux trois autres ensembles. (4) Une des espèces les plus basales du groupe *Obsoletus*, *C. chiopterus* possède une fine pubescence des yeux comme l'ensemble des espèces du groupe *Grahami*. Sur cette base, notre opinion est que l'hypothèse B, qui positionne les groupes *Grahami* et *Orientalis* comme basaux aux groupes *Imicola* et *Boophagus* est la plus vraisemblable (Figure 29).

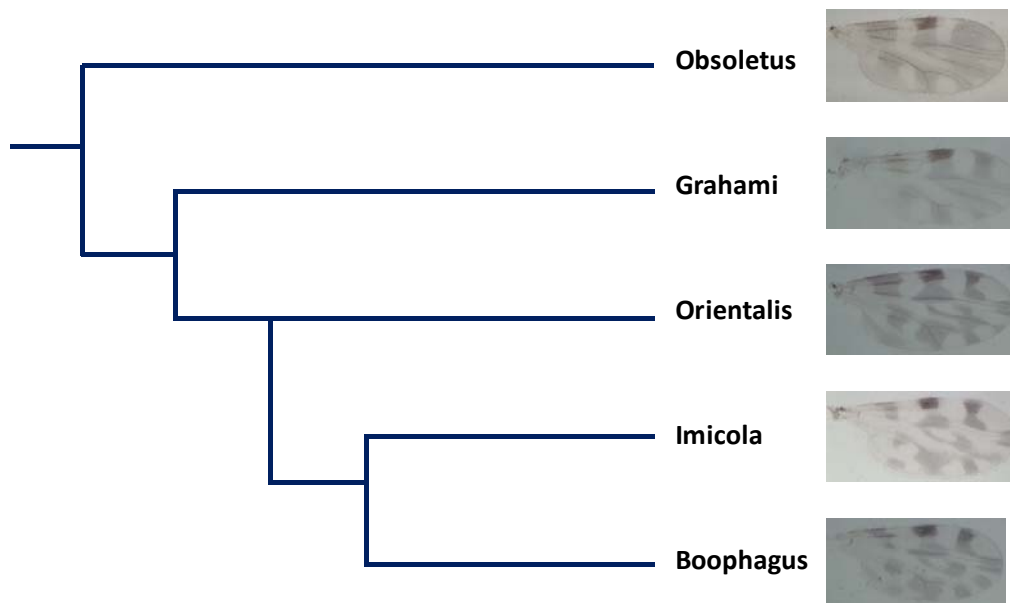


Figure 29 : Hypothèse évolutive sur la position du groupe *Orientalis* dans la phylogénie résolue.

Le manque de résolution dans la partie intermédiaire de notre phylogénie moléculaire pourrait être expliqué par la radiation rapide des espèces du sous-genre *Avaritia*. Pour améliorer la qualité de la phylogénie, vaut-il mieux augmenter le nombre de caractères ou le nombre de taxa ? Une étude sur des données simulées à montrer que pour améliorer une phylogénie non résolue, il vaut mieux ajouter des taxa que des caractères (Graybeal, 1998). L'amélioration de

l'échantillonnage des espèces du groupe *Orientalis* pourraient apporter des informations précieuses pour tester notre hypothèse.

## **La classification en sous-genre au-delà du sous-genre *Avaritia***

Kieffer (1921) décrit le premier sous-genre du genre *Culicoides* (sous-genre *Diplosella*) en y incluant l'espèce *C. sergenti*. Par la suite, les principales assignations d'espèces en sous-genres ont été réalisées entre les années 1940 et 1960. Parmi les tentatives de redéfinitions de sous-genres, Glukhova (1977) introduit une nouvelle approche en s'appuyant à la fois sur la morphologie des adultes des deux sexes mais aussi sur la morphologie larvaire. Elle confirme que quatre sous-genres, *Monoculicoides*, *Beltranmyia*, *Culicoides* et *Avaritia* sont des arrangements naturels qu'elle appelle « groupes ». Les trois autres sous-genres « naturels » non étudiés ici restent à investiguer et leurs monophylies à démontrer. Pour d'autres sous-genres en revanche, la monophylie devrait être infirmée. Le cas le plus évident est sans aucun doute le sous-genre *Oecacta*. Ce sous-genre qualifié de « fourre-tout » par Cornet et Brunhes (1994) dans lequel des espèces étaient assignées par défaut quand les auteurs ne savaient pas où les classer. Plusieurs auteurs pensent que ce sous-genre devrait être restreint aux seules espèces des groupes *Furens* et *Schultzei* (Boorman, 1989; Cornet et Brunhes, 1994). De manière plus générale, la plupart des auteurs signalent être insatisfaits de cette classification subgénérique (Boorman, 1988, 1989; Campbell et Pelham-Clinton, 1960; Glick, 1990; Glukhova, 2005; Khamala et Kettle, 1971; Kremer, 1965; Wirth et Hubert, 1989). La révision systématique générale du genre *Culicoides* dans son ensemble avec une vision mondiale de la diversité est donc une nécessité aux yeux des taxonomistes. La description de la biodiversité dans son ensemble repose toujours actuellement sur un système de classification du XVIIIème siècle. Cette nomenclature linnéenne est-elle toujours adaptée à l'heure où les taxonomistes tentent de mettre en ordre la classification en rassemblant les espèces dans des clades ayant une réalité évolutive plutôt qu'en ensemble morphologique qui pourrait être rendu incohérent dès la découverte de nouvelles espèces ? Des systématiciens, réunis autour de la *International Society for Phylogenetic Nomenclature* (Laurin et Bryant, 2009; Laurin et Cantino, 2004) réfléchissent à la création d'un *PhyloCode* qui encadrerait la nomenclature évolutionniste. Ce type de nomenclature ne fait pas l'unanimité et il est difficile de prévoir son impact et son acceptation dans la communauté scientifique. Dans tous les cas, la remise en cause du système aura le mérite d'en montrer les points forts et les faiblesses. Les débats autour de l'évolution de la



nomenclature restent à suivre de près car ils pourraient fournir des outils intéressants aux taxonomistes pour classer la biodiversité en constante évolution.



# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une révision systématique et taxonomique tente de définir un schéma de classification et d'identification des espèces le plus vrai possible. Pour être menée à bien, une telle révision, doit se baser sur une identification précise et correcte de spécimens représentant les espèces à considérer. L'ensemble des contributions apportées par ce travail quant à l'identification morphologique et moléculaire des espèces est synthétisé, puis dans cette dernière partie de conclusion sur la révision systématique et taxonomique, des perspectives issues de ce travail sont alors proposées.

Présents du début à la fin d'un processus de révision, les outils méthodologiques de type « clé d'identification » sont indispensables pour toutes les espèces du monde animal et végétal. Les *Culicoides* ne font pas exception à la règle et des clés dichotomiques sont disponibles malgré leurs difficultés d'utilisation dues à leurs rares mises à jour depuis leurs premières publications, les descriptions de nouveaux taxons et de l'établissement de nouveaux synonymes n'étant pas mentionnées. Pour contribuer à l'amélioration de ces premières clés, une **clé d'identification interactive des espèces de *Culicoides*** de la région Ouest paléarctique (IIKC<sup>30</sup>) a été développée sur une centaine de taxons et validée par six utilisateurs avec un protocole reposant sur des préparations microscopiques identifiées de façon anonyme. Cette clé multi-entrée est richement illustrée ce qui rend les connaissances taxonomiques qu'elle comporte accessibles aux débutants. Un site internet<sup>31</sup> dédié à cet outil permet de naviguer dans la base de données illustrée, d'identifier en ligne, et de télécharger gratuitement l'application pour une utilisation sur un ordinateur hors connexion. Les commentaires et suggestions des utilisateurs permettront des mises à jour du produit dont la diffusion sera aisée grâce à la mise en place du site internet dédié dont l'évolution dépend de l'acceptation qui en sera faite par les taxonomistes. Ce site internet pourrait devenir un lieu et lieu d'échanges d'informations taxonomiques. Les perspectives envisagées suite au développement de cette première clé interactive sont nombreuses. Développée en priorité pour les femelles du fait de leurs implications épidémiologiques dans la transmission d'agents pathogènes responsables de maladies, les mâles devraient être inclus prochainement dans la

---

<sup>30</sup> IIKC pour Interactive Identification Key for *Culicoides*.

<sup>31</sup> <http://www.iikculicoides.net/>

base de données. Les futurs développements du logiciel<sup>32</sup> utilisé pour créer l'IKC, notamment pour scinder ou fusionner des bases, permettront de développer et de fusionner les clés de différentes régions ou à l'inverse de découper une vaste base pour proposer un outil simplifié, adapté à une utilisation en routine sur une faune locale, par exemple dans le cadre de surveillances entomologiques par des acteurs de terrain confrontés à une situation épidémiologique donnée. Au-delà d'un outil d'identification morphologique puissant, la diffusion de la connaissance taxonomique par internet, la e-taxonomie, facilite l'enseignement et le maintien de l'expertise taxonomique dont le manque, *taxonomic impediment*, a été soulevé dans de nombreux modèles biologiques.

Toutefois, ce type de clé d'identification se heurte à une limite inhérente à la morphologie précisément face aux complexes d'espèces cryptiques. Ces espèces issues d'une spéciation récente sont, par définition, difficiles à discriminer par des critères anatomomorphométriques. Pour palier à ce problème d'identification, des méthodes de PCR à visée diagnostic permettant d'amplifier des fragments d'ADN spécifiques se sont développées reposant sur des séquençages partiels ou complets de certaines espèces. Toutefois, la grande majorité de ces PCR délivre un résultat de type binaire sur chaque individu par la présence ou l'absence de l'amplicon spécifique attendu. En biologie des organismes, la diversité tout autant que l'abondance des espèces sont des données clés à acquérir. Ce cas est particulièrement vrai en entomologie médicale et vétérinaire où la connaissance précise de la dynamique spatio-temporelle des espèces vectrices peut être lourde de conséquences pour la santé humaine ou animale. Lorsque des milliers de spécimens appartenant à un complexe d'espèces peuvent être collectés en un seul échantillon, l'utilisation de ces PCR sur chacun des individus piégés pour déterminer l'abondance relative de chaque espèce peut rapidement devenir très longue et très coûteuse. Notre travail propose une alternative pour l'estimation de l'abondance d'espèces cryptiques. Deux espèces vectrices de FCO au sein du complexe *Obsoletus*, *C. obsoletus* et *C. scoticus*, ont représenté un bon modèle d'étude pour établir la dynamique spatio-temporelle de chacune de ces espèces sympatriques. Nous avons développé une **PCR quantitative capable d'estimer simultanément avec précision l'abondance relative de ces deux espèces cryptiques pouvant être présentes ensemble dans des lots de spécimens mélangés**. Le modèle quadratique permettant de relier la quantité d'ADN détectée par qPCR aux nombres de spécimens de chacune des espèces a été construit à partir d'un millier de mâles de ces deux espèces. La validation des prédictions du modèle ainsi que la

---

<sup>32</sup> Xper<sup>2</sup> est un logiciel développé par le Laboratoire d'Informatique et de Systématique du MNHN qui permet l'édition et la gestion de bases de connaissances ainsi que la création de la clé interactive.

spécificité testée sur plus de 5 000 spécimens appartenant à une soixantaine d'espèces, révèlent la haute performance de la qPCR développée. L'avantage majeur de cet outil quantitatif est son développement et sa validation pour une analyse des spécimens en lots et non pas par analyses successives de chacun des individus à identifier. La quantification et donc l'estimation de l'abondance relative de ces deux espèces cryptiques est donc aisément applicable sur des échantillons contenant plusieurs milliers de spécimens. Adapté à une utilisation à l'échelle d'un réseau de surveillance entomologique, cet outil peut permettre d'évaluer la distribution et la dynamique saisonnière de ces deux espèces pour aborder l'épidémiologie de la maladie et avoir une meilleure compréhension de la transmission. Même en dehors d'un complexe d'espèces, l'identification larvaire est extrêmement difficile. Dans le cadre d'études sur les stades immatures, les outils moléculaires à visée diagnostic et notamment la qPCR développée ont pleinement leurs places. Au-delà d'un contexte vectoriel, ce travail représente une grande avancée pour l'étude de la biologie en général et de l'écologie d'espèces cryptiques.

La classification subgénérique des *Culicoides* ne satisfait pas les taxonomistes et depuis des décennies, les espèces sont rassemblées dans des groupes selon leurs ressemblances morphologiques ou leurs distributions géographiques. L'absence de base évolutive à ces tentatives de classification ont conduit à un imbroglio taxonomique où les désaccords ne trouvent pas d'issues. Le cadre évolutif des recherches exposé dans ce présent manuscrit **contribue à la classification systématique et taxonomique des *Culicoides* en révisant les espèces appartenant au sous-genre *Avaritia***. L'approche mondiale et la base multi-marqueurs de la phylogénie moléculaire réalisée ont permis, (1) de démontrer la monophylie du sous-genre *Avaritia*, (2) de mettre en évidence la présence de quatre clades monophylétiques d'espèces : *Obsoletus*, *Grahami*, *Boophagus* et *Imicola*, (3) de réviser la taxonomie et les caractères discriminants des espèces au sein de ces clades et, (4) de poser clairement une hypothèse évolutive quant à la position des espèces du groupe *Orientalis* dans ce schéma phylogénétique. Le clade *Obsoletus* est le phylum le plus ancestral au cours de la radiation des espèces de ce sous-genre. La radiation rapide à partir de ce dernier aurait conduit au phylum *Grahami* et *Orientalis*, puis dans un second temps aux clades *Boophagus* et *Imicola*. La rapidité de la radiation des espèces et/ou le manque d'espèces représentatives du groupe *Orientalis* pourraient expliquer le manque de robustesse sur les événements évolutifs intermédiaires. Pour en améliorer la lecture, une recherche de marqueurs moléculaires dont la

vitesse d'évolution serait corrélée à la vitesse de ces événements évolutifs intermédiaires pourrait permettre d'améliorer la qualité de la phylogénie moléculaire réalisée. L'ajout de nouveaux taxons notamment au sein du groupe *Orientalis* sous-représenté dans notre échantillonnage permettrait de tester l'hypothèse évolutive proposée. L'analyse des espèces des groupes *Andicolla* et *Trifasciellus* serait importante pour avoir une meilleure lecture globale de la diversité intra-subgénérique. Une approche morphologique et écologique sur les stades adultes et immatures serait importante à développer. Les méthodes d'analyses phylogénétiques et les puissances de calculs informatiques permettent le traitement de jeu de données de taille importante dont : (i) la composition peut être des séquences, des caractères morphologiques mais aussi des éléments de biologie ou d'écologie pouvant être codés, et dont (ii) chaque catégorie de « caractères » peut évoluer selon son propre modèle d'évolution avec ses propres paramètres. C'est probablement ce type d'approche intégrative de la systématique et de la taxonomie qui apporterait une meilleure compréhension de l'organisation des espèces entre elles et de leurs traits d'histoire de vie. Le développement de méthodes de lutte et/ou de prophylaxie serait alors plus adapté au modèle biologique.

Cette thèse constitue une contribution à la révision systématique et taxonomique du genre *Culicoides* dans son ensemble, révision qui demeure nécessaire et incontournable pour la compréhension de la biologie des espèces et notamment des vecteurs de pathogènes.



# Références

- Agosti D. (2006), Biodiversity data are out of local taxonomists' reach. *Nature*, **439**, 7075: 392.
- al-Busaidy S. M., Mellor P. S. (1991), Isolation and identification of arboviruses from the Sultanate of Oman. *Epidemiol Infect*, **106**, 2: 403-13.
- Augot D., Sauvage F., Jouet D., Simphal E., Veuille M., Couloux A., Kaltenbach M. L., Depaquit J. (2010), Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect Genet Evol*, **10**, 5: 629-37.
- Azevedo R. S., Nunes M. R., Chiang J. O., Bensabath G., Vasconcelos H. B., Pinto A. Y., Martins L. C., Monteiro H. A., Rodrigues S. G., Vasconcelos P. F. (2007), Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis*, **13**, 6: 912-5.
- Bailly-Choumara H., Kremer M. (1970), Deuxième contribution à l'étude des *Culicoides* du Maroc (Diptera, Ceratopogonidae). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, **VIII**, 4: 383-91.
- Baldet T., Delécolle J. C., Cetre-Sossah C., Mathieu B., Meiswinkel R., Gerbier G. (2008), Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. *Prev Vet Med*, **87**, 1-2: 84-97.
- Baldet T., Mathieu B., Delécolle J. C., Gerbier G., Roger F. (2005), Emergence de la fièvre catarrhale ovine dans le Bassin méditerranéen et surveillance entomologique en France. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **58**, 3: 125-32.
- Barber T. L. (1979), Temporal appearance, geographic distribution, and species of origin of bluetongue virus serotypes in the United States. *Am J Vet Res*, **40**, 11: 1654-6.
- Barr N. B., McPheron B. A. (2006), Molecular phylogenetics of the genus *Ceratitidis* (Diptera: Tephritidae). *Mol Phylogenet Evol*, **38**, 1: 216-30.
- Barr N. B., Wiegmann B. M. (2009), Phylogenetic relationships of *Ceratitidis* fruit flies inferred from nuclear CAD and tango/ARNT gene fragments: Testing monophyly of the subgenera *Ceratitidis* (*Ceratitidis*) and *C. (Pterandrus)*. *Mol Phylogenet Evol*, **53**, 2: 412-24.
- Beard C. B., Hamm D. M., Collins F. H. (1993), The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol Biol*, **2**, 2: 103-24.
- Beckenbach A. T., Borkent A. (2003), Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Mol Phylogenet Evol*, **27**, 1: 21-35.
- Beenken L., Berndt R. (2010), Rust fungi on Annonaceae: the genus *Sphaerophragmium*. *Mycologia*, **102**, 3: 650-63.
- Besansky N. J., Fahey G. T. (1997), Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol*, **14**, 4: 442-54.



Besansky N. J., Severson D. W., Ferdig M. T. (2003), DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends Parasitol*, **19**, 12: 545-6.

Blackwell A., Evans K. A., Strang R. H., Cole M. (2004), Toward development of neem-based repellents against the Scottish Highland biting midge *Culicoides impunctatus*. *Med Vet Entomol*, **18**, 4: 449-52.

Blanton F. S., Wirth W. W. (1979). The sandflies (*Culicoides*) of Florida (Diptera: Ceratopogonidae). *In: Arthropods of Florida and Neighbouring Land Areas*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Gainesville, vol. 10, pp. 1-204.

Boorman J. (1988). Taxonomic problems in *Culicoides* of southwest Asia, in particular of the Arabian peninsula. *In: Biosystematics of Haematophagous Insects*. Service M. W. ed., Systematics Association, Special Volume No. 37, Clarendon Press, Oxford, pp. 271-82.

Boorman J. (1989), *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna of Saudi Arabia*, **10**: 160-224.

Boorman J. (1991). A review of *Culicoides* subgenus *Avaritia* species (Insecta, Diptera: Ceratopogonidae), vectors of viruses of sheep, cattle and horses, with particular reference to *Culicoides imicola* in Europe and the Mediterranean region. pp. 1-54. Report prepared for the Overseas Development Administration. The Natural History Museum, London.

Borkent A. (2005). Chapter 10. The biting midges - The Ceratopogonidae (Diptera). *In: Biology and disease vectors*. Marquardt W. C. ed., Elsevier Academic Press, pp. 113-26.

Borkent A. (2009), World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Belmont University, The Ceratopogonid web page*: 236 p.

Borkent A. (2011), World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Belmont University, The Ceratopogonid web page*: 236 p., <http://campus.belmont.edu/cienews/cie.html>

Borkent A., Wirth W. W. (1997), World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull Am Natl Hist Mus*, **23**: 1-257.

Braverman Y., Boorman J., Kremer M., Delecolle J. C. (1976), Faunistic list of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from Israël. *Cah. O.R.S.T.O.M., série Ent méd et Parasitol*, **14**, 3: 179-85.

Brunhes J., Cuisance D., Geoffroy B., Hervy J. (2009). Les glossines ou mouches tsé-tsé (réédition). In IRD Editions, Montpellier, France (CD-Rom).

Calistri P., Goffredo M., Caporale V., Meiswinkel R. (2003), The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J Vet Med*, **50**: 132-38.

Calvo J. H., Calvete C., Martinez-Royo A., Estrada R., Miranda M. A., Borrás D., Sarto I Monteys V., Pages N., Delgado J. A., Collantes F., Lucientes J. (2009), Variations in the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene indicate northward expanding populations of *Culicoides imicola* in Spain. *Bull Entomol Res*, **99**, 6: 583-91.

Campbell J. A., Pelham-Clinton E. C. (1960), A taxonomic review of the british species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proc. R. Soc. Edinburgh*, **68**: 181-302.

Caracappa S., Torina A., Guercio A., Vitale F., Calabro A., Purpari G., Ferrantelli V., Vitale M., Mellor P. S. (2003), Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet Rec*, **153**, 3: 71-4.

Carpenter S., Lunt H. L., Arav D., Venter G. J., Mellor P. S. (2006), Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol*, **43**, 1: 73-8.

Carpenter S., McArthur C., Selby R., Ward R., Nolan D. V., Luntz A. J., Dallas J. F., Tripet F., Mellor P. S. (2008), Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec*, **163**, 20: 589-92.

Carpenter S., Mellor P. S., Torr S. J. (2008), Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaeartic. *Med Vet Entomol*, **22**, 3: 175-87.

Cêtre-Sossah C. (2010), Strengthening cooperation on vectorborne diseases in Europe. *Vet Rec*, **166**, 13: 386-7.

Cêtre-Sossah C., Baldet T., Delécolle J. C., Mathieu B., Perrin A., Grillet C., Albina E. (2004), Molecular detection of *Culicoides spp.* and *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Africa and Europe, by ITS1rDNA PCR amplification. *Vet Res*, **35**: 325-37.

Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Setier-Rio M. L., Grillet C., Baldet T., Delécolle J. C., Albina E. (2008), Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res Vet Sci*, **85**, 2: 372-82.

Clary D. O., Wolstenholme D. R. (1985), The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J Mol Evol*, **22**, 3: 252-71.

Clastrier J. (1958), Notes sur les Ceratopogonidés. IV. Ceratopogonidés d'Afrique Occidentale Française. *Arch. Institut Pasteur d'Algérie*, **36**: 192-258.

Clavijo A., Heckert R. A., Dulac G. C., Afshar A. (2000), Isolation and identification of bluetongue virus. *J Virol Methods*, **87**, 1-2: 13-23.

Conte A., Giovannini A., Savini L., Goffredo M., Calistri P., Meiswinkel R. (2003), The effect of climate on the presence of *Culicoides imicola* in Italy. *J Vet Med*, 50: 139-47.

Cornet M., Brunhes J. (1994), Revision des especes de *Culicoides* apparentees à *C. schultzei* (Enderlein, 1908) dans la region afrotropicale (Diptera, Ceratopogonidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, **99**, 2: 149-64.

Cox H. R. (1954), Bluetongue. *Bacteriol Rev*, **18**, 4: 239-53.

Cuisance D., Rioux J. A. (2004), Current status of medical and veterinary entomology in France: endangered discipline or promising science? *Comp Immunol Microb*, **27**: 377-92.

Dallas J. F., Cruickshank R. H., Linton Y. M., Nolan D. V., Patakakis M., Braverman Y., Capela R., Capela M., Pena I., Meiswinkel R., Ortega M. D., Baylis M., Mellor P. S., Mordue Luntz A. J. (2003), Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Med Vet Entomol*, **17**, 4: 379-87.

Daniels P. W., Sendow I., Soleha E., Sukarsih, Hunt N. T., Bahri S. (1995), Australian-Indonesian collaboration in veterinary arbovirology--a review. *Vet Microbiol*, **46**, 1-3: 151-74.

Dayrat B. (2005), Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 3: 407-415.

De Clercq K., Mertens P., De Leeuw I., Oura C., Houdart P., Potgieter A. C., Maan S., Hooyberghs J., Batten C., Vandemeulebroucke E., Wright I. M., Maan N., Riocreux F., Sanders A., Vanderstede Y.,

- Nomikou K., Raemaekers M., Bin-Tarif A., Shaw A., Henstock M., Breard E., Dubois E., Gastaldi-Thiery C., Zientara S., Verheyden B., Vandebussche F. (2009), Emergence of bluetongue serotypes in Europe, part 2: the occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. *Transbound Emerg Dis*, **56**, 9-10: 355-61.
- De Liberato C., Purse B. V., Goffredo M., Scholl F., Scaramozzino P. (2003), Geographical and seasonal distribution of bluetongue virus vector, *Culicoides imicola*, in central Italy. *Med Vet Entomol*, **17**: 388-94.
- De Meyer M. (2000), Systematic revision of the subgenus *Ceratitits* Mac-Leay s.s. (Diptera: Tephritidae). *Zool J Linn Soc*, **128**: 439-67.
- Deblauwe I., De Witte J. C., De Deken G., De Deken R., Madder M., Van Erk S., Hoza F. A., Lathouwers D., Geysen D. (2012), A new tool for the molecular identification of *Culicoides* species of the *Obsoletus* group: the glass slide microarray approach. *Med Vet Entomol*, **26**, 1: 89-91.
- Delécolle J. C. (1985). Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Thèse d'état n°56, Université Louis Pasteur de Strasbourg I, Strasbourg, 229 p.
- Delécolle J. C., De La Roque S. (2002), Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine : *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera, Ceratopogonidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, **107**, 4: 371-9.
- Dijkstra E., Van der Ven I. J., Meiswinkel R., Holzel D. R., Van Rijn P. A. (2008), *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet Rec*, **162**, 13: 422.
- Du Toit R. M. (1944), The transmission of Blue-Tongue and Horse-Sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, **19**, 1-2: 7-16.
- Dulac G. C., Duboc C., Meyers D. J., Taylor E. A., Ward D., Sterritt W. G. (1989), Incursion of bluetongue virus type 11 and epizootic hemorrhagic disease of deer type 2 for two consecutive years in the Okanagan Valley. *Canadian Veterinary Medical Association*, **30**: 351-4.
- Dulac G. C., Sterritt W. G., Dubuc C., Afshar A., Myers E. A. (1992). Incursions of orbiviruses in Canada and their serologic monitoring in the native animal population between 1962 and 1991. In: Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses. *Walton T. E., Osburn B. I. eds.*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 120-27.
- Dyce A. L., Bellis G. A., Muller M. J. (2007). Pictorial atlas of Australasian *Culicoides* wings (Diptera: Ceratopogonidae). ABRS, Canberra, 88 p.
- Forrattini O. P. (1957), *Culicoides* da região neotropical (Diptera: Ceratopogonidae). *Arq Fac Hig Saude Pub Univ São Paulo*, **11**: 159-526.
- Fox I. (1955), A catalogue of the bloodsucking midges of the Americas (*Culicoides*, *leptoconops* and *lasiohelea*) with keys to the subgenera and nearctic species. *Puerto Rico Univ J Agr*, **39**: 214-85.
- Garros C., Harbach R. E., Manguin S. (2005), Morphological assessment and molecular phylogenetics of the *Funestus* and *Minimus* groups of *Anopheles* (Cellia). *J Med Entomol*, **42**, 4: 522-36.
- Garros C., Koekemoer L. L., Coetzee M., Coosemans M., Manguin S. (2004), A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. *Am J Trop Med Hyg*, **70**, 6: 583-90.

- Garros C., Mathieu B., Balenghien T., Cetre-Sossah C., Delécolle J. C. (2010), Suggesting synonymies? Comments on Kiehl et al. (2009) "the European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?" *Parasitol Res*, **107**, 3: 731-34.
- Gerbier G., Baldet T., Tran A., Hendrickx G., Guis H., Mintiens K., Elbers A. R., Staubach C. (2008), Modelling local dispersal of bluetongue virus serotype 8 using random walk. *Prev Vet Med*, **87**, 1-2: 119-30.
- Gibbs E. P., Greiner E. C. (1994), The epidemiology of bluetongue. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **17**, 3-4: 207-20.
- Gibbs E. P. J., Greiner E. C. (1988). Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. *In: The arboviruses: epidemiology and ecology. Monath T. P. ed.*, CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. 2, pp. 30-70.
- Glick J. I. (1990), *Culicoides* Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol*, **27**, 2: 85-195.
- Glukhova V. (1977), The subgeneric classification of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera, Ceratopogonidae), including morphological characters of the larva. *Parazitologicheskii Sbornik*, **27**: 112-8.
- Glukhova V. M. (1989), Blood-sucking midges of the genera *Culicoides* and *Forcipomyia* (Ceratopogonidae). *Fauna SSR*, **3**, 5: 408 p.
- Glukhova V. M. (2005), *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) of Russia and adjacent lands. *Dipterological Research*, **16**, 1: 75 p.
- Godfray H. C. (2002), Challenges for taxonomy. *Nature*, **417**, 6884: 17-9.
- Golvan Y. (1983). *Eléments de parasitologie médicale*. Paris, 571 p.
- Gomulski L. M., Meiswinkel R., Delécolle J. C., Goffredo M., Gasperi G. (2005), Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst Entomol*, **30**, 4: 619-31.
- Gomulski L. M., Meiswinkel R., Delécolle J. C., Goffredo M., Gasperi G. (2006), Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol*, **20**, 2: 229-38.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010), SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*, **27**, 2: 221-4.
- Graybeal A. (1998), Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Syst Biol*, **47**, 1: 9-17.
- Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010), New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, **59**, 3: 307-21.
- Hagedorn G., Rambold G., Martellos S. (2010). Types of identification keys. *In: Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems. Nimis P. L., Vignes-Lebbe R. eds.*, EUT, pp. 59-64.
- Hajibabaei M., Singer G. A., Hebert P. D., Hickey D. A. (2007), DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet*, **23**, 4: 167-72.

Hamarshah O., Presber W., Al-Jawabreh A., Abdeen Z., Amro A., Schonian G. (2009), Molecular markers for *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) and their usefulness for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **103**, 11: 1085-6.

Hamilton C. A., Formanowicz D. R., Bond J. E. (2011), Species Delimitation and Phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): Cryptic Diversity in North American Tarantulas. *PLoS One*, **6**, 10: e26207.

Hebert P. D., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. (2004), Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 41: 14812-7.

Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. (2003), Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**, 1512: 313-21.

Hentschel J., von Konrat M. J., Pocs T., Schafer-Verwimp A., Jonathan Shaw A., Schneider H., Heinrichs J. (2009), Molecular insights into the phylogeny and subgeneric classification of *Frullania Raddi* (Frullaniaceae, Porellales). *Mol Phylogenet Evol*, **52**, 1: 142-56.

Hervy J. P., Le Goff G., Geoffroy B., Hervé J. P., Manga L., Brunhes J. (1998). Les anophèles de la région afrotropicale. In IRD Editions and EID Méditerranée, Montpellier, France (CD-Rom).

Hillis D. M. (1987), Molecular Versus Morphological Approaches to Systematics. *Annu Rev Ecol Syst*, **18**, 1: 23-42.

Hirsch J., Sprick P., Reineke A. (2011), Molecular identification of larval stages of Otorhynchus (Coleoptera: Curculionidae) species based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Econ Entomol*, **103**, 3: 898-907.

Hoffmann B., Bauer B., Bauer C., Batza H. J., Beer M., Clausen P. H., Geier M., Gethmann J. M., Kiel E., Liebisch G., Liebisch A., Mehlhorn H., Schaub G. A., Werner D., Conraths F. J. (2009), Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis*, **15**, 9: 1481-4.

Hofmann M. A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G., Thuer B. (2008), Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis*, **14**, 12: 1855-61.

Hunter S. J., Goodall T. I., Walsh K. A., Owen R., Day J. C. (2008), Nondestructive DNA extraction from blackflies (Diptera: Simuliidae): retaining voucher specimens for DNA barcoding projects. *Mol Ecol Resour*, **8**, 1: 56-61.

Hutcheon D. (1881), Fever or epizzotic catarrh. *Report of the Colonial Veterinary Surgeon for 1880*: 12-5.

Hutcheon D. (1902), Malarial catarrhal fever of sheep. *The Veterinary Record*, **XIV**, 718: 629-33.

Ibáñez C., García-Mudarra J. L., Ruedi M., Stadelmann B., Juste J. (2006), The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta Chiropterol*, **8**: 277-97.

Jennings M., Boorman J., Ergün H. (1983), *Culicoides* from Western Turkey in relation to bluetongue disease of sheep and cattle. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **36**, 1: 67-70.

Jennings M., Mellor P. S. (1989), *Culicoides*: biological vectors of Akabane virus. *Vet Microbiol*, **21**, 2: 125-31.

- Katoh K., Asimenos G., Toh H. (2009), Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol*, **537**: 39-64.
- Kaufmann C., Ziegler D., Schaffner F., Carpenter S., Pfluger V., Mathis A. (2011), Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Med Vet Entomol*, **25**, 1: 32-8.
- Keith P., Allardi J. (2001). Atlas des poissons d'eau douce de France. *Patrimoines Naturels*. SPN / IEGB / MNHN, Paris, 387 p.
- Kettle D. S. (1952), Midge (*Culicoides*) control in Scotland. *Trans. Ninth Int. Congr. Ent.*, **1**: 935-8.
- Kettle D. S., Parish R. H. (1957), Field trials of larvicides against *Culicoides* with a discussion on the relationship between rainfall and larval control. *B Entomol Res*, **48**, 2: 425-34.
- Khamala C. M., Kettle D. S. (1971), The *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) of East Africa. *Trans. R. ent. Soc. Lond.*, **123**, 1: 1-95.
- Kieffer J. J. (1921), Sur quelques Diptères piqueurs de la Tribu des Ceratopogoninae. *Archives des Instituts Pasteur d'Afrique du Nord*, **1**: 107-15.
- Kiehl E., Walldorf V., Klimpel S., Al-Quraishy S., Mehlhorn H. (2009), The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA? *Parasitol Res*, **105**: 331-6.
- Kitaoka S. (1973), Descriptions of four new species and the hitherto unknown males of four species of the *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) from Amami-Oshima, Japan. *National Institute of Animal Health Quarterly*, **13**: 211-9.
- Kitaoka S. (1985), Japanese *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and keys for species (I). *Bull. Natl. Inst. Anim. Health*, **87**: 73-89.
- Knowlton N. (1993), Sibling species in the sea. *A Rev Ecol Syst*, **24**: 189-216.
- Kremer M. (1965). Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. *Encyclop. Ent. Serie A*, Paris, 299 p.
- Lang N. J., Mayden R. L. (2007), Systematics of the subgenus *Oligocephalus* (Teleostei: Percidae: Etheostoma) with complete subgeneric sampling of the genus *Etheostoma*. *Mol Phylogenet Evol*, **43**, 2: 605-15.
- Laurin M., Bryant H. N. (2009), Third meeting of the International Society for Phylogenetic Nomenclature: a report. *Zoologica Scripta*, **38**, 3: 333-7.
- Laurin M., Cantino P. D. (2004), First International Phylogenetic Nomenclature Meeting: a report. *Zool Scr*, **33**, 5: 475-9.
- Lefèvre P. C. (2003). Chapitre 55 : Fièvre catarrhale du mouton. *In*: Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et région chaude. Paris, vol. 1, pp. 667-86.
- Lien J. C., Weng M. H., Lin C. C. (1998), A revision of the genus *Culicoides* in Taiwan Part. II. subgenus *Avaritia* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Taiwan Mus*, **51**, 1: 21-48.
- Linley J. R. (1985), Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *J Med Entomol*, **22**, 6: 589-99.

Linton Y. M., Mordue Luntz A. J., Cruickshank R. H., Meiswinkel R., Mellor P. S., Dallas J. F. (2002), Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Med Vet Entomol*, **16**, 2: 139-46.

Litvaitis M. K., Nunn G., Thomas W. K., Kocher T. D. (1994), A molecular approach for the identification of meiofaunal turbellarians (Platyhelminthes, Turbellaria). *Mar Biol*, **120**: 437-42.

Löcker H., Mitchell A. (2009), Non-destructive sampling for combined molecular and morphological systematics –you can have your cake and eat it too! *Poster of the NSW Department of primary industries, Australia*.

Lohman D. J., Ingram K. K., Prawiradilaga D. M., Winker K., Sheldon F. H., Moyle R. G., Ng P. K. L., Ong P. S., Wang L. K., Braile T. M., Astuti D., Meier R. (2010), Cryptic genetic diversity in "widespread" Southeast Asian bird species suggests that Philippine avian endemism is gravely underestimated. *Biol Conserv*, **143**, 8: 1885-90.

Ma Y., Li S., Xu J. (2006), Molecular identification and phylogeny of the Maculatus group of *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Acta Trop*, **99**, 2-3: 272-80.

Maan S., Maan N. S., Nomikou K., Veronesi E., Bachanek-Bankowska K., Belaganahalli M. N., Attoui H., Mertens P. P. (2011), Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PLoS One*, **6**, 10: e26147.

Macfie J. W. S. (1943), Ceratopogonidae (Diptera) of Egypt. *P Roy Entomol Soc B*, **12**: 145-59.

Maclachlan N. J., Guthrie A. J. (2010), Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet Res*, **41**, 6: 35. Epub 2010 Jan 27.

Manonmani A. M., Mathivanan A., Srinivasan R., Jambulingam P. (2010), Species-diagnostic polymerase chain reaction assays for *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi*, vectors of *Leishmania*. *J Med Entomol*, **47**, 5: 743-7.

Martinez-de la Puente J., Martinez J., Rivero-de Aguilar J., Herrero J., Merino S. (2011), On the specificity of avian blood parasites: revealing specific and generalist relationships between haemosporidians and biting midges. *Mol Ecol*, **20**, 15: 3275-87.

Mathieu B., Perrin A., Baldet T., Delécolle J. C., Albina E., Cêtre-Sossah C. (2007), Molecular identification of Western European Species of *Obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) by Internal Transcribed Spacer-1 rDNA Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. *J Med Entomol*, **44**, 6: 1019-25.

Matile L. (2000). Diptères d'Europe occidentale. Tome I. Boubée, 439 p.

Matile L., Lemoigne Y., Goujet D. (1989). Préambule. *In*: Le livre blanc de la systématique. Société Française de Systématique, Paris, pp. 1-5.

Matsumoto Y., Yanase T., Tsuda T., Noda H. (2009), Characterization of internal transcribed spacer (ITS1)-ITS2 region of ribosomal RNA gene from 25 species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan. *J Med Entomol*, **46**, 5: 1099-108.

Matsumoto Y., Yanase T., Tsuda T., Noda H. (2009), Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Med Vet Entomol*, **23**, 1: 47-55.

Mehlhorn H., Walldorf V., Klimpel S., Jahn B., Jaeger F., Eschweiler J., Hoffmann B., Beer M. (2007), First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol Res*, **101**, 1: 219-28.

- Meiswinkel R. (1987), Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) kanagai* khamala & kettle, 1971, reared from elephant dung in the Kruger national park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, **54**: 585-90.
- Meiswinkel R. (1989), Afrotropical *Culicoides*: A redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildbeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, **56**: 23-39.
- Meiswinkel R. (1991), Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) miombo* sp. nov., a widespread species closely allied to *C. (A.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera : Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res*, **58**: 155-70.
- Meiswinkel R. (1992), Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) loxodontis* sp. nov., a new member of the *Imicola* group (Diptera: Ceratopogonidae) associated with the African elephant in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, **59**, 2: 145-59.
- Meiswinkel R. (2004), Adult characters defining and separating the *Imicola* and *Orientalis* species complexes of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae). *Veterinary Italiana*, **40**, 3: 345-51.
- Meiswinkel R., Baldet T., de Deken R., Takken W., Delecolle J. C., Mellor P. S. (2008), The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe--the entomological perspective. *Prev Vet Med*, **87**, 1-2: 55-63.
- Meiswinkel R., Baylis M. (1998), Morphological confirmation of the separate species status of *Culicoides (Avaritia) nudipalpis* Delfinado, 1961 and *C. (A.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res*, **65**, 1: 9-16.
- Meiswinkel R., Goffredo M., Dijkstra E. G., van der Ven I. J., Baldet T., Elbers A. (2008), Endophily in *Culicoides* associated with BTV-infected cattle in the province of Limburg, south-eastern Netherlands, 2006. *Prev Vet Med*, **87**, 1-2: 182-95.
- Meiswinkel R., Gomulski L. M., Delécolle J. C., Goffredo M., Gasperi G. (2004), The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. *Veterinary Italiana*, **40**, 3: 151-9.
- Meiswinkel R., Linton Y. M. (2003), Afrotropical *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae): morphological and molecular description of a novel fruit-inhabiting member of the *imicola* Complex, with a re-description of its sister species *C. (Avaritia) pseudopallidipennis* Clastrier. *Cimbebasia*, **1**, 9: 37-79.
- Meiswinkel R., Paweska J. T. (2003), Evidence for a new field *Culicoides* vector of African horse sickness in South Africa. *Prev Vet Med*, **60**, 3: 243-53.
- Meiswinkel R., van Rijn P., Leijts P., Goffredo M. (2007), Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec*, **161**, 16: 564-5.
- Mellor P. S., Boned J., Hamblin C., Graham S. (1990), Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. *Epidemiol Infect*, **105**, 2: 447-54.
- Mellor P. S., Boorman J., Baylis M. (2000), *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol*, **45**: 307-40.
- Mellor P. S., Carpenter S., Harrup L., Baylis M., Mertens P. P. (2008), Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006. *Prev Vet Med*, **87**, 1-2: 4-20.
- Mellor P. S., Jennings D. M., Braverman Y., Boorman J. (1981), Infection of Israeli *Culicoides* with African horse sickness, bluetongue and akabane viruses. *Acta Virol*, **25**, 6: 401-7.



Mellor P. S., Wittmann E. J. (2002), Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet J*, **164**, 1: 20-37.

Menzies F. D., McCullough S. J., McKeown I. M., Forster J. L., Jess S., Batten C., Murchie A. K., Gloster J., Fallows J. G., Pelgrim W., Mellor P. S., Oura C. A. (2008), Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet Rec*, **163**, 7: 203-9.

Mintiens K., Meroc E., Mellor P. S., Staubach C., Gerbier G., Elbers A. R., Hendrickx G., De Clercq K. (2008), Possible routes of introduction of bluetongue virus serotype 8 into the epicentre of the 2006 epidemic in north-western Europe. *Prev Vet Med*, **87**, 1-2: 131-44.

Miranda M. A., Borrás D., Rincon C., Alemany A. (2003), Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Med Vet Entomol*, **17**: 52-4.

Monaco F., Benedetto L., Di Marcello V., Lelli R., Goffredo M. (2010), Development and preliminary evaluation of a real-time polymerase chain reaction for the identification of *Culicoides obsoletus sensu strictu*, *C. scoticus* and *C. montanus* in the Obsoletus Complex in Italy. *Veterinary Italiana*, **46**, 2: 215-20.

Mortimer-Jones S. M., Jones M. G., Jones R. A., Thomson G., Dwyer G. I. (2009), A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. *J Virol Methods*, **161**, 2: 289-96.

Neogi S. B., Chowdhury N., Asakura M., Hinenoya A., Haldar S., Saidi S. M., Kogure K., Lara R. J., Yamasaki S. (2010), A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Lett Appl Microbiol*, **51**, 3: 293-300.

Nielsen S. A., Kristensen M. (2011), Morphological and molecular identification of species of the Obsoletus group (Diptera: Ceratopogonidae) in Scandinavia. *Parasitol Res*, **109**, 4: 1133-41.

Nieschultz O., Bedford A. H., Du Toit R. M. (1934), Investigations into the Transmission of Bluetongue in Sheep during the Season 1931/1932. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, **2**, 2: 509-62.

Nolan D. V., Carpenter S., Barber J., Mellor P. S., Dallas J. F., Mordue Luntz A. J., Pierny S. B. (2007), Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol*, **124**, 1-2: 82-94.

Oliver J. H., Jr. (1988), Crisis in biosystematics of arthropods. *Science*, **240**, 4855: 967.

Opinel A. (2008), The emergence of French medical entomology: the influence of universities, the Institut Pasteur and military physicians (1890-c.1938). *Med Hist*, **52**, 3: 387-405.

Orlando L., Metcalf J. L., Alberdi M. T., Telles-Antunes M., Bonjean D., Otte M., Martin F., Eisenmann V., Mashkour M., Morello F., Prado J. L., Salas-Gismondi R., Shockey B. J., Wrinn P. J., Vasil'ev S. K., Ovodov N. D., Cherry M. I., Hopwood B., Male D., Austin J. J., Hanni C., Cooper A. (2009), Revising the recent evolutionary history of equids using ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 51: 21754-9.

Pagès N., Muñoz-Munoz F., Talavera S., Sarto V., Lorca C., Nunez J. I. (2009), Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Vet Parasitol*, **165**, 3-4: 298-310.

Pagès N., Sarto I Monteys V. (2005), Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I. *J Med Entomol*, **42**, 6: 1026-34.

- Parsonson I. M., Luedke A. J., Barber T. L., Walton T. E. (1994), Bluetongue virus infection in pregnant ewes. *Am J Vet Res*, **55**, 5: 666-9.
- Patsoula E., Samanidou-Voyadjoglou A., Spanakos G., Kremastinou J., Nasioulas G., Vakalis N. C. (2007), Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. *Med Vet Entomol*, **21**, 1: 36-43.
- Perrin A., Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Baldet T., Delécolle J. C., Albina E. (2006), Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS-1rDNA sequences. *Med Vet Entomol*, **20**, 2: 219-28.
- Pesson B., Ready J. S., Benabdennbi I., Martin-Sanchez J., Esseghir S., Cadi-Soussi M., Morillas-Marquez F., Ready P. D. (2004), Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med Vet Entomol*, **18**, 1: 25-37.
- Pili E., Carcangiu L., Oppo M., Marchi A. (2010), Genetic structure and population dynamics of the biting midges *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*: implications for the transmission and maintenance of bluetongue. *Med Vet Entomol*, **24**, 4: 441-48.
- Pinheiro F. P., Hoch A. L., Gomes M. d. L. C., Roberts D. R. (1981), Oropouche Virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 1: 172-6.
- Pinheiro F. P., Travassos da Rosa A. P. A., Travassos da Rosa J. F. S., Ishak R., Freitas R. B., Gomes M. L. C., LeDuc J. W., Oliva O. F. P. (1981), Oropouche Virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 1: 149-60.
- Posada D. (2008), jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, **25**, 7: 1253-6.
- Purse B. V., Mellor P. S., Rogers D. J., Samuel A. R., Mertens P. P., Baylis M. (2005), Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 2: 171-81.
- R Development Core Team (2010), R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>
- Rawlings P. (1996), A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille- diptera: ceratopogonidae) in the Iberian peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia*, **52**: 57-71.
- Reidenbach K. R., Cook S., Bertone M. A., Harbach R. E., Wiegmann B. M., Besansky N. J. (2009), Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol Biol*, **9**: 298.
- Roberts D. H., Lucus M. H., Bell R. A. (1992). Animal and animal product importation and assessment of risk. In: Bluetongue, African Horsesickness and Related Orbiviruses. *B.I. W. T. E. O. ed.*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 916–23.
- Rodhain F., Perez C. (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine éd., Paris, 458 p.
- Rodriguez M. C., Wirth W. W. (1986), A new species of man-biting *Culicoides* from the high Andes in Colombia (Diptera: Ceratopogonidae). *Florida Entomologist*, **69**, 2: 311-4.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. (2003), MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 12: 1572-4.

Rowley D. L., Coddington J. A., Gates M. W., Norrbom A. L., Ochoa R. A., Vandenberg N. J., Greenstone M. H. (2007), Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Mol Ecol Notes*, **7**, 6: 915-24.

Rumer L., Sheshukova O., Dautel H., Mantke O. D., Niedrig M. (2010), Differentiation of Medically Important Euro-Asian Tick Species *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by Polymerase Chain Reaction. *Vector-Borne Zoonot*, **11**, 7: 899-905.

Saegerman C., Mellor P., Uyttenhoef A., Hanon J. B., Kirschvink N., Haubruge E., Delcroix P., Houtain J. Y., Pourquier P., Vandebussche F., Verheyden B., De Clercq K., Czaplicki G. (2010), The most likely time and place of introduction of BTv8 into Belgian ruminants. *PLoS One*, **5**, 2: e9405.

Saeung A., Baimai V., Otsuka Y., Rattanarithikul R., Somboon P., Junkum A., Tuetun B., Takaoka H., Choochote W. (2008), Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* Form A (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Parasitol Res*, **102**, 3: 499-507.

Santman-Berends I. M., Van Wuijckhuise L., Vellema P., Van Rijn P. A. (2010), Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 virus in Dutch dairy herds in 2007. *Vet Microbiol*, **141**, 1-2: 31-5.

Sarto i Monteys V., Saiz-Ardanaz M. (2003), *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Med Vet Entomol*, **17**, 3: 288-93.

Savini G., Goffredo M., Monaco F., De Santis P., Meiswinkel R. (2003), Transmission of bluetongue virus in Italy. *Vet Rec*, **152**: 119.

Scarpassa V. M., Conn J. E. (2006), Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi sensu lato* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genet Mol Res*, **5**, 3: 493-502.

Schaffner F., Angel G., Geoffroy B., Hervy J., Rhaïem A., Brunhes J. (2001). The mosquitoes of Europe. An identification and training software. In IRD Editions and EID Méditerranée, Montpellier, France (CD-Rom).

Schlick-Steiner B. C., Steiner F. M., Seifert B., Stauffer C., Christian E., Crozier R. H. (2010), Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annu Rev Entomol*, **55**: 421-38.

Schneider S., Rehner S. A., Widmer F., Enkerli J. (2011), A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. *J Invertebr Pathol*, **108**, 2: 106-14.

Schwenkenbecher J. M., Mordue A. J., Pierny S. B. (2009), Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bull Entomol Res*, **99**, 4: 371-5.

Schwenkenbecher J. M., Mordue A. J., Switek K., Pierny S. B. (2009), Discrimination of *Culicoides* midge larvae using multiplex polymerase chain reaction assays based on DNA sequence variation at the mitochondrial cytochrome C oxidase I gene. *J Med Entomol*, **46**, 3: 610-4.

Sharifah S. H., Ali M. A., Gard G. P., Polkinghorne I. G. (1995), Isolation of multiple serotypes of bluetongue virus from sentinel livestock in Malaysia. *Trop Anim Health Prod*, **27**, 1: 37-42.

Sharpe R. G., Harbach R. E., Butlin R. K. (2000), Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus Group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol*, **25**: 263-72.

Simon C., Buckley T. R., Frati F., Stewart J. B., Beckenbach A. T. (2006), Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Evol S*, **37**, 1: 545-79.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Floors P. (1994), Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann Entomol Soc Am*, **87**: 651-701.

Smith M. A., Woodley N. E., Janzen D. H., Hallwachs W., Hebert P. D. (2006), DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10: 3657-62.

Song H. (2010), Grasshopper Systematics: Past, Present and Future. *Journal of Orthoptera Research*, **19**, 1: 57-68.

Spinelli G. R., Borkent A. (2004), New species of central America *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) with a synopsis of species from Costa Rica. *Proc Entomol Soc Wash*, **106**, 2: 361-95.

Spinelli G. R., Wirth W. W. (1984), Ocho especies nuevas del genero *Culicoides* Latreille de la region Neotropical. Primera descripcion del macho de *C. flinti* Wirth, y de la hembra de *C. lenti* Tavares y Luna Dias (Diptera: Ceratopogonidae). *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*, **40**: 171-85.

Steensels D., Verhaegen J., Lagrou K. (2011), Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin Belg*, **66**, 4: 267-73.

Stram Y., Brenner J., Braverman Y., Banet-Noach C., Kuznetzova L., Ginni M. (2004), Akabane virus in Israel: a new virus lineage. *Virus Res*, **104**, 1: 93-7.

Szadziewski R. (1984), Ceratopogonidae (Diptera) from Algeria. VI. *Culicoides* LATK. *Polskie Pismo Entomologiczne*, **54**: 163-82.

Tabachnick W. J. (1996), *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. *Annu Rev Entomol*, **41**: 23-43.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011), MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*, **28**, 10: 2731-9.

Theiler A. (1906), Blue-tongue in sheep. *Ann Rept Director Agric, Transvaal, for 1904-1905*: 110-21.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 22: 4673-80.

Torina A., Caracappa S., Mellor P. S., Baylis M., Purse B. V. (2004), Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. *Med Vet Entomol*, **18**, 2: 81-9.

Toussaint J. F., Vandebussche F., Mast J., De Meester L., Goris N., Van Dessel W., Vanopdenbosche E., Kerkhofs P., De Clercq K., Zientara S., Sailleau C., Czaplicki G., Depoorter G., Dochy J. M. (2006), Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec*, **159**, 10: 327.

Ung V., Dubus G., Zaragueta-Bagils R., Vignes-Lebbe R. (2010), Xper2: introducing e-taxonomy. *Bioinformatics*, **26**, 5: 703-4.

Van der Sluijs M., Timmermans M., Moulin V., Noordegraaf C. V., Vrijenhoek M., Debyser I., de Smit A. J., Moormann R. (2011), Transplacental transmission of Bluetongue virus serotype 8 in ewes in early and mid gestation. *Vet Microbiol*, **149**, 1-2: 113-25.

- Vanbinst T., Vandenbussche F., Vandemeulebroucke E., De Leeuw I., Deblauwe I., De Deken G., Madder M., Haubruge E., Losson B., De Clercq K. (2009), Bluetongue virus detection by real-time RT-PCR in *Culicoides* captured during the 2006 epizootic in Belgium and development of an internal control. *Transbound Emerg Dis*, **56**, 5: 170-7.
- Velasquez Y., Magana C., Martinez-Sanchez A., Rojo S. (2010), Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Med Vet Entomol*, **24**, 3: 293-308.
- Velthuis A. G., Saatkamp H. W., Mourits M. C., de Koeijer A. A., Elbers A. R. (2010), Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev Vet Med*, **93**, 4: 294-304.
- Venter G. J., Wright I. M., Van Der Linde T. C., Paweska J. T. (2009), The oral susceptibility of South African field populations of *Culicoides* to African horse sickness virus. *Med Vet Entomol*, **23**, 4: 367-78.
- Vignes-Lebbe R., Gallut C. (1997). Computer Aided Identification of Phlebotomine sandflies of Americas (CIPA). In Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.  
<http://lis-upmc.snv.jussieu.fr/xper2/infosXper2Bases/en/>
- Wenk C. E., Kaufmann C., Schaffner F., Mathis A. (2012), Molecular characterization of Swiss Ceratopogonidae (Diptera) and evaluation of real-time PCR assays for the identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Parasitol*, **184**: 258-66.
- Whiting M. F., Carpenter J. C., Wheeler Q. D., Wheeler W. C. (1997), The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst Biol*, **46**, 1: 1-68.
- Will K. W., Mishler B. D., Wheeler Q. D. (2005), The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst Biol*, **54**, 5: 844-51.
- Wilson A., Mellor P. (2008), Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitol Res*, **103 Suppl 1**: 69-77.
- Wirth W. W. (1952). The Heleidae of California. *In: Publications in Entomology*. University of California, Berkeley, CA, vol. 9, pp. 95-266.
- Wirth W. W., Dyce A. L., Spinelli G. R. (1988), An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Contributions of the American Entomological Institute*, **25**, 1: 71 pp.
- Wirth W. W., Hubert A. A. (1989), The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, **44**: 1-508.
- Wirth W. W., Marston N. (1968), A method for mounting small insects on microscope slides in Canada Balsum. *Ann Entomol Soc Am*, **61**: 783-84.
- Xia X., Xie Z. (2001), DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered*, **92**, 4: 371-3.
- Yeates D. K., Seago A., Nelson L., Cameron S. L., Joseph L. E. O., Trueman J. W. H. (2011), Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Syst Entomol*, **36**, 2: 209-17.
- Yu Y., -X., Liu J., -H., Liu G., -P., Liu Z., -J., Hao B., -S., Yan G., Zhao T., -S. (2005). Ceratopogonidae of China, Insecta, Diptera [in Chinese]. Military Medical Science Press, 1699 p.

Zanella G., Durand B., Sellal E., Breard E., Sailleau C., Zientara S., Batten C. A., Mathevet P., Audeval C. (2012), Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008-2009. *Theriogenology*, **77**, 1: 65-72.

Zare G., Keshavarzi M. (2007), Morphological study of Salicornieae (Chenopodiaceae) native to Iran. *Pak J Biol Sci*, **10**, 6: 852-60.



## **Annexes**



## Annexe 1: Morphologie des *Culicoides*

Dans cette annexe, la morphologie du genre *Culicoides* est introduite et la nomenclature des caractères morphologiques utilisés est donnée et schématisée. Les lecteurs pourront s'y référer pour localiser les caractères mentionnés ultérieurement. Chaque partie anatomique est décrite selon la morphologie de la femelle et le dimorphisme sexuel observé chez le mâle est mentionné en fin de partie.

### Tête

La tête est arrondie et aplatie dans le sens antéro-postérieur (Figure 1). Sa longueur est à peu près égale à la longueur de la trompe piqueuse ; cette dernière est à peu près aussi longue que les palpes maxillaires<sup>33</sup>. La majeure partie de la tête est occupée par des yeux composés de facettes, ou ommatidies, qui peuvent être soudés entre eux ou séparés par un espace interoculaire (absence d'ocelles). Généralement nu, certaines espèces peuvent toutefois présenter une pubescence éparses ou dense entre les facettes.

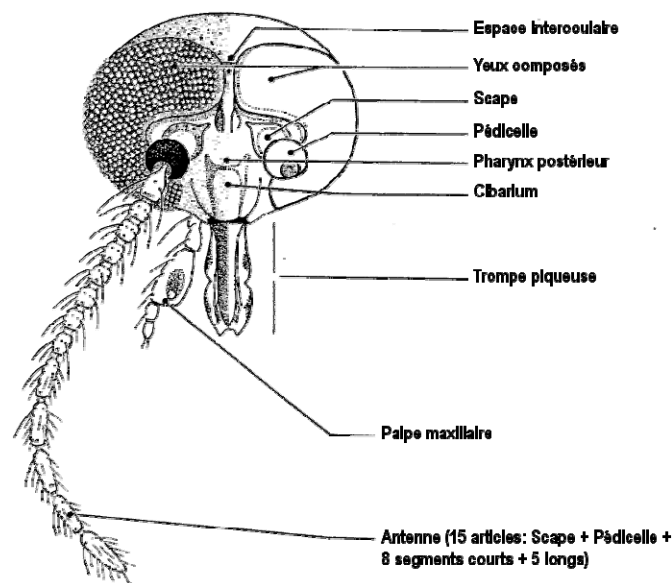


Figure 1 : Tête d'une femelle du genre *Culicoides*, modifié d'après Delécolle (1985).

Les palpes maxillaires sont constitués de 5 articles, les deux premiers étant soudés entre eux. Le 3<sup>ème</sup> article du palpe, généralement plus renflé que les autres, présente une ou plusieurs fossettes sensorielles ornées d'organes claviformes. La trompe piqueuse vulnérante de type piqueur-suceur, est composée d'un labre épipharynx, de deux mandibules, de deux maxilles,

<sup>33</sup> L'évaluation de ces rapports de longueur à la loupe binoculaire est un bon moyen d'éviter la confusion avec d'autres insectes lors d'une étape de pré-tri.

d'un hypopharynx et d'un labium entourant l'ensemble des pièces buccales dans un rôle protecteur. Chez certaines espèces, le cibarium et/ou le pharynx postérieur, peuvent présenter une ornementation.

L'antenne est composée de 15 articles (numéroté de I à XV). Le premier, le scape, circulaire et aplati, constitue la base de l'antenne. Le second, le pédicelle, est globuleux et nettement plus gros que les autres articles. Le flagelle antennaire est constitué de 13 articles, les 8 premiers (III à X) étant plus courts que les 5 derniers (XI à XV). Les articles antennaires portent différents types de sensilles (Figure 2). La répartition des sensilla coeloconica, ou sensilles coeloconiques, sur les articles antennaires est un caractère diagnostique pour identifier certaines espèces. Le nombre de sensilla trichodea, ou sensilles trichoïdes, courtes (une ou deux par article court), est un caractère diagnostique mais difficile à observer. Chez quelques rares espèces, les sensilles trichoïdes longues sont hypertrophiées (environ trois fois plus large que chez la majorité des espèces mais plus courtes).

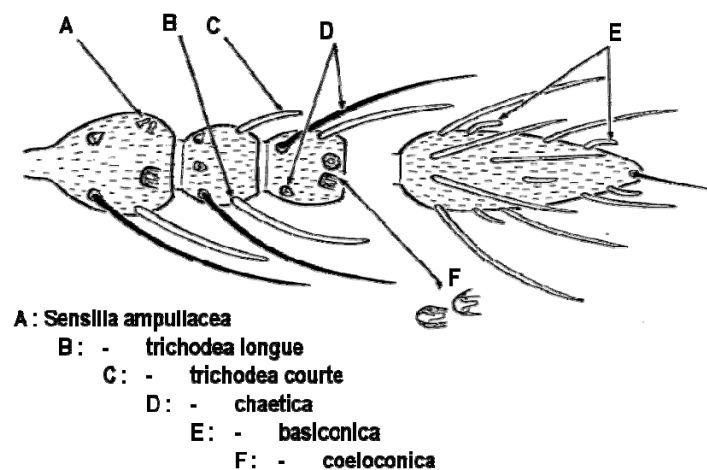


Figure 2 : Diversité des sensilles présentes sur les articles antennaires (d'après Delécolle, 1985).

Chez les mâles, les yeux sont toujours soudés. L'antenne présente un pédicelle volumineux et les trois derniers articles antennaires XIII-XV sont longs. Les sensilla chaetica, ou sensilles chétiformes, sont très abondantes et très longues et orientées toujours dans l'axe de l'antenne<sup>34</sup> donnant un aspect plumeux à l'antenne. Etant non-hématophage, la trompe des mâles est plus courte que celle des femelles. Les mandibules sont inermes (sans dents) et les maxilles peuvent présenter à leur apex quelques éléments de pubescence.

<sup>34</sup> L'orientation des sensilles chaetica dans l'axe de l'antenne est un bon critère pour écarter par exemple les mâles Chironomidae au cours d'un pré-tri.

## Thorax

Le thorax composé de plusieurs segments porte une paire d'aile (Figure 3), une paire de balanciers servant à équilibrer le vol, et trois paires de pattes (Figure 4). La coloration du scutum et du scutellum peut avoir une très grande utilité dans la diagnose de certaines espèces.

## Aile

La plupart des espèces présente des ailes tachetées. La forme, la disposition (ou l'absence) de ces taches alaires apportent de précieuses informations pour la détermination des espèces. La nomenclature des cellules et nervures utilise les lettres minuscules pour désigner les cellules, et les lettres capitales pour les nervures (Figure 3). La présence de deux cellules radiales ouvertes de taille à peu près égale (la deuxième pouvant être plus longue chez certaines espèces) est un caractère diagnostique du genre *Culicoides*.

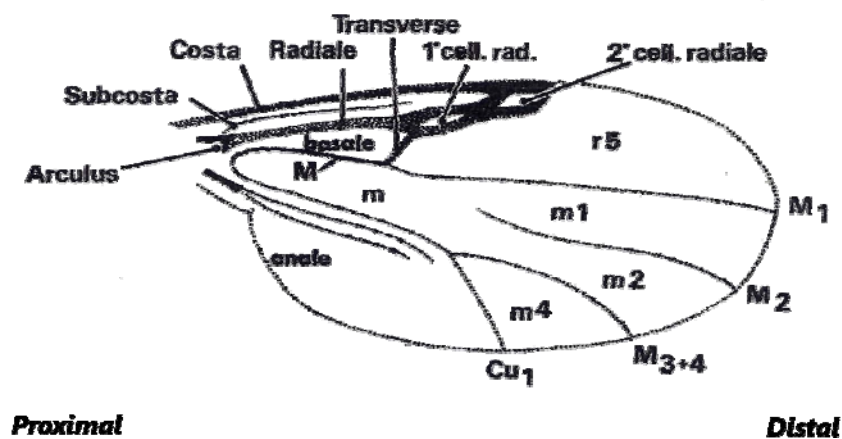


Figure 3 : Schéma d'une aile type de *Culicoides* montrant la localisation des cellules et des nervures (d'après Delécolle, 1985). m=médiane, r=radiale et cu=cubitale

Chez les mâles, les ailes sont plus longues et plus étroites que celles des femelles. Chez les espèces à ailes tachetées, les taches sont en général plus étendues.

## Pattes

La coloration et l'ornementation des pattes peuvent avoir un intérêt dans la diagnose des espèces. Tous les *Culicoides* ont des épines sur les trois premiers tarsomères des pattes médianes. Les pattes antérieures se reconnaissent par la présence d'un éperon sur la partie distale du tibia, et les pattes postérieures par la présence d'un peigne tibial (Figure 4). Les pattes médianes n'arborent aucune structure à l'extrémité distale du tibia.

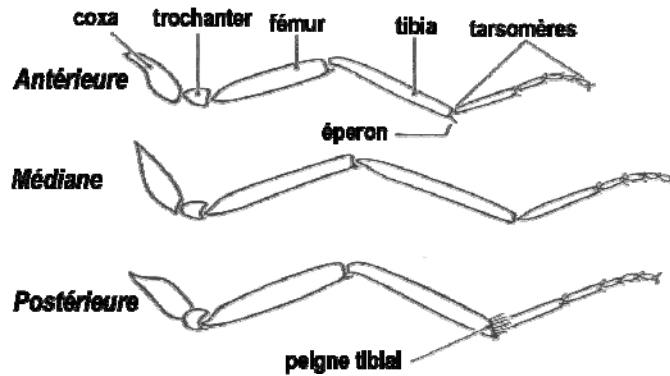


Figure 4 : Schéma des articles composant les pattes (d'après Delécolle, 1985).

Il n'y a pas de dimorphisme sexuel notable pour les pattes.

### Abdomen

L'abdomen est composé de dix segments, et les derniers portent l'appareil génital interne de la femelle (Figure 5). Selon les espèces, on peut compter de une à trois spermathèques fonctionnelles, en général bien chitinisées. A la jonction des conduits des spermathèques, un anneau sclérifié peut être présent et prendre diverses formes. Chez quelques rares espèces, des sclérites abdominaux internes sont présents.

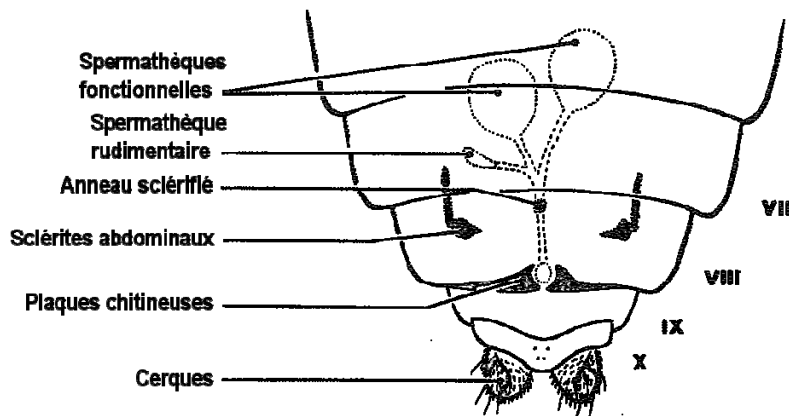


Figure 5 : Schéma des segments abdominaux VII à X chez la femelle (d'après Delécolle, 1985).

Chez les mâles, les derniers segments abdominaux portent l'appareil génital mâle (Figure 6). Le 9<sup>ème</sup> tergite est en forme de trapèze et peut présenter des processus apico-latéraux de part et d'autre de la lamelle. La forme de cette partie distale du 9<sup>ème</sup> tergite est variable chez les espèces. Le 9<sup>ème</sup> sternite est court et peut être échancré ou franchement fendu. Une membrane basale recouvre les parties basales de l'édéage et des paramères. Cette membrane peut être

nue ou plus ou moins recouverte de spicules. L'édéage, est une pièce impaire formée d'un corps médian et deux bras latéraux. Située sous l'édéage, la paire de paramères peut prendre des formes extrêmement variables. Les basistyles et les dististyles forment une pince et les basistyles présentent des apodèmes dorsaux et ventraux. Chaque pièce de l'appareil génital mâle peut présenter une variété de forme surprenante.

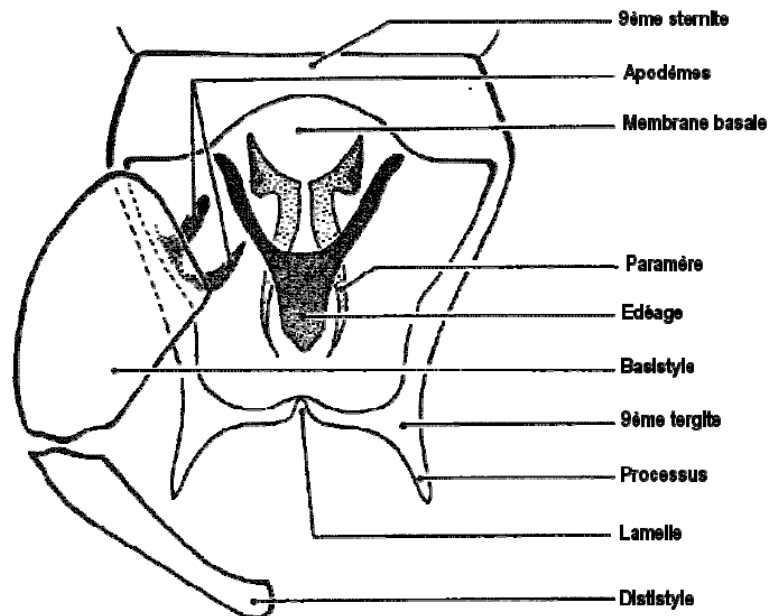


Figure 6 : Appareil génital mâle (d'après Delécolle, 1985).

## Annexe 2 : La collecte de *Culicoides* vivants selon Du Toit

Ce piège lumineux est une version modifiée du *New Jersey light trap* (Figure 1). La source lumineuse est placée sous le ventilateur et la cage afin que la chaleur de la lampe produise un courant de convection pouvant aider à l'aspiration. Selon les auteurs, les insectes auraient tendance à voler vers le haut et la capture serait donc plus aisée dans une colonne d'air verticale. Un tube présent à l'intérieur même de la cage permettrait aux insectes de se déplacer autour de la colonne d'air chaud et donc limiterait les pertes par déshydratation. La cage est placée entre le ventilateur et la lumière pour permettre aux insectes de ne pas être abîmés lors de leur passage au travers de l'hélice. La cage est entourée d'organdi à l'exception d'une face qui est vitrée pour faciliter la visibilité. Un type d'ampoule particulier est recommandé comme plus efficace, un « couvercle de poubelle » est placé sur l'ensemble pour protéger de la pluie.

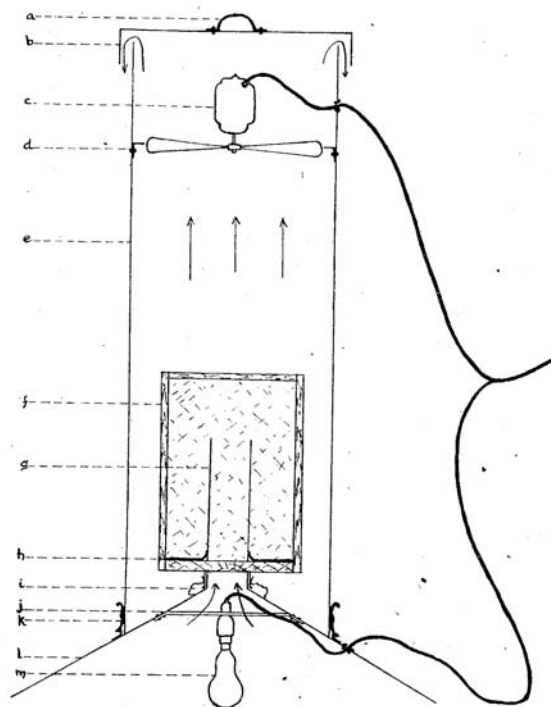


Fig. 1.—Light trap. (a) Metal loop for suspending trap. (b) Dustbin type cover. (c) Electric fan with 7 in. blades. (d) Metal flange to allow 1 in. clearance for fan blades. (e) Cylindrical sheet metal body of trap, 8 in. diameter. (f) Catching cage. (g) Sheet metal inlet pipe or tube. (h) Felt or thick woollen cloth glued around opening of catching cage to act as seal between this opening and inlet tube. (i) Muslin sleeve. (j) Metal bracket to support lamp. (k) Spring clip attaching conical hood to body of trap. (l) Conical sheet metal hood 17 in. wide below. (m) 75 watt electric lamp. Arrows indicate direction of air flow.

Figure 1 : Piège lumineux optimisé par R. M. Du Toit pour la collecte et le maintien en vie de *Culicoides* (Du Toit, 1944).



	ELABORÉ															PROTOZOA		VIRUS														
																Unclassified arbovirus																
																Lysavirus																
																Vesiculovirus																
																Orbivirus																
																Nairovirus																
																Flavivirus																
																Bunyavirus																
																alphavirus																
	total	total	détail			total	total	détail			total	total	détail			total	total	détail			total	total	détail									



## Annexe 4 : Liste des espèces supplémentaires à notre liste données comme appartenant au sous-genre *Avaritia* par Yu (2005)

La position dans le sous-genre *Avaritia* est commentée.

*Incertae sedis*, mentionne un placement incertain lorsque ni les figures ni la présence d'autres références ne nous a permis de conclure quant à l'appartenance à un sous-genre (s/g).

Espèces	s/g <i>Avaritia</i>	Commentaires
<i>C. bubalus</i> Delfinado, 1961	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. clavipalpis</i> Mukerji, 1931	Non	Clavipalpis group d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. comparis</i> Liu and Yu, 2006	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. elongatus</i> Chu and Liu, 1978	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. gaponus</i> Yu, 1982	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. incertus</i> Yu and Zhang, in Yu, 1988	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. innoxius</i> Sen and Das Gupta, 1959	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. insignipennis</i> Macfie, 1937	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. iphthimus</i> Zhou and Lee, 1984	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. kepongensis</i> Lee, 1988	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. kinabaluensis</i> Wirth and Hubert, 1989	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. lansangensis</i> Howarth, 1985	Non	s/g <i>Culicoides</i> d'après figures et Howarth (1985) et s/g <i>Hoffmania</i> d'après Wirth et Hubert (1989)
<i>C. liui</i> Wirth and Hubert, 1961	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. malayae</i> Macfie, 1937	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. nielamensis</i> Liu and Deng, 2000	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. nigrinus</i> Fei and Lee, 1984	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. orestes</i> Wirth and Hubert, 1989	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. pelius</i> Liu and Yu, 1990	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. peregrinus</i> Kieffer, 1910	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. ruiliensis</i> Lee, 1980	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. sumatrae</i> Macfie, 1934	Non	s/g <i>Hoffmania</i> d'après figures et Wirth et Hubert (1989)
<i>C. trimaculatus</i> McDonald and Lu, 1972	Oui	s/g <i>Avaritia</i> en accord d'après Lien (1998)
<i>C. yamii</i> Lien, Lin and Weng, 1998	-	<i>Incertae sedis</i>
<i>C. yuchihensis</i> Lien, Lin and Weng, 1998	-	<i>Incertae sedis</i>

## Annexe 5 : Tableau synthétique de la répartition biogéographique des espèces du sous-genre *Avaritia*

Espèces	Régions biogéographiques					
	Australienne	Ethiopienne	Néarctique	Néotropicale	Orientale	Paléarctique
<i>C. (A.) abchazicus</i>						X
<i>C. (A.) actoni</i>	X				X	
<i>C. (A.) alachua</i>			X			
<i>C. (A.) albifascia</i>					X	
<i>C. (A.) alticola</i>		X				
<i>C. (A.) andicola</i>				X		
<i>C. (A.) bolitinos</i>		X				
<i>C. (A.) boophagus</i>	X				X	
<i>C. (A.) boydi</i>			X			
<i>C. (A.) brevipalpis</i>	X				X	
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	X				X	
<i>C. (A.) brusseti</i>		X				
<i>C. (A.) certus</i>					X	
<i>C. (A.) chiopterus</i>			X		X	X
<i>C. (A.) conaensis</i>					X	
<i>C. (A.) dasyops</i>		X				
<i>C. (A.) definitus</i>					X	
<i>C. (A.) dentiformis</i>					X	
<i>C. (A.) dewulfi</i>						X
<i>C. (A.) dikhros</i>					X	
<i>C. (A.) dubitatus</i>		X				
<i>C. (A.) dumdumi</i>	X				X	
<i>C. (A.) filamentus</i>					X	
<i>C. (A.) filicinus</i>						X
<i>C. (A.) flavipunctatus</i>					X	
<i>C. (A.) fragmentum</i>					X	
<i>C. (A.) fulvus</i>	X				X	
<i>C. (A.) glabripennis</i>		X				
<i>C. (A.) glushchenkoeae</i>						X
<i>C. (A.) gornostaeva</i>						X
<i>C. (A.) grahamii</i>		X				
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>		X				
<i>C. (A.) hasegawai</i>					X	
<i>C. (A.) hayakawai</i>					X	
<i>C. (A.) hermani</i>				X		
<i>C. (A.) hirtulus</i>			X			
<i>C. (A.) holcus</i>					X	
<i>C. (A.) hui</i>					X	
<i>C. (A.) imicola</i>		X			X	X
<i>C. (A.) impusilloides</i>				X		
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	X				X	
<i>C. (A.) juddi</i>			X			
<i>C. (A.) kanagai</i>		X				
<i>C. (A.) kibatiensis</i>		X				

Tableau Annexe 5 – Suite et fin

Espèces	Régions biogéographiques					
	Australienne	Ethiopienne	Néarctique	Néotropicale	Orientale	Paléarctique
<i>C. (A.) lengi</i>					X	
<i>C. (A.) longirostris</i>					X	
<i>C. (A.) loxodontis</i>		X				
<i>C. (A.) mamaensis</i>					X	
<i>C. (A.) minimus</i>	X				X	
<i>C. (A.) miombo</i>		X				
<i>C. (A.) montanus</i>						X
<i>C. (A.) motoensis</i>					X	
<i>C. (A.) nudipalpis</i>					X	
<i>C. (A.) nujiangensis</i>					X	
<i>C. (A.) nupurius</i>					X	
<i>C. (A.) obscurus</i>	X		X		X	
<i>C. (A.) obsoletus</i>			X			X
<i>C. (A.) orientalis</i>	X				X	
<i>C. (A.) orjuelai</i>				X		
<i>C. (A.) palauensis</i>					X	
<i>C. (A.) pastus</i>					X	
<i>C. (A.) pechumani</i>			X			
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>		X				
<i>C. (A.) puracensis</i>				X		
<i>C. (A.) pusilloides</i>				X		
<i>C. (A.) pusillus</i>			X	X		
<i>C. (A.) qionghaiensis</i>					X	
<i>C. (A.) sanguisuga</i>			X			X
<i>C. (A.) scoticus</i>						X
<i>C. (A.) sinanoensis</i>					X	X
<i>C. (A.) sousa-diasi</i>		X				
<i>C. (A.) suarezi</i>				X		
<i>C. (A.) suzukii</i>					X	
<i>C. (A.) tainanus</i>					X	
<i>C. (A.) tibetensis</i>					X	
<i>C. (A.) tobaensis</i>					X	
<i>C. (A.) tororoensis</i>		X				
<i>C. (A.) towadaensis</i>					X	
<i>C. (A.) trifasciellus</i>		X				
<i>C. (A.) trimaculatus</i>					X	
<i>C. (A.) tuttifrutti</i>		X				
<i>C. (A.) wadai</i>	X				X	
<i>C. (A.) wandashanensis</i>					X	

**Annexe 6 : Chorologie des espèces du sous-genre  
*Avaritia***

*Cette annexe est présentée sous la forme d'un tableau réparti sur les 7 pages suivantes.*

Espèces	Région	PAYS	AUTEURS	ANNEE
<i>C. (A.) abchazicus</i>	Paléarctique	ARMÉNIE	REMM	1988
<i>C. (A.) abchazicus</i>	Paléarctique	AZERBAÏDJAN	REMM	1988
<i>C. (A.) abchazicus</i>	Paléarctique	FRANCE	non publié	
<i>C. (A.) abchazicus</i>	Paléarctique	GÉORGIE	REMM	1988
<i>C. (A.) abchazicus</i>	Paléarctique	RÉPUBLIQUE TCHÈQUE	REMM	1988
<i>C. (A.) actoni</i>	Australienne	AUSTRALIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Australienne	AUSTRALIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	CAMBODGE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	CHINE	REMM	1988
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	INDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	JAPON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	JAPON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	JAPON	REMM	1988
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	SRI LANKA	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	TAÏWAN	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) actoni</i>	Orientale	VIÊT NAM	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) alachua</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	JAMNBACK & WIRTH	1963
<i>C. (A.) albifascia</i>	Orientale	CHINE	YU, Y.X., et al.	2005
<i>C. (A.) albifascia</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) albifascia</i>	Orientale	TAÏWAN	TOKUNAGA	1937
<i>C. (A.) alticola</i>	Ethiopienne	TANZANIE	KIEFFER	1913
<i>C. (A.) andicola</i>	Néotropicale	COLOMBIE	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) boitinos</i>	Ethiopienne	AFRIQUE DU SUD	MEISWINKEL	1989
<i>C. (A.) boitinos</i>	Ethiopienne	KENYA	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) boitinos</i>	Ethiopienne	LESOTHO	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) boitinos</i>	Ethiopienne	MALAWI	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) boitinos</i>	Ethiopienne	ZIMBABWE	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) boophagus</i>	Australienne	AUSTRALIE	DYCE, BELLIS & MULLER	2007
<i>C. (A.) boophagus</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) boophagus</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) boophagus</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) boophagus</i>	Orientale	SRI LANKA	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) boophagus</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) boydi</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS EST	Descript originale	
<i>C. (A.) boydi</i>	Néarctique	MEXIQUE (BAJA CALIFORNIA)	BORKENT & SPINELLI	2000
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Australienne	AUSTRALIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	RYUKYU ISLANDS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	SRI LANKA	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	TAÏWAN	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) brevivalpis</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Australienne	AUSTRALIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	INDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	RYUKYU ISLANDS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	SRI LANKA	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	TAÏWAN	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998

Espèces	Région	PAYS	AUTEURS	ANNEE
<i>C. (A.) brevitarsis</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) broseti</i>	Ethiopienne	ANGOLA	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) broseti</i>	Ethiopienne	BURKINA FASO	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) broseti</i>	Ethiopienne	GABON	VATTIER & ADAM	1966
<i>C. (A.) broseti</i>	Ethiopienne	MADAGASCAR	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) certus</i>	Orientale	INDE	DAS GUPTA	1962
<i>C. (A.) chiopterus</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	REMM	1988
<i>C. (A.) chiopterus</i>	Orientale	CHINE	REMM	1988
<i>C. (A.) chiopterus</i>	Orientale	JAPON	REMM	1988
<i>C. (A.) chiopterus</i>	Paléarctique	EUROPE	REMM	1988
<i>C. (A.) chiopterus</i>	Paléarctique	ISRAËL	REMM	1988
<i>C. (A.) chiopterus</i>	Paléarctique	RUSSIE	REMM	1988
<i>C. (A.) conaensis</i>	Orientale	CHINE	LUI & YU	1990
<i>C. (A.) dasyops</i>	Ethiopienne	SÉNÉGAL	CLASTRIER	1958
<i>C. (A.) definitus</i>	Orientale	INDE	SEN & DAS GUPTA	1959
<i>C. (A.) dentiformis</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) dentiformis</i>	Orientale	TAÏWAN	MC DONALD & LU	1972
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	AZERBAÏDJAN	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	BELGIQUE	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	DANEMARK	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	FRANCE	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	KIRGHIZISTAN	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	RÉPUBLIQUE TCHÈQUE	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	ROUMANIE	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	ROYAUME-UNI	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	RUSSIE	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	SIBÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	TADJIKISTAN	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	TURKMÉNISTAN	REMM	1988
<i>C. (A.) dewulfi</i>	Paléarctique	UKRAINE	REMM	1988
<i>C. (A.) dikhros</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	TOKUNAGA	1962
<i>C. (A.) dubitatus</i>	Ethiopienne	ANGOLA	KREMER, et al.	1976
<i>C. (A.) dumdumi</i>	Australienne	AUSTRALIE	DYCE, BELLIS & MULLER	2007
<i>C. (A.) dumdumi</i>	Orientale	INDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) dumdumi</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) filamentus</i>	Orientale	CHINE	LIU, et al.	1996
<i>C. (A.) filicinus</i>	Paléarctique	SIBÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) filicinus</i>	Paléarctique	SIBÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) flavipunctatus</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) flavipunctatus</i>	Orientale	JAPON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) flavipunctatus</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) flavipunctatus</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) fragmentum</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	TOKUNAGA	1962
<i>C. (A.) fulvus</i>	Australienne	AUSTRALIE	DYCE, BELLIS & MULLER	2007
<i>C. (A.) fulvus</i>	Orientale	ASIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) glabripennis</i>	Ethiopienne	CONGO (RÉP DÉM)	GOETGHEBUER	1935
<i>C. (A.) glushchenkoae</i>	Paléarctique	RUSSIE	GLUKHOVA	1989
<i>C. (A.) gormostaeva</i>	Paléarctique	RUSSIE	MIRZAEVA	1984
<i>C. (A.) grahamii</i>	Ethiopienne	AFRIQUE	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) grahamii</i>	Ethiopienne	CAMEROUN	CALLOT, J & all	1965
<i>C. (A.) grahamii</i>	Ethiopienne	GHANA	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) grahamii</i>	Ethiopienne	KENYA	KHAMALA & KETTLE	1971
<i>C. (A.) grahamii</i>	Ethiopienne	MADAGASCAR	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) grahamii</i>	Ethiopienne	OUGANDA	KHAMALA & KETTLE	1971
<i>C. (A.) grahamii</i>	Ethiopienne	TANZANIE	KHAMALA & KETTLE	1971
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	Ethiopienne	AFRIQUE DU SUD	GLICK	1990
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	Ethiopienne	KENYA	GLICK	1990
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	Ethiopienne	OUGANDA	GLICK	1990
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	Ethiopienne	TANZANIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) gulbenkiani</i>	Ethiopienne	ZIMBABWE	GLICK	1990
<i>C. (A.) hasegawai</i>	Orientale	JAPON	KANASUGI & KITAOKA	2001
<i>C. (A.) hayakawai</i>	Orientale	JAPON	KITAOKA	1984
<i>C. (A.) hermani</i>	Néotropicale	COSTA RICA	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) hermani</i>	Néotropicale	PANAMA	SPINELLI	2009

Espèces	Région	PAYS	AUTEURS	ANNEE
<i>C. (A.) hirtulus</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	WIRTH, DYCE & PETERSON	1985
<i>C. (A.) holcus</i>	Orientale	CHINE	LEE	1980
<i>C. (A.) hui</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) hui</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) hui</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) hui</i>	Orientale	TAÏWAN	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) hui</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	AFRIQUE	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	AFRIQUE DU SUD	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	ANGOLA	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	CAMEROUN	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	CONGO (RÉP DÉM)	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	CONGO	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	CÔTE D'IVOIRE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	ÉTHIOPIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	GAMBIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	GHANA	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	GUINÉE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	KENYA	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	MADAGASCAR	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	MAURICE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	NIGERIA	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	OUGANDA	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	RÉUNION	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	SAO TOMÉ-ET-PRINCIPE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	SÉNÉGAL	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	SOUDAN	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	TANZANIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	TCHAD	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Ethiopienne	ZIMBABWE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Orientale	INDE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Orientale	INDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) imicola</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) imicola</i>	Orientale	SRI LANKA	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) imicola</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) imicola</i>	Orientale	VIÊT NAM	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	ALGÉRIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	ALGÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	CHYPRE	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	CHYPRE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	ÉGYPTE	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	ÉGYPTE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	ESPAGNE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	FRANCE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	IRAN	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	IRAN	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	IRAQ	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	IRAQ	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	ISRAËL	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	ISRAËL	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	MAROC	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	MAROC	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	SYRIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	TURQUIE	REMM	1988
<i>C. (A.) imicola</i>	Paléarctique	TURQUIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) impusilloides</i>	Néotropicale	BRÉSIL	SPINELLI & WIRTH	1984
<i>C. (A.) impusilloides</i>	Néotropicale	BRÉSIL	BORKENT & SPINELLI	2000
<i>C. (A.) impusilloides</i>	Néotropicale	URUGUAY	BORKENT & SPINELLI	2000
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Australienne	ILES SALOMON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	ASIE	REMM	1988
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	JAPON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	JAPON	REMM	1988
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989

Espèces	Région	PAYS	AUTEURS	ANNEE
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	REMM	1988
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	RYUKYU ISLANDS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) jacobsoni</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) juddi</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS EST	WIRTH, DYCE & PETERSON	1985
<i>C. (A.) kanagai</i>	Ethiopienne	KENYA	GLICK	1990
<i>C. (A.) kanagai</i>	Ethiopienne	ZIMBABWE	GLICK	1990
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Ethiopienne	CONGO (RÉP DÉM)	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Ethiopienne	CONGO (RÉP DÉM)	GOETGHEBUER	1935
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Ethiopienne	CONGO (RÉP DÉM)	GLICK	1990
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Ethiopienne	KENYA	GLICK	1990
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Ethiopienne	NIGERIA	GLICK	1990
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Ethiopienne	OUGANDA	GLICK	1990
<i>C. (A.) kibatiensis</i>	Ethiopienne	TANZANIE	GLICK	1990
<i>C. (A.) lengi</i>	Orientale	CHINE	YU & LIU	1990
<i>C. (A.) longirostris</i>	Orientale	CHINE	QU & WANG	1994
<i>C. (A.) loxodontis</i>	Ethiopienne	AFRIQUE DU SUD	MEISWINKEL	1992
<i>C. (A.) mamaensis</i>	Orientale	CHINE	LEE	1979
<i>C. (A.) minimus</i>	Australienne	AUSTRALIE	DYCE, BELLIS & MULLER	2007
<i>C. (A.) minimus</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) minimus</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) minimus</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) miombo</i>	Ethiopienne	AFRIQUE DU SUD	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) miombo</i>	Ethiopienne	BOTSWANA	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) miombo</i>	Ethiopienne	CÔTE D'IVOIRE	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) miombo</i>	Ethiopienne	MALAWI	MEISWINKEL	1991
<i>C. (A.) miombo</i>	Ethiopienne	ZIMBABWE	SEGERMAN, J.	1996
<i>C. (A.) montanus</i>	Paléarctique	ISRAËL	REMM	1988
<i>C. (A.) montanus</i>	Paléarctique	KAZAKHSTAN	REMM	1988
<i>C. (A.) montanus</i>	Paléarctique	MAROC	REMM	1988
<i>C. (A.) montanus</i>	Paléarctique	TURKMÉNISTAN	REMM	1988
<i>C. (A.) motoensis</i>	Orientale	CHINE	LEE	1978
<i>C. (A.) nudipalpis</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) nudipalpis</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) nudipalpis</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) nujiangensis</i>	Orientale	CHINE	LIU	1990
<i>C. (A.) nupurius</i>	Orientale	JAPON	KANASUGI & KITAOKA	2001
<i>C. (A.) obscurus</i>	Australienne	AUSTRALIE	DYCE, BELLIS & MULLER	2007
<i>C. (A.) obscurus</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	TOKUNAGA & MURACHI	1959
<i>C. (A.) obscurus</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) obscurus</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) obscurus</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) obscurus</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	REMM	1988
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Paléarctique	ALGÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Paléarctique	ESPAGNE	REMM	1988
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Paléarctique	EUROPE	REMM	1988
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Paléarctique	MAROC	REMM	1988
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Paléarctique	RUSSIE	REMM	1988
<i>C. (A.) obsoletus</i>	Paléarctique	TURQUIE	REMM	1988
<i>C. (A.) orientalis</i>	Australienne	ILES SALOMON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	INDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orientalis</i>	Orientale	VIËT NAM	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) orjuelai</i>	Néotropicale	COLOMBIE	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) palauensis</i>	Orientale	BELAU	TOKUNAGA	1959



Espèces	Région	PAYS	AUTEURS	ANNEE
<i>C. (A.) pastus</i>	Orientale	JAPON	REMM	1988
<i>C. (A.) pastus</i>	Orientale	JAPON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) pastus</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) pastus</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) pastus</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) pechumani</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	WIRTH, DYCE & PETERSON	1985
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>	Ethiopienne	KENYA	GLICK	1990
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>	Ethiopienne	SÉNÉGAL	GLICK	1990
<i>C. (A.) pseudopallidipennis</i>	Ethiopienne	ZIMBABWE	GLICK	1990
<i>C. (A.) puracensis</i>	Néotropicale	COLOMBIE	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) pusilloides</i>	Néotropicale	BELIZE	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) pusilloides</i>	Néotropicale	GUATEMALA	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) pusilloides</i>	Néotropicale	PANAMA	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) pusillus</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) pusillus</i>	Néotropicale	ARGENTINE	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) pusillus</i>	Néotropicale	MEXIQUE	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) qionghaiensis</i>	Orientale	CHINE	YU & LIU	1990
<i>C. (A.) sanguisuga</i>	Néarctique	ÉTATS-UNIS	REMM	1988
<i>C. (A.) sanguisuga</i>	Paléarctique	RUSSIE	REMM	1988
<i>C. (A.) sanguisuga</i>	Paléarctique	SIBÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	ALGÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	AZERBAÏDJAN	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	BIÉLORUSSIE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	ESTONIE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	EUROPE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	GÉORGIE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	MAROC	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	ROYAUME-UNI	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	RUSSIE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	SIBÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) scoticus</i>	Paléarctique	UKRAINE	REMM	1988
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Orientale	CHINE	REMM	1988
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Orientale	JAPON	REMM	1988
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Paléarctique	IRAN	REMM	1988
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Paléarctique	SIBÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) sinanoensis</i>	Paléarctique	SIBÉRIE	REMM	1988
<i>C. (A.) sousa-diasi</i>	Ethiopienne	ANGOLA	CAEIRO	1961
<i>C. (A.) suarezi</i>	Néotropicale	COLOMBIE	SPINELLI	2009
<i>C. (A.) suzukii</i>	Orientale	CHINE	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) suzukii</i>	Orientale	JAPON	KITAOKA	1973
<i>C. (A.) suzukii</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	CHINE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	CHINE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	CHINE	REMM	1988
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	JAPON	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	JAPON	REMM	1988
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	RYUKYU ISLANDS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	TAÏWAN	REMM	1988
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tainanus</i>	Orientale	VIÉT NAM	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) tibetensis</i>	Orientale	CHINE	REMM	1988
<i>C. (A.) tobaensis</i>	Orientale	JAPON	REMM	1988
<i>C. (A.) tororoensis</i>	Ethiopienne	KENYA	KHAMALA & KETTLE	1971
<i>C. (A.) tororoensis</i>	Ethiopienne	OUGANDA	KHAMALA & KETTLE	1971
<i>C. (A.) tororoensis</i>	Ethiopienne	TANZANIE	KHAMALA & KETTLE	1971
<i>C. (A.) towadaensis</i>	Orientale	JAPON	OKADA	1941
<i>C. (A.) trifasciellus</i>	Ethiopienne	CONGO (RÉP DÉM)	GOETGHEBUER	1935
<i>C. (A.) trifasciellus</i>	Ethiopienne	KENYA	KHAMALA & KETTLE	1971
<i>C. (A.) trifasciellus</i>	Ethiopienne	TANZANIE	KHAMALA & KETTLE	1971

<b>Espèces</b>	<b>Région</b>	<b>PAYS</b>	<b>AUTEURS</b>	<b>ANNEE</b>
<i>C. (A.) trimaculatus</i>	Orientale	TAÏWAN	MC DONALD & LU	1972
<i>C. (A.) trimaculatus</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) tuttifrutti</i>	Ethiopienne	AFRIQUE DU SUD	MEISWINKEL, et al.	2003
<i>C. (A.) wadai</i>	Australienne	AUSTRALIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	CHINE	YU, Y.X., et al.	2005
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	INDONÉSIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	LAOS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	MALAISIE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	PHILIPPINES	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	RYUKYU ISLANDS	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	TAÏWAN	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	TAÏWAN	LIEN, et al.	1998
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	THAÏLANDE	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wadai</i>	Orientale	VIËT NAM	WIRTH & HUBERT	1989
<i>C. (A.) wandashanensis</i>	Orientale	CHINE	WANG & LIU	1999

## **Annexe 7 : Collection des ADNg disponibles**

## COLLECTION des DNAg Disponibles de Culicoides

ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>abchazicus</i>	FRANCE	FR.XY.01	JARSY	M	C. Ninio	J.C. Delécolle	201,1 / Jarsy
		FR.XY.02	JARSY	M	C. Ninio	J.C. Delécolle	201,2 / Jarsy
<i>actoni</i>	AUSTRALIE	AU.BR.04	BEATRICE HILL FARM	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, LTrap 21/08/2008
		AU.BR.05	BEATRICE HILL FARM	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, LTrap 21/08/2008
	TAÏWAN	TW.SN.01	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAIPEI COUNTY, LTrap 20-21/07/1995, spe no.1-1
		TW.SN.02	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAIPEI COUNTY, LTrap 20-21/07/1995, spe no.1-2
		TW.SN.03	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAIPEI COUNTY, LTrap 20-21/07/1995, spe no.1-3
<i>alachua</i>	ÉTATS-UNIS EST	US.LN.01	OLANTA	F	D.A. Swanson	D.A. Swanson	SOUTH CAROLINE, WOODS BAY STATE PARK, Aug 2008
<i>bolitinos</i>	AFRIQUE DU SUD	ZA.KW.01	KWAZULU-NATAL	F		K. Labuschagne	MOORIVIER, 2.2.2009
		ZA.KW.02	KWAZULU-NATAL	F		K. Labuschagne	MOORIVIER, 2.2.2009
		ZA.KW.03	KWAZULU-NATAL	F		K. Labuschagne	MOORIVIER, 2.2.2009
		ZA.KW.04	KWAZULU-NATAL	F		K. Labuschagne	MOORIVIER, 2.2.2009
		ZA.KW.05	KWAZULU-NATAL	F		K. Labuschagne	MOORIVIER, 2.2.2009
	ÉTHIOPIE	ET.RM.04	OROMYIA	F	T. Baldet		Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.05	OROMYIA	F	T. Baldet		Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.06	OROMYIA	F	T. Baldet		Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.09	OROMYIA	F	T. Baldet	B. Mathieu	Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.10	OROMYIA	F	T. Baldet	B. Mathieu	Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
	MADAGASCAR	MG.BN.04	BEANKA	F	V. Robert	B. Mathieu	4 JUIN 2010, PN5
	RÉUNION	RE.BG.01	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.BG.02	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.BG.03	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.BG.09	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 1007m, 08-09/02/2005
		RE.BG.10	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 1007m, 08-09/02/2005
		RE.BG.11	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 1007m, 08-09/02/2005
<i>boophagus</i>	PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE	PG.KR.01	KRISA	F	P. Boland	G. Bellis	SANDAUN Prov., 23 Nov 2006, LTrap
		PG.KR.02	KRISA	F	P. Boland	G. Bellis	SANDAUN Prov., 23 Nov 2006, LTrap

ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>brevipalpis</i>	AUSTRALIE	AU.KL.01	KALUMBURU	F	M. Keane	G. Bellis	WA, Light Trap, 16-19/05/07
		AU.KL.02	KALUMBURU	F	M. Keane	G. Bellis	WA, Light Trap, 16-19/05/07
		AU.KL.03	KALUMBURU	M	M. Keane	G. Bellis	WA, Light Trap, 16-19/05/07
		AU.KL.04	KALUMBURU	F	M. Keane	G. Bellis	WA, Light Trap, 16-19/05/07
		AU.KL.05	KALUMBURU	M	M. Keane	G. Bellis	WA, Light Trap, 16-19/05/07
<i>brevitarsis</i>		AU.BR.01	BEATRICE HILL FARM	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, Ligth Trap 21.02.08
		AU.BR.02	BEATRICE HILL FARM	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, Ligth Trap 21.02.08
		AU.BR.03	BEATRICE HILL FARM	M	N. Hunt	G. Bellis	NT, Ligth Trap 21.02.08
		AU.BR.08	BEATRICE HILL FARM	M	N. Hunt	G. Bellis	NT, Ligth Trap 21.02.08
		AU.BR.09	BEATRICE HILL FARM	M	N. Hunt	G. Bellis	NT, Ligth Trap 21.02.08
	VIËT NAM	VN.MC.23	MOC CHAU	M	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
<i>chiopterus</i>	FRANCE	FR.PS.28	CHAMPS SIMON	M		B. Mathieu	25-26 Mai 2009
		FR.PS.81	LOGE BAILLY	M		B. Mathieu	7-8 Avril 2009
		FR.VN.01	VENOY, LA BROSSE	M		B. Mathieu	Light Trap OVI, 6-7/04/09, site 89PL2
	RUSSIE	RU.KR.01	KARELIA	F	N. Brodskaja	N. Brodskaja	10/08/1984
		RU.KR.02	KARELIA	F	N. Brodskaja	N. Brodskaja	10/08/1984
		RU.KR.03	KARELIA	F	N. Brodskaja	N. Brodskaja	10/08/1984
<i>coarctatus</i>	BURKINA FASO	BF.BB.04	BOBO-DIOULASSO	F	F. Simard	J.C. Delécolle	
<i>dentiformis</i>	TAÏWAN	TW.FS.01	FUSHAN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	ILAN COUNTY, LTrap, 14-15 Nov 1995, spe no. 2-1
		TW.FS.02	FUSHAN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	ILAN COUNTY, LTrap, 14-15 Nov 1995, spe no. 2-2
		TW.FS.03	FUSHAN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	ILAN COUNTY, LTrap, 14-15 Nov 1995, spe no. 2-3
<i>dewulfi</i>	ESPAGNE	ES.BR.01	BARCELONE	M	N. Pagès	N. Pagès	
		ES.BR.02	BARCELONE	M	N. Pagès	N. Pagès	
		ES.BR.03	BARCELONE	M	N. Pagès	N. Pagès	
	FRANCE	FR.FN.01	FONTAINE LES VERVINS	M		B. Mathieu	Light Trap OVI, 14-15/04/09, 02PL3, Le Pont de Pierre
		FR.MN.01	MONT LE VERNOIS	M		B. Mathieu	Light Trap OVI, 14-15/04/09, 70PL1 Les Perdrix
		FR.PS.68	VILLERS LE TOURNEUR	M		B. Mathieu	Le Château, 20-21 Juillet 2009
<i>fulvus</i>	AUSTRALIE	AU.BR.06	BEATRICE HILL FARM	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, LTrap 21 Feb 2008
		AU.BR.07	BEATRICE HILL FARM	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, LTrap 21 Feb 2008



ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>fulvus</i>	VIÊT NAM	VN.MC.09	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON'LA, 30-01/09/2010
		VN.MC.10	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON'LA, 30-01/09/2010
		VN.MC.11	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON'LA, 30-01/09/2010
		VN.MC.17	MOC CHAU	M	Le Duc Do	B. Mathieu	SON'LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.24	MOC CHAU	M	Le Duc Do	B. Mathieu	SON'LA, 30-31/08/2010
<i>grahamii</i>	RÉUNION	RE.BG.04	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.BG.05	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.CL.01	CILAOS	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	Bras sec, alt. 1256 m, 31-01/04/05, ref1F12 Gontran PL2
		RE.SR.01	SAINT PIERRE	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C4/PL1Tr, Montvert les Hauts, alt 871m, 21-22/02/2005
		RE.SR.02	SAINT PIERRE	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C4/PL1Tr, Montvert les Hauts, alt 871m, 21-22/02/2005
		RE.SR.03	SAINT PIERRE	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C4/PL1Tr, Montvert les Hauts, alt 871m, 21-22/02/2005
<i>gulbenkiani</i>	AFRIQUE DU SUD	ZA.GR.01	GEORGE	F		K. Labuschagne	Western Cap, 04/04/08
		ZA.GR.02	GEORGE	F		K. Labuschagne	Western Cap, 04/04/08
		ZA.GR.03	GEORGE	F		K. Labuschagne	Western Cap, 04/04/08
		ZA.GR.04	GEORGE	F		K. Labuschagne	Western Cap, 04/04/08
		ZA.GR.05	GEORGE	F		K. Labuschagne	Western Cap, 04/04/08
<i>Imicola</i>		ZA.PR.01	PRETORIA	F		K. Labuschagne	ONDERSTEPOORT, VASTFONTEIN, 16-17 Feb 2008
		ZA.PR.02	PRETORIA	F		K. Labuschagne	ONDERSTEPOORT, VASTFONTEIN, 16-17 Feb 2008
		ZA.PR.03	PRETORIA	F		K. Labuschagne	ONDERSTEPOORT, VASTFONTEIN, 16-17 Feb 2008
		ZA.PR.04	PRETORIA	F		K. Labuschagne	ONDERSTEPOORT, VASTFONTEIN, 16-17 Feb 2008
		ZA.PR.05	PRETORIA	F		K. Labuschagne	ONDERSTEPOORT, VASTFONTEIN, 16-17 Feb 2008
	ALGÉRIE	DZ.BZ.01	BEN AZZOUZ	F	M. Djerbal	J.C. Delécolle	Wilaya de Skikda, Commune de Ben Azzouz
		DZ.BZ.02	BEN AZZOUZ	F	M. Djerbal	J.C. Delécolle	Wilaya de Skikda, Commune de Ben Azzouz
		DZ.BZ.03	BEN AZZOUZ	F	M. Djerbal	J.C. Delécolle	Wilaya de Skikda, Commune de Ben Azzouz
		DZ.BZ.04	BEN AZZOUZ	F	M. Djerbal	J.C. Delécolle	Wilaya de Skikda, Commune de Ben Azzouz
		DZ.BZ.05	BEN AZZOUZ	F	M. Djerbal	J.C. Delécolle	Wilaya de Skikda, Commune de Ben Azzouz
	BÉNIN	BJ.TR.04	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.05	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.06	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009

ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>Imicola</i>	BÉNIN	BJ.TR.07	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.12	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
	BURKINA FASO	BF.BB.03	BOBO-DIOULASSO	F	F. Simard	B. Mathieu	
	CAMEROUN	CM.GB.01	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Lanavet, 9-10 Mai 2009
		CM.GB.02	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Lanavet, 9-10 Mai 2009
		CM.GB.03	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Lanavet, 9-10 Mai 2009
		CM.GB.04	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
		CM.GB.05	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
		CM.GB.06	GABOUA	M	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
	ÉTHIOPIE	ET.FR.01	AFAR	F	T. Baldet	B. Mathieu	Dubti, Gera, 23 Sept 2004, long 41°16'59", lat 11°34'8"
		ET.FR.02	AFAR	F	T. Baldet	B. Mathieu	Dubti, Gera, 23 Sept 2004, long 41°16'59", lat 11°34'8"
		ET.FR.03	AFAR	F	T. Baldet	B. Mathieu	Dubti, Gera, 23 Sept 2004, long 41°16'59", lat 11°34'8"
		ET.FR.04	AFAR	F	T. Baldet	B. Mathieu	Dubti, Gera, 23 Sept 2004, long 41°16'59", lat 11°34'8"
		ET.FR.05	AFAR	M	T. Baldet	B. Mathieu	Dubti, Gera, 23 Sept 2004, long 41°16'59", lat 11°34'8"
		ET.RM.01	OROMYIA	F	T. Baldet	B. Mathieu	Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.02	OROMYIA	F	T. Baldet	B. Mathieu	Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.03	OROMYIA	F	T. Baldet	B. Mathieu	Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.07	OROMYIA	F	T. Baldet	B. Mathieu	Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		ET.RM.08	OROMYIA	M	T. Baldet	B. Mathieu	Light Trap 17/09/04, West Harargue, Kuri PA12
		FR.PS.22	OROMYIA	F	T. Baldet	B. Mathieu	West Harargue, Kuni, PA12, 19 Sept 2004
	FRANCE	FR.PS.17	FIGARI	F		B. Mathieu	18-19 Juin 2008
		FR.PS.18	FIGARI	F		B. Mathieu	18-19 Juin 2008
		FR.PS.19	FIGARI	F		B. Mathieu	18-19 Juin 2008
		FR.PS.20	FIGARI	F		B. Mathieu	18-19 Juin 2008, spécimen atypique
		FR.PS.21	ROQUEBRUNE S/ ARGENS	F	B. Mathieu	B. Mathieu	L'Orme, 28-29 Sept 2006
		FR.RQ.01	ROQUEBRUNE S/ ARGENS	F	B. Mathieu	B. Mathieu	L'Orme, 28-29 Sept 2006
		FR.RQ.02	ROQUEBRUNE S/ ARGENS	F	B. Mathieu	B. Mathieu	L'Orme, 28-29 Sept 2006
	MADAGASCAR	MG.BN.01	BEANKA	F	V. Robert	B. Mathieu	4 JUIN 2010, PN5
		MG.BN.02	BEANKA	F	V. Robert	B. Mathieu	4 JUIN 2010, PN5



ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>imicola</i>	MADAGASCAR	MG.BN.03	BEANKA	F	V. Robert	B. Mathieu	4 JUIN 2010, PN5
		MG.BN.08	BEANKA	F	V. Robert	B. Mathieu	4 JUIN 2010, UV3
		MG.BN.09	BEANKA	F	V. Robert	B. Mathieu	4 JUIN 2010, UV3
	MAURICE	MU.MD.01	MEDINE	F	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	Ouest (Yemen) 24 Juillet 2007
		MU.MD.02	MEDINE	F	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	Ouest (Yemen) 24 Juillet 2007
		MU.MD.03	MEDINE	F	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	Ouest (Yemen) 24 Juillet 2007
		MU.MD.04	MEDINE	F	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	Ouest (Yemen) 24 Juillet 2007
		MU.PS.23	BAIE DU CAP	F	F. Biteau-Coroller	J.C. Delécolle	Sud-Ouest, 28 Juillet 2007
	RÉUNION	RE.SP.01	SAINT PAUL	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF5/PL4, L'Hermitage, alt 22m, 06-07/03/2005
		RE.SP.02	SAINT PAUL	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF5/PL4, L'Hermitage, alt 22m, 06-07/03/2005
		RE.SP.03	SAINT PAUL	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF5/PL4, L'Hermitage, alt 22m, 06-07/03/2005
		RE.SP.04	SAINT PAUL	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF5/PL4, L'Hermitage, alt 22m, 06-07/03/2005
		RE.SP.05	SAINT PAUL	M	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF5/PL4, L'Hermitage, alt 22m, 06-07/03/2005
<i>jacobsoni</i>	TAÏWAN	TW.SN.04	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAPEI COUNTY, LTrap, 10-11 Aug 1995, spe no. 3-1
		TW.SN.05	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAPEI COUNTY, LTrap, 10-11 Aug 1995, spe no. 3-2
		TW.SN.06	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAPEI COUNTY, LTrap, 10-11 Aug 1995, spe no. 3-3
	VIÊT NAM	VN.MC.01	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.02	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.03	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.18	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.19	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.20	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.21	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.22	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
<i>kanagai</i>	AFRIQUE DU SUD	ZA.KR.07	KRUGER NATIONAL PARK	F		K. Labuschagne	STAKAZA, 12 May 2008
<i>kibatiensis</i>	RÉUNION	RE.BG.06	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.BG.07	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.BG.08	LE TAMPON	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	C2/PL7 Tr Bras creux alt. 910m, 21-22/06/2005
		RE.SL.01	SAINT LEU	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF3/PL2, La Chaloupe, alt 687m, 03-04/2005



ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>kibatiensis</i>	RÉUNION	RE.SL.02	SAINT LEU	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF3/PL2, La Chaloupe, alt 687m, 03-04/2005
		RE.SL.03	SAINT LEU	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF3/PL2, La Chaloupe, alt 687m, 03-04/2005
		RE.SL.04	SAINT LEU	F	A. Desvard	J.C. Delécolle	IF3/PL2, La Chaloupe, alt 687m, 03-04/2005
<i>longipennis</i>	KAZAKHSTAN	KZ.SH.26	SHYMKENT	F	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°17, Emergence le 24 Mar. 2009
		KZ.SH.27	SHYMKENT	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°17, Emergence le 24 Mar. 2009
<i>loxodontis</i>	AFRIQUE DU SUD	ZA.KR.01	KRUGER	F		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.02	KRUGER	F		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.03	KRUGER	F		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.11	KRUGER	F		K. Labuschagne	Kruger National Park, Skukuza, 12/05/08
<i>mlombo</i>	BÉNIN	BJ.TR.01	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Hekandji Light Trap 05/05/09
		BJ.TR.02	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Hekandji Light Trap 05/05/09
		BJ.TR.03	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Hekandji Light Trap 05/05/09
		BJ.TR.08	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.09	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.10	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.11	TORI-BOSSITO	M	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
	BOTSWANA	BW.MC.01	MAUN	F		K. Labuschagne	19/03/97
		BW.MC.02	MAUN	F		K. Labuschagne	19/03/97
		BW.MC.03	MAUN	F		K. Labuschagne	19/03/97
		BW.MC.04	MAUN	F		K. Labuschagne	19/03/97
		BW.MC.05	MAUN	F		K. Labuschagne	19/03/97
	BURKINA FASO	BF.BB.01	BOBO-DIOULASSO	F	F. Simard	B. Mathieu	
	CAMEROUN	CM.GB.07	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
		CM.GB.08	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
		CM.GB.09	GABOUA	F	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
		CM.GB.10	GABOUA	M	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
		CM.GB.11	GABOUA	M	C. Cêtre-Sossah	B. Mathieu	Maison Djamal, 14-15 Mai 2009
	MADAGASCAR	MG.BN.05	BEANKA	M	V. Robert	B. Mathieu	4 JUIN 2010, DG4
		MG.NR.02	ANORANA	F	L. Tantely	B. Mathieu	Juillet 2010, Anorava

ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>miombo</i>	MADAGASCAR	MG.NR.03	ANORANA	F	L. Tantely	B. Mathieu	Juillet 2010, Anorava
		MG.NR.04	ANORANA	M	L. Tantely	B. Mathieu	Juillet 2010, Anorava
		MG.XX.01	XX	F	L. Tantely	B. Mathieu	Fev 2010, coll. Luciana/Tata, cerato VA ?
<i>montanus</i>	ALGÉRIE	DZ.TZ.01	TIZI-OUZOU	F	M. Djerbal	J.C. Delécolle	2007, Tube 2
	FRANCE	FR.PS.29	CARGESE	F		J.C. Delécolle	17-17 Sept 2008
		FR.XX.01	CARGESE	F		J.C. Delécolle	17-18/08/2004
		FR.XX.02	FOZZANO	F		J.C. Delécolle	17-18/06/2005
		FR.XX.03	FOZZANO	F		J.C. Delécolle	17-18/06/2005
	ITALIE	IT.LG.01	ALGHERO	F		J.C. Delécolle	SARDEIGNE
		IT.LG.02	ALGHERO	F		J.C. Delécolle	SARDEIGNE
		IT.LG.03	ALGHERO	F		J.C. Delécolle	SARDEIGNE
<i>nudipalpis</i>	TAÏWAN	TW.KN.01	KINMEN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	HSIKUOSHAN, LTrap, 19-20 Sept. 1995, spe no. 5-1
		TW.KN.02	KINMEN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	HSIKUOSHAN, LTrap, 19-20 Sept. 1995, spe no. 5-2
		TW.KN.03	KINMEN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	HSIKUOSHAN, LTrap, 19-20 Sept. 1995, spe no. 5-3
<i>obscurus</i>	AUSTRALIE	AU.MN.01	MANINGRIDA	F	J. Anderson	G. Bellis	NT, 21 Oct. 2008
		AU.MN.02	MANINGRIDA	F	J. Anderson	G. Bellis	NT, 21 Oct. 2008
		AU.MN.03	MANINGRIDA	F	J. Anderson	G. Bellis	NT, 21 Oct. 2008
<i>obsoletus</i>	ALGÉRIE	FR.PS.25	SOUK AKRAS	M		J.C. Delécolle	2007, tube 14, "tacheté"
	ESPAGNE	ES.BR.04	BARCELONE	M	N. Pagès	N. Pagès	
		ES.BR.05	BARCELONE	M	N. Pagès	N. Pagès	
	ÉTATS-UNIS EST	US.PC.01	PICKENS	F	D. Swanson	D. Swanson	SOUTH CAROLINA, 8 Aug. 2007, CDC Trap #3
	FRANCE	FR.PS.06	Ardennes - Brognon	M		B. Mathieu	
		FR.PS.07	BROGNON	M		B. Mathieu	25-26 Mai 2009
		FR.PS.08	BROGNON	M		B. Mathieu	25-26 Mai 2009
		FR.PS.09	BROGNON	M		B. Mathieu	25-26 Mai 2009
		FR.PS.24	FIGARI	M		B. Mathieu	14-15 Sept 2009
		FR.PS.69	RUBROUCK	M		B. Mathieu	21-22 Juillet 2009
		FR.PS.71	NUNCQ	M		B. Mathieu	21-22 Avril 2009
		FR.PS.73	ERCOURT	M		B. Mathieu	14-15 Avril 2009

ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>obsoletus</i>	FRANCE	FR.PS.75	NUNCQ	M		B. Mathieu	6-7 Avril 2009
	GRÈCE	GR.RH.01	RHODES	F		B. Mathieu	28/08/2002
		GR.RH.02	RHODES	F		B. Mathieu	28/08/2002
		GR.RH.03	RHODES	F		B. Mathieu	28/08/2002
	NORVÈGE	NO.XX.01		M	F. Schaffner	B. Mathieu	
		NO.XX.02		F	F. Schaffner	B. Mathieu	
	RUSSIE	RU.PS.01	PSKOV	F	N. Brodskaja	N. Brodskaja	23/06/1990
		RU.PS.02	PSKOV	F	N. Brodskaja	N. Brodskaja	23/06/1990
		RU.PS.03	PSKOV	F	N. Brodskaja	N. Brodskaja	23/06/1990
	<i>orientalis</i>	TAÏWAN	TW.FS.04	FUSHAN	F	J.C. Lien	J.C. Lien
TW.FS.05			FUSHAN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	ILAN COUNTY, LTrap, 14-15 Nov. 1995, spe no. 6-2
TW.FS.06			FUSHAN	F	J.C. Lien	J.C. Lien	ILAN COUNTY, LTrap, 14-15 Nov. 1995, spe no. 6-3
VIËT NAM		VN.MC.04	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.05	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.06	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.08	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-01/09/2010
		VN.MC.12	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.13	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.14	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.15	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.16	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.25	MOC CHAU	M	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.26	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.27	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.28	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
		VN.MC.29	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010
VN.MC.30	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-31/08/2010		
<i>oxystoma</i>	KAZAKHSTAN	KZ.SH.17	SHYMKENT	F	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°15, Emergence le 11 Dec. 2008
		KZ.SH.18	SHYMKENT	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°15, Emergence le 11 Dec. 2008



ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>pseudopallidipennis</i>	BÉNIN	BJ.TR.13	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.14	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.15	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.16	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
		BJ.TR.17	TORI-BOSSITO	F	T. Baldet	B. Mathieu	Mangueire, 28 Avril 2009
<i>pusillus</i>	GUADELOUPE	GP.SL.01	SAINT LOUIS	F		J.C. Delécolle	MG 971, PL18-4, Belleneroupe 30-31/10/2006
		GP.SL.02	SAINT LOUIS	F		J.C. Delécolle	MG 971, PL18-4, Belleneroupe 30-31/10/2006
		GP.SL.03	SAINT LOUIS	M		J.C. Delécolle	MG 971, PL18-4, Belleneroupe 30-31/10/2006
	GUYANE FRANÇAISE	GF.MC.01	MACOURIA	F	I. Dusfour	B. Mathieu	CESAREE JUIN-JUILLET 2010
		GF.MC.02	MACOURIA	F	I. Dusfour	B. Mathieu	CESAREE JUIN-JUILLET 2010
		GF.MC.03	MACOURIA	F	I. Dusfour	B. Mathieu	CESAREE JUIN-JUILLET 2010
<i>riethi</i>	FRANCE	FR.PS.90		F		B. Mathieu	
<i>saevus</i>	ALGÉRIE	FR.PS.76	NAAMA KSAR	F		J.C. Delécolle	Tube n°35, 13 Juin 2009
<i>sahariensis</i>	KAZAKHSTAN	KZ.SH.19	SHYMKENT	F	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°15, Emergence le 11 Dec. 2008
		KZ.SH.20	SHYMKENT	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°15, Emergence le 11 Dec. 2008
		KZ.SH.22	SHYMKENT	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°18, Emergence le 2 Jan. 2009
		KZ.SH.24	SHYMKENT	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°17, Emergence le 24 Mar. 2009
<i>sanguisuga</i>	ÉTATS-UNIS EST	US.RC.01	RICHLAND	F	D. Swanson	D. Swanson	SOUTH CAROLINA, 5 May 2009, CDC Trap #15
		US.RC.02	RICHLAND	F	D. Swanson	D. Swanson	SOUTH CAROLINA, 5 May 2009, CDC Trap #15
<i>scoticus</i>	ESPAGNE	ES.BR.06	BARCELONE	M	N. Pagès	N. Pagès	
		ES.BR.07	BARCELONE	M	N. Pagès	N. Pagès	
	FRANCE	FR.PS.70	RUBROUCK	M		B. Mathieu	21-22 Juillet 2009
		FR.PS.72	NUNCQ	M		B. Mathieu	21-22 Avril 2009
		FR.PS.74	ERCOURT	M		B. Mathieu	14-15 Avril 2009
	NORVÈGE	NO.XX.03		F	F. Schaffner	B. Mathieu	
	RUSSIE	RU.PS.04	PSKOV	M	N. Brodskaia	N. Brodskaia	23/06/1990
		RU.PS.05	PSKOV	F	N. Brodskaia	N. Brodskaia	23/06/1990
		RU.PS.06	PSKOV	F	N. Brodskaia	N. Brodskaia	23/06/1990
<i>shaklawensis</i>	KAZAKHSTAN	KZ.ZH.11	ZHAMBYL	F	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°3, Emergence le 1 Dec. 2008

ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>shaklawensis</i>	KAZAKHSTAN	KZ.ZH.12	ZHAMBYL	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°3, Emergence le 1 Dec. 2008
<i>similis</i>	BURKINA FASO	BF.BB.05	BOBO-DIOULASSO	F	F. Simard	J.C. Delécolle	
<i>sinanoensis</i>	RUSSIE	RU.XX.01	USSURIISK	F	V. Glukhova	V. Glukhova	collecté le 13 Juin 1973
		RU.XX.02	USSURIISK	F	V. Glukhova	V. Glukhova	collecté le 13 Juin 1973
		RU.XX.03	USSURIISK	F	V. Glukhova	V. Glukhova	collecté le 13 Juin 1973
		RU.XX.04	USSURIISK	F	V. Glukhova	V. Glukhova	collecté le 13 Juin 1973
		RU.XX.05	USSURIISK	F	V. Glukhova	V. Glukhova	collecté le 13 Juin 1973
		RU.XX.06	USSURIISK	F	V. Glukhova	V. Glukhova	collecté le 13 Juin 1973
<i>sp.</i>	BURKINA FASO	BF.BB.02	BOBO-DIOULASSO	F	F. Simard		
	GABON	GA.LK.01	LA LEKEDI		N. Rahola/C. Paupy		Tube 3, P4, Mirador, 13 Nov. 2010
		GA.LK.02	LA LEKEDI		N. Rahola/C. Paupy		Tube 3, P4, Mirador, 13 Nov. 2010
		GA.LK.03	LA LEKEDI		N. Rahola/C. Paupy		Tube 3, P4, Mirador, 13 Nov. 2010
		GA.LK.04	LA LEKEDI		N. Rahola/C. Paupy		Tube 3, P4, Mirador, 13 Nov. 2010
		GA.LK.05	LA LEKEDI		N. Rahola/C. Paupy		Tube 2, Pont suspendu, Nov. 2010
		GA.LK.06	LA LEKEDI		N. Rahola/C. Paupy		Tube 2, Pont suspendu, Nov. 2010
		GA.LK.07	LA LEKEDI		N. Rahola/C. Paupy		Tube 1, tous pièges confondus, 13 Nov. 2010
		GA.LK.08	LA LEKEDI		C. Paupy		Tube 1, tous pièges confondus, 13 Nov. 2010
		GA.LK.09	LA LEKEDI		C. Paupy		Tube 1, tous pièges confondus, 13 Nov. 2010
	KAZAKHSTAN	KZ.SH.21	SHYMKENT	F	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°18, Emergence le 2 Jan. 2009
		KZ.SH.23	SHYMKENT	F	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°18, Emergence le 2 Jan. 2009
		KZ.SH.25	SHYMKENT	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°17, Emergence le 24 Mar. 2009
		KZ.SH.28	SHYMKENT	M	A. Przhiboro	B. Mathieu	Vial n°17, Emergence le 24 Mar. 2009
	MADAGASCAR	MG.BN.06	BEANKA	F	V. Robert		4 JUIN 2010, 1+2+3 DQ
		MG.BN.07	BEANKA	M	V. Robert		4 JUIN 2010, 1+2+3 DQ
		MG.NR.01	ANORANA	F	L. Tantely		Juillet 2010, Anorava
		MG.XX.02	XX	F	L. Tantely		Fev 2010, coll. Luciana/Tata, cerato VA ?
		MG.XX.03	XX	M	L. Tantely		Fev 2010, coll. Luciana/Tata, cerato VA ?
<i>suzukii</i>	VIËT NAM	VN.MC.07	MOC CHAU	F	Le Duc Do	B. Mathieu	SON LA, 30-01/09/2010
<i>tainanus</i>	TAÏWAN	TW.SN.07	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAPEI COUNTY, LTrap, 31 Aug.-01 Sept. 1995, spe no.4-1

ESPECES	PAYS	TUBE/LAME	LIEU	SEXE	COLLECTEUR	DETERMINATION	OBSERVATIONS:
<i>tainanus</i>	TAÏWAN	TW.SN.08	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAPEI COUNTY, LTrap, 31 Aug.-01 Sept. 1995, spe no.4-2
		TW.SN.09	SANSHIA	F	M.H. Weng	J.C. Lien	TAPEI COUNTY, LTrap, 31 Aug.-01 Sept. 1995, spe no.4-3
<i>tororoensis</i>	AFRIQUE DU SUD	ZA.KR.04	KRUGER	F		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.05	KRUGER	F		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.06	KRUGER	M		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.08	KRUGER	F		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.09	KRUGER	M		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
		ZA.KR.10	KRUGER	M		K. Labuschagne	Kruger National Park, 12/05/08
<i>tutti frutti</i>		ZA.PR.06	PRETORIA	F		K. Labuschagne	ONDERSTEPSPOORT, Vastfontein, 2-3 Feb. 2009
<i>wadai</i>	AUSTRALIE	AU.DG.01	DOUGLAS DALY RS	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, LTrap, 21 Mar. 2007
		AU.DG.02	DOUGLAS DALY RS	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, LTrap, 21 Mar. 2007
		AU.DG.03	DOUGLAS DALY RS	F	N. Hunt	G. Bellis	NT, LTrap, 21 Mar. 2007

300

DNag de spécimen en collection

## **Annexe 8 : Liste des amorces testées, conditions d'amplification et notes pour l'amplification de *Culicoides***

*Les séquences des amorces données ici sont écrites par convention dans le sens 5' vers 3'.*

### **ADN ribosomal (ADNr)**

#### **ITS1-5.8S-ITS2**

Amorces *PanCulF* et 28SR

PanCulF : GTAGGTGAACCTGCGGAAGG (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004)

28SR : ATTTGGGGGTAGTCACACAT (Gomulski *et al.*, 2005)

Volume réactionnel de 50µl : Tp10X, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 250µM de chaque dATP, dTTP, dCTP et dGTP, 1µM de chaque amorce et 2,5U de *Taq*DNA polymérase Hot Start (Qiagen, USA).

5µl de matrice ADN sont ajoutés.

Conditions : 95°C pendant 15', 40 cycles [94°C, 30'' ; 54°C, 1' ; 72°C, 1'], élongation finale 72°C pendant 20'.

Notes : Ce couple d'amorces fonctionne bien. Le séquençage à partir de produits PCR ne permet pas d'obtenir des chromatogrammes nets. Des essais d'amélioration pour l'amplification et le séquençage de chacun des ITS (ITS1 et ITS2 séparément) n'ont pas donné de meilleurs résultats. Une étape de clonage en plasmides a été nécessaire.

Amorces ITS5 et ITS28TC

ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (Matsumoto *et al.*, 2009a)

ITS28TC : TGCTTAAATTTTCAGGGGGT (Matsumoto *et al.*, 2009a)

Ce couple d'amorces est testé en suivant les conditions PCR des auteurs.

Sur 27 spécimens d'*Avaritia* testées, seuls 4 ont été amplifiés contre 19 avec le couple d'amorces précédentes. Le séquençage des 4 spécimens n'a pas permis l'obtention de chromatogrammes exploitables.

## Domaine D3 de l'ADNr

Amorces D3a et D3b

D3a : GACCCGTCTTGAAACACGGA (Litvaitis *et al.*, 1994)

D3b : TCGGAAGGAACCAGCTACTA (Litvaitis *et al.*, 1994)

Volume réactionnel de 50µl : Tp10X, 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 250µM de chaque dATP, dTTP, dCTP et dGTP, 1µM de chaque amorce et 2,5U de *Taq*DNA polymérase Hot Start (Qiagen, USA).

2µl de matrice ADN sont ajoutés.

Conditions : 95°C pendant 15', 40 cycles [94°C, 1' ; 54°C, 1' ; 72°C, 1'], élongation finale 72°C pendant 7'.

Notes : Tous les spécimens testés ont été amplifiés avec succès. Cette région est très conservée et source de peu de polymorphisme, elle a donc été écartée pour notre travail. Cette région peut être utilisée en tant que contrôle positif d'extraction d'ADNg.

## ADN mitochondrial (ADN mt)

Pour l'amplification des trois régions moléculaires ciblées sur l'ADN mitochondrial (ADN mt), des programmes d'amplification de PCR conventionnelle i.e. une seule température d'hybridation, en *touch-down* i.e. avec diminution de la température à chaque cycle, et en *touch-up* i.e. avec augmentation de la température à chaque cycle ont été utilisés. Ici est donné uniquement la programme *touch-up* qui s'est avéré être le plus efficace. Une PCR nichée est testée, elle est décrite ci-dessous pour les spécimens pour lesquels la première amplification a échoué.

## COI

PCR *touch-up*, Amorces C1J1718 et C1N2191

C1J1718 : GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT (Dallas *et al.*, 2003)

C1N2191 : CAGGTAAAATTTAAAATATAAACTTCTGG (Dallas *et al.*, 2003)

Volume réactionnel 50µl : Tp10X, 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 250µM de chaque dATP, dTTP, dCTP et dGTP, 1µM de chaque amorce et 2,5U de *Taq*DNA polymérase Hot Start (Qiagen, USA).



5µl de matrice ADN sont ajoutés.

Programme touch-up : 95°C pendant 15', 5 cycles [94°C, 40'' ; 45°C, 40'' ; 72°C, 1'], suivis de 45 cycles [94°C, 40'' ; 50°C, 40'' ; 72°C, 1'], élongation finale 72°C pendant 7'.

Notes : 86% des spécimens (n=190) ont pu être amplifiés dans ces conditions et le séquençage directement à partir de produits PCR sans clonage a donné de bons résultats. L'amplification du COI pour les spécimens négatifs avec cette PCR, est testée à partir d'autres amorces en PCR conventionnelle et en PCR nichée.

PCR nichée, Amorces C1J1709 et C1N2776 et 2<sup>nde</sup> PCR avec C1J1718 et C1N2191.

C1J1709 : AATTGGWGGWTTYGGAAAYTG (Simon *et al.*, 2006)

C1N2776 : GGTAATCAGAGTATCGWCGNGG (Simon *et al.*, 2006)

Même volume réactionnel et même programme *touch-up* que précédemment.

Notes : A l'issue de la 1<sup>ère</sup> PCR (C1J1709/ C1N2776) avec un programme *touch-up* identique au précédent, la migration sur gel d'agarose à 2% n'a révélé aucune amplification. Le produit PCR restant, non déposé, est dilué au 1/10<sup>ème</sup> avant utilisation de 2µl en tant que matrice pour la 2<sup>nde</sup> PCR (C1J1718/C1N2191). Cette technique a permis d'amplifier environ 75% (n=59) de négatifs de la PCR *touch-up* (C1J1718/C1N2191).

En parallèle, un second couple d'amorces a été testé à partir du produit de la première étape de la PCR nichée : TYJ1460 et C1N2329. Ce couple n'a pas permis d'amplification ni à l'issue de la 1<sup>ère</sup> étape de la PCR nichée ni à l'issue de la seconde (C1J1718/C1N2191).

TYJ1460 : TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC (Simon *et al.*, 1994)

C1N2329 : ACTGTAAATATATGATGAGCTCA (Simon *et al.*, 1994)

## **COII**

*Les amorces dessinées dans le cadre de cette étude sont nommées selon la nomenclature proposée par Simon et al. (1994).*

PCR *touch-up*, Amorces C2J3103 et C2N3665

C2J3103 : ATGGCAACTTGAGGAMATAT (cette étude)

C2N3665 : CGCAGATTTCTGAACATTG modifié à partir de (Beckenbach et Borkent, 2003)

Volume réactionnel 50µl : Tp10X, 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 250µM de chaque dATP, dTTP, dCTP et dGTP, 1µM de chaque amorce et 2,5U de *Taq*DNA polymérase Hot Start (Qiagen, USA).

5µl de matrice ADN sont ajoutés.

Programme touch-up : 95°C pendant 15', 5 cycles [94°C, 40'' ; 45°C, 40'' ; 72°C, 1'], suivis de 45 cycles [94°C, 40'' ; 50°C, 40'' ; 72°C, 1'], élongation finale 72°C pendant 7'.

Notes : 62% des spécimens (n=190) ont pu être amplifiés dans ces conditions et le séquençage directement à partir de produits PCR sans clonage a donné, comme pour le COI, de bons résultats. L'amplification du COII pour les spécimens négatifs avec cette PCR, est testée avec d'autres amorces en PCR conventionnelle et en PCR nichée.

PCR nichée, Amorces TL2J3033 et TKN3796 et 2<sup>nde</sup> PCR avec C2J3103 et C2N3665

TL2J3033 : TCTAATATGGCAGATTAGTGCA (Simon *et al.*, 2006)

TKN3796 : ACTATTAGATGGTTTAAGAG (Simon *et al.*, 2006)

Même volume réactionnel et même programme *touch-up* que précédemment.

Notes : A l'issue de la 1<sup>ère</sup> PCR (TL2J3033/ TKN3796) avec un programme *touch-up* identique au précédent, la migration sur gel d'agarose à 2% n'a révélé aucune amplification. Le produit PCR restant, non déposé, est dilué au 1/10<sup>ème</sup> avant utilisation de 2µl en tant que matrice pour la 2<sup>nde</sup> PCR (C2J3103/ C2N3665). Cette technique a permis d'amplifier environ 15% (n=78) de négatifs de la PCR *touch-up* (C1J1718/C1N2191).

## **Cytb**

*Les amorces dessinées dans le cadre de cette étude sont nommées selon la nomenclature proposée par Simon et al. (1994).*

PCR *touch-up*, Amorces CBJ10906 et CBN11387

CBJ10906 : ATAGGAACTGCTTTTATAGG (cette étude)

CBN11387 : CAATAGATATGACTAAAGCGATTACT (cette étude)

Volume réactionnel 50µl : Tp10X, 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 250µM de chaque dATP, dTTP, dCTP et dGTP, 1µM de chaque amorce et 2,5U de *Taq*DNA polymérase Hot Start (Qiagen, USA).

5µl de matrice ADN sont ajoutés.

Programme touch-up : 95°C pendant 15', 5 cycles [94°C, 40'' ; 45°C, 40'' ; 72°C, 1'], suivis de 45 cycles [94°C, 40'' ; 50°C, 40'' ; 72°C, 1'], élévation finale 72°C pendant 7'.

Notes : 65% des spécimens (n=184) ont pu être amplifiés dans ces conditions et le séquençage directement à partir de produits PCR sans clonage a donné, comme pour le COI et le COII, de bons résultats. L'amplification du Cytb pour les spécimens négatifs avec cette PCR, est testée avec d'autres amorces en PCR conventionnelle et en PCR nichée.

PCR nichée, Amorces CBJ10621 et CBN11526 et 2<sup>nd</sup> PCR avec CBJ10906 et CBN11387

CBJ10621 : TTCAACAYRATGAAAYTTTGGWTC (Simon *et al.*, 2006)

CBN11526 : TTCTACTGGTCGRGCTCCAATYCA (Simon *et al.*, 2006)

Même volume réactionnel et même programme *touch-up* que précédemment.

Notes : A l'issue de la 1<sup>ère</sup> PCR (CBJ10621/CBN11526) avec un programme *touch-up* identique au précédent, la migration sur gel d'agarose à 2% n'a révélé aucune amplification. Le produit PCR restant, non déposé, est dilué au 1/10<sup>ème</sup> avant utilisation de 2µl en tant que matrice pour la 2<sup>nde</sup> PCR (CBJ10906/CBN11387). Cette technique a permis d'amplifier environ 32% (n=92) de négatifs de la PCR *touch-up* (CBJ10906/CBN11387).

## Annexe 9 : Matrices des pourcentages d'identité de séquences obtenus lors du criblage de marqueurs

### ITS1-5,8S-ITS2

	cataneii	circumscriptus	scoticus FRPS74	chiopterus FRPS28	obsoletus FRPS07	obsoletus FRPS73	obsoletus FRPS08	obsoletus FRPS69	obsoletus FRPS24	obsoletus FRPS71
cataneii	88	83	86	85	85	85	85	85	85	85
circumscriptus		85	88	87	88	88	88	88	88	88
scoticus FRPS74			93	94	93	94	94	94	93	93
chiopterus FRPS28				96	98	98	98	98	97	97
obsoletus FRPS07					98	98	98	98	98	98
obsoletus FRPS73						100	100	100	100	100
obsoletus FRPS08							100	100	100	100
obsoletus FRPS69								100	100	100
obsoletus FRPS24									100	100
obsoletus FRPS71										100

# D3

	saevus FRPS76	tauricus FRPS30	imicola FRPS17	chiopterus FRPS28	chiopterus FRPS81	punctatus	dewulfi FRPS68	arakawae	circumscriptus	sinanoensis RUXX06	obsoletus FRPS25	obsoletus FRPS69	obsoletus FRPS73	obsoletus FRPS71	obsoletus FRPS8	scoticus FRPS10	scoticus FRPS70	scoticus FRPS72	scoticus FRPS74	
saevus FRPS76	98	98	97	97	98	98	97	97	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	
tauricus FRPS30		97	96	96	97	98	96	96	95	95	95	95	95	95	95	95	96	96	96	
imicola FRPS17			99	99	99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	98	99	99	99	
chiopterus FRPS28				100	99	99	97	98	98	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	
chiopterus FRPS81					99	99	97	98	98	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	
punctatus						100	98	99	99	99	99	99	98	98	99	99	99	99	99	
dewulfi FRPS68							99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	
arakawae								99	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	98	
circumscriptus									99	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	
sinanoensis RUXX06										99	99	99	99	99	99	99	100	100	100	
obsoletus FRPS25											100	100	100	99	99	100	100	100	100	
obsoletus FRPS69												100	100	99	99	100	100	100	100	
obsoletus FRPS73													100	99	99	100	100	100	100	
obsoletus FRPS71														100	99	99	99	99	99	
obsoletus FRPS8															99	99	99	99	99	
scoticus FRPS10																	100	100	100	
scoticus FRPS70																		100	100	
scoticus FRPS72																			100	
scoticus FRPS74																				100

# COI

	chiopterus FRPS81	obsoletus FRPS71	obsoletus FRPS73	scoticus FRPS72	scoticus FRPS74	saevus FRPS76	imicola FRPS21	imicola FRPS17	imicola FRPS18	imicola FRPS19
chiopterus FRPS81	86	86	87	87	83	85	86	86	86	86
obsoletus FRPS71		99	89	89	84	85	85	85	85	85
obsoletus FRPS73			89	89	84	85	85	85	85	85
scoticus FRPS72				99	83	84	84	84	84	84
scoticus FRPS74					82	83	84	84	84	84
saevus FRPS76						85	84	84	84	84
imicola FRPS21							98	98	98	98
imicola FRPS17								100	100	100
imicola FRPS18									100	100
imicola FRPS19										100

# COII

	cataneii 2	chiopterus FRPS28	chiopterus FRPS81	scoticus FRPS70	scoticus FRPS72	imicola FRPS22	imicola FRPS17	imicola FRPS18	obsoletus FRPS24
cataneii 2	76	76	75	75	81	81	81	81	81
chiopterus FRPS28		100	84	84	77	78	78	78	78
chiopterus FRPS81			84	84	77	78	78	78	78
scoticus FRPS70				100	79	80	80	80	80
scoticus FRPS72					79	80	80	80	80
imicola FRPS22						98	98	98	98
imicola FRPS17							100	100	100
imicola FRPS18								100	100
obsoletus FRPS24									100

# Cytb

	arakawe	dewulfi_FRPS68	imicola_FRPS17	imicola_FRPS18	imicola_FRPS19	obsoletus_FRPS69	obsoletus_FRPS71	obsoletus_FRPS73	scoticus_FRPS72	nubeculosus2
arakawe	80	82	82	82	82	82	82	83	83	81
dewulfi_FRPS68		80	80	80	80	80	80	81	83	78
imicola_FRPS17			100	100	85	85	85	86	82	
imicola_FRPS18				100	85	85	85	87	82	
imicola_FRPS19					85	85	85	87	82	
obsoletus_FRPS69						100	98	89	81	
obsoletus_FRPS71							98	89	81	
obsoletus_FRPS73								89	82	
scoticus_FRPS72									82	
nubeculosus2										82

**Annexe 10 : Compte rendu du groupe de travail de  
taxonomie réuni à Strasbourg du 16 au 20 Mars 2009**





## Minutes of the MedReoNet taxonomy meeting Strasbourg 16-20 March 2009

### MedReoNet Workpackage 2: Regional Surveillance for vectors

#### Deliverable 2.2: Guide to the identification of *Culicoides* vectors and potential vectors present in the Mediterranean (European) basin, including molecular methods

The following people attended this session. Those in italics gave presentations:

Akaddar Aziza	IPPTS, France	<i>Aziza.Akaddar@medecine.u-strasbg.fr</i>
<i>Balenghien Thomas</i>	Cirad, France	<i>thomas.balenghien@cirad.fr</i>
Boushira Emilie	ENVT, France	<i>emilie_boushira@yahoo.fr</i>
Candolfi Ermanno	IPPTS, France	<i>ermannocandolfi@medecine.u-strasbg.fr</i>
<i>Carpenter Simon</i>	IAH, UK	<i>simon.carpenter@bbsrc.ac.uk</i>
Côrte-Real Ana Rute	FMV, Portugal	<i>anarutecreal@gmail.com</i>
<i>Delécolle Jean-Claude</i>	IPPTS, France	<i>jean-claude.delecolle@zool-ulp.u-strasbg.fr</i>
<i>De Deken Gill</i>	ITM, Belgium	<i>gdedeken@itg.be</i>
Denison Eric	IAH, UK	<i>eric.denison@bbsrc.ac.uk</i>
Di Nicola Francesca	IZS, Italy	<i>culicoides@izs.it</i>
Fonseca Isabel	FMV, Portugal	<i>ifonseca@fmv.utl.pt</i>
<i>Garros Claire</i>	Cirad, France	<i>claire.garros@cirad.fr</i>
Kirkeby Carsten	DTU, Denmark	<i>ckir@vet.dtu.dk</i>
Labuschagne Karien	OVI, South Africa	<i>labuschagneK@arc.agric.za</i>
Liennard Emmanuel	ENVT, France	<i>e.liennard@envt.fr</i>
Lucientes Javier	UNIZAR, Spain	<i>jlucien@unizar.es</i>
<i>Mathieu Bruno</i>	IPPTS, France	<i>bmathieu@unistra.fr</i>
Meireless José	FMV, Portugal	<i>jmeireles@fmv.utl.pt</i>
<i>Meiswinkel Rudy</i>	CVI, Netherlands	<i>ruwinkel@gmail.com</i>
Miranda Miguel	UIB, Spain	<i>ma.miranda@uib.es</i>
<i>Nielsen Soren Achim</i>	RU, Denmark	<i>san@ruc.dk</i>
<i>Pages Nonito</i>	CRESA, Spain	<i>nitupages@cresa.uab.cat</i>
Patakakis Mickael	KKIA, Greece	<i>mjpatakakis@gmail.com</i>
Santini Frederigo	IZS, Italia	<i>f.santini@izs.it</i>
Schaffner Francis	UZH, Switzerland	<i>Francis.Schaffner@access.uzh.ch</i>
Sghaier Soufien	IRVT, Tunisie	<i>sghaiersoufien@yahoo.fr</i>
Werner Doreen	DEI, Germany	<i>d Werner@zalf.de</i>

#### **General objective:**

To develop an identification tool to facilitate the morphological identification of Palearctic *Culicoides* species

#### **Specific objectives:**

To define consensually the taxonomic units (groups, complexes, and sibling species);

To present the first draft of the identification key (currently on French fauna);

To discuss and validate the diagnostic characters for the main Palearctic species;

The afternoon of the third day will focus on organization of standardized multicentric insecticide tests.



Chairmen: Miguel Miranda and Thomas Balenghien

## Tuesday 17th March

### Official opening and welcome (Professors Candolfi and Lude)

After the welcome introduction, Professor Candolfi (head of IPPTS) reminded the long history of *Culicoides* at the Medicine Faculty of Strasbourg. Professors Callot and Kremer gave years of work on *Culicoides*, especially on systematic and taxonomy, leaving us a huge and beautiful collection, useful for future taxonomy studies.

Currently, entomological activities on *Culicoides* are revived at the Faculty of Medicine with the come back of Jean-Claude Delécolle and the start of Bruno Mathieu's Phd on the systematic and taxonomy of the subgenus *Avaritia*.

To date, it is probably the first international meeting of people working on *Culicoides* taxonomy, (which is a difficult task). This meeting will produce fruitful exchanges to improve our understanding of systematic and to discuss on morphological and molecular tools.

After these words, Professor Lude (Dean of the Faculty of Medicine of Strasbourg) thanked the steering committee for the organization of this meeting in the Forum building of the Faculty of Medicine, and wished fruitful discussions.

### Introduction and objectives

#### M. Miranda, leader of WP2

Miranda, leader of the WP2, thanked the steering committee for the organization. Then, he reminded the objectives of the WP2 of MedReoNet project, and especially the objective of the deliverable D22 "Guide to the identification of *Culicoides* vectors and potential vectors present in the Mediterranean basin, including molecular methods".

This deliverable is subdivided in two parts. On one hand, Cirad is the coordinator of an ongoing ring trial to assess the reliability of molecular tools currently used for the identification of *Culicoides* species. On the other hand, a key for the morphological identification of *Culicoides* adults, which would be available as a freeware, is currently developed under a collaboration between IPPTS (University of Strasbourg) and Cirad, with the method used by Francis Schaffner (UZH) for the identification key of European mosquitoes.

Thus, this meeting on *Culicoides* taxonomy was organized, in Strasbourg, with Jean-Claude Delécolle and Rudy Meiswinkel as experts, to help in the development of this identification tools by:

- defining consensually the taxonomic units (group, complex, and sibling species);
- presenting the preliminary version of the key;
- discussing and validating the diagnostic characters used in the key.

Then, it was underlined the necessity to include a list of species of the European Palearctic subregion in the final report of MedReoNet, because of the lack of published fauna for most of countries and the importance to add in the identification key information on species





ecology. The importance of a two-level key (one for non-specialists as surveillance actors and one for taxonomists) was reminded.

Moreover, apart from the taxonomy meeting, the organisation of a multi-centric assay to assess the *Culicoides* susceptibility to insecticides was discussed.

### The Imicola Complex: taxonomy, ecology and biogeography

R. Meiswinkel

*Culicoides* taxonomy remains an unfinished business. For example, probably 40% of South-African species are not described, and the number of known species passed from 22 to 112 after Rudy's work. The subgenus *Avaritia* encompasses about 20 species clustered in groups and complexes. The Imicola Complex contains 6 African species: *C. imicola*, *C. kwagga*, *C. bolitinos*, *C. loxodontis*, *C. tuttifrutti*, and *C. miombo*.

Species classification is important because species from a same monophyletic group or complex may exhibit different bio-ecology such as trophic behaviours or breeding sites (moist soil exposed on sun for *C. imicola*, buffalo (or cattle) dungs for *C. bolitinos*, strictly elephant dungs for *C. loxodontis*, zebra dungs for *C. kwagga*, or rotting fruits (wild or cultivated) for *C. tuttifrutti*).

More generally, species classification can be difficult because of intra-specific morphological variations, which could or not reflect speciation event. Molecular tools could then be useful. Moreover, clear meaning of complex and group are still lacking for *Culicoides*, and some species are misclassified as *C. dewulfi* in the Obsoletus group or *C. grisescens* in the Pulicaris group. Numerous problems remain: allopatric species *C. bolitinos* and *C. brevitarsis* are virtually impossible to distinguish morphologically; European *C. montanus* may be a different species than the type from Central Asia; the taxonomic unit "subgroup", as for the Pseudopallidipennis subgroup, is probably a wrong term; it is impossible to distinguish morphologically *C. imicola* and *C. nudipalpis* (the latter species is found at the east of the Wallace line); it is not clear whether *C. pulicaris* and *C. lupicaris* are different species. Finally, in China, a huge work on *Culicoides* taxonomy is done and published, but without clear illustration, and with probably a lot of misidentification.

Conclusion (M. Miranda): it seems essential, for the morphological key under development, to add information on species ecology and to avoid subjective characters, and it could be useful to recommend a published iconography as reference.

### Systematic and taxonomy of the genus *Culicoides*, what is coming next? (Claire Garros)

C. Garros, B. Mathieu, T. Balenghien, J.C. Delécolle

Claire Garros is an entomologist who worked for 6 years on systematic and taxonomy of *Anopheles*. She has been hired at Cirad recently and her work moves towards *Culicoides*.

Based on literature and discussions with *Culicoides* taxonomists, four main problems are identified in *Culicoides* systematics: phylogenetic relationships between and within subgenera are unknown; lack of uniformity in taxonomic categories; various species-groups not yet investigated on a worldwide basis; and the entire classification has not been published



in this entirety. Molecular tools are useful to complete some lacks but they have to be used in complement of the morphology.

Indeed, some subgenera are not monophylogenetic and within some subgenera there is no clear definition of taxonomic units such as group. Then, clear meaning for group, complex and sibling species were proposed.

Moreover, numerous morphological variations were described and it is difficult to know if they are intra or inter-specific variations. To answer these questions, reference collections should be developed including both voucher specimens and sequences (cytochrome B to follow the barcoding project).

Conclusion: it is needed to review subgenera phylogeny, to develop molecular tools and morphological key, and to use more molecular markers from large populations to clarify *Culicoides* taxonomy.

#### Culicoides diversity in Belgium and some taxonomic problems

Deblauwe I., De Deken G., Madder M., De Deken R., Fassotte C., Cors R., Losson B., Paternostre J., Haubruge E. & Simonon G.

From 20 OVI traps, 1 CDC trap, 2 suction traps operated routinely in Belgium, 45 species were identified, among these 84% belonged to the *Avaritia* subgenera, 10% to *Culicoides*, and 60% to the sibling species *C. obsoletus/scoticus*.

Among these specimens, a high level of atypical form (about 5%) was recorded:

- intermediary forms between *C. circumscriptus* and *C. salinarius*, with atypical forms on wing pattern and cibarium ornamentation;
- intermediary and atypical forms in the Pulicaris group, between *C. pulicaris* and *C. punctatus*, and *C. pulicaris* and *C. lupicaris*, and numerous variations in *C. newsteadi*. With molecular markers (microarray development on DNA ITS1 region), intermediary forms could cross with *C. lupicaris*, *C. pulicaris*. Moreover, morphological variations on *C. deltus* could be associated with the same ITS1 sequence;
- atypical forms of *C. brunnicans* and *C. duddingstoni*.

Conclusion: molecular analyses of these intermediary forms are required.

#### Culicoides species from the subgenus Culicoides in Catalonia (NE Spain)

Pagès, N., Muñoz-Muñoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C. and Nuñez, J.I.

*Culicoides* identification could be based on morphology (metric traits, non metric traits, wing pattern) and molecular assays. Difficulties exist in both morphology (intra-specific variations) and molecular tools (few available sequence, lack of morpho-molecular comparison, few new PCR tools).

In Catalonia, 6 species from the subgenus *Culicoides* were identified from 10 traps: *C. punctatus*, *C. pulicaris/lupicaris*, *C. fagineus*, *C. newsteadi* and *C. flavipulicaris*. Among these, 118 were sequenced for COI gene. At least 11 species were identified from phylogenetic trees: 2 cryptic species morphologically identified as *C. pulicaris*, 3 as *C. newsteadi*, and 2 as *C. fagineus*, while the 4 remaining species were identified as *C. lupicaris*, *C. subfagineus*, *C. flavipulicaris* and *C. punctatus*. Principal component analyses of morphological metric data was useful to distinguish species within the three groups of





species having similar wing pattern. Then, some allele-specific PCR were developed to identify the 11 species.

Danish *Culicoides* species of the *Obsoletus* group identified by morphological methods  
 S. Nielsen and M. Kristensen

A method was presented to morphologically separate *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*. From field-collected individuals, hypopygium and wing for male and head, wing, and spermatheca for female were observed and species identification was obtained using DNA assay.

Differences between *C. obsoletus* and *C. scoticus* were found using the ratio of the length and width of the third segment of the palpus, the antennal ratio (sum of the lengths of the apical five segments of the the flagellum (11-15) to the sum of basal eight) and the wing length. Finally, there were few overlaps crossing the palpus ratio and the wing length.

PCR identification showed a 100% agreement between morphology and molecular identification. ITS1 sequences were slightly variable within a species (less than 1% in *C. obsoletus* and about 3% in *C. scoticus*), when differences between *C. obsoletus* and *C. scoticus* were about 5 to 7%.

Conclusion: the importance of crossing different characters is highlighted to identify species.

*Culicoides* Internet Ressources: Future Directions  
 S. Carpenter

Generally, there is a trade-off between accessibility, lifespan, funding and scientific details of web resources.

Web information on *Culicoides* is very limited. *Culicoides* are not included in projects such as Tree of life web project or Encyclopedia of life. The Ceratopogonid web page was created for specialists and, for example, it is not referenced on google. By googling *Culicoides*, IAH website appears after the wikipedia page, which is clearly unreliable. Using French as language, the two first responses of Google refer to the Cirad website on bluetongue and *Culicoides*.

IAH is developing a website ([www.culicoides.net](http://www.culicoides.net)), which allows the accessibility to species pages created by John Boorman (about 350 species), and which is subdivided into following sections: general information, taxonomy, ecology and surveillance and molecular biology. The taxonomy section will allow e-learning (especially videos), species pages, identification key and literature. In the next future, connectivity to other websites will be developed and the John Boorman's data sheets will be updated. More generally, this kind of website could be a useful tool to develop teleconferencing, to disseminate results, and to give available full insect 3-D imaging. Evaluation of this website should be based on degree of "customer" satisfaction.



### Traditional identification key

J.C. Delécolle et B. Mathieu

First, species could be divided into groups based on similar wing pattern, and then some morphological character could be used to identify specimens down species. French species could be split in 3 groups: wing without spot, with one dark spot, and the remaining species. Within the subgenus *Avaritia*, *C. chiopterus* could be identified by the eye pubescence, *C. dewulfi* by the unequal size of spermatheca, and *C. obsoletus* and *C. scoticus* could be easily differentiated as male. Moreover, *C. imicola* could show great variations in the wing pattern. Within the subgenus *Monoculicoides*, the main identification problem remains between *C. puncticollis* and *C. riethi*. Obviously, species with wing entirely clear are the most difficult to identify. Within the subgenus *Culicoides*, great variations are known within the Pulicaris group.

Conclusion: this classical dichotomic key could be considered as “has been”. In a near future, collaboration between taxonomists, computer specialists, and geneticists will allow to glimpse new tools more successful and more accurate for the identification and the classification of all *Culicoides* native from Europe or elsewhere

### Presentation of the PhD plan of Bruno Mathieu

Briefly, Bruno Mathieu presents the plan of his starting PhD entitled “systematic and taxonomic revision of the subgenus *Avaritia* with a special interest for the Obsoletus group”. The aim is to resolve phylogenetic relationships between groups and within Obsoletus group, to develop morphological and molecular tools for *Culicoides* identification, and to map the species distribution. This thesis will provide a scheme for internal classification for the subgenus *Avaritia* and tools for surveillance activities and academic research.

### Photographic and identification key to adult *Culicoides* species of the Palearctic region Mathieu B., Chavernac D. & Delécolle J.C.

The objective is to develop a comprehensive morphological key to identify males and females in the aim to have a useful tool for surveillance activities and research. Thus, the key will be multi-access and available as a freeware. For each species, an identity card will give details on taxonomy, ecology, distribution and role as a vector.

Currently 20 wing characters were defined with 2 to 5 states of character for presence, size, position, or colour. Description was made using types from collections of Callot and Kremer, and Delécolle. Characters were encoded into a database.

To date, 85 species are encoded for 20 characters on wing pattern leading to 65 states of characters described by 250 pictures. In the future, more species and other characters (from microscopy) will be included, picture database completed and the freeware delivered online.

Bruno gave a demonstration of the key. Some recommendations were made:

- avoid terms as slightly or mostly;
- show pictures for each choice in the same screen to be able to compare;
- add an optimization process;
- add the possibility to upload a personal picture library.





## Wednesday 18th March

### Resume of Tuesday talks (Thomas Balenghien)

This talk gives the opportunity to discuss about taxonomy units. It was highlighted the usefulness of the complex as a taxonomic unit. Finally, it was agreed that complex could group species for which males could be easily identified. In the 2008 EFSA report, it was advised to use Obsoletus group for *C. obsoletus*, *C. scoticus* and *C. montanus*. The term Obsoletus group should not be used instead of *Avaritia*. Moreover, it was recommended that in each published paper, the material and methods section should clearly described the identification method.

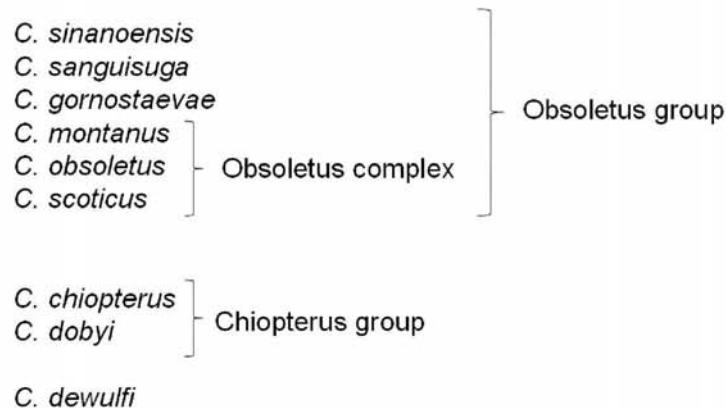
In conclusion, the following definitions were consensually adopted and must use in future papers:

Species group refers to a grouping of phylogenetically closely related species. Female diagnose is possible on wing pattern for example.

Species complex refers to a grouping of phylogenetically closely related species for which it is difficult or impossible to differentiate them as male or as female. The species belonging to a complex are called sibling species or cryptic species.

Informal group names are treated as vernacular names. Names are printed in roman type with the first letter capitalized even though the name of a nominal species is used in the combination. The oldest species gives its name to the group or complex species.

Example of definition application to the Palearctic species of the *Avaritia* subgenus:



### Round table discussion on morphological characters to be included in the identification key



## Tuesday 19th March

### Round table discussion on slides from UK for species identification

### Announcement of the 1<sup>st</sup> International meeting on *Culicoides* taxonomy

Bruno Mathieu, Jean-Claude Delécolle, and Ermanno Candolfi were glad to announce the organisation of the first international meeting on *Culicoides* taxonomy in Strasbourg in April 2010.

### WHO test applied on *Culicoides*: interest and expected results of multicentric study

R. Venail, B. Mathieu, M.L. Setier-Rio, T. Balenghien

Within the framework of MedReoNet, a multicentric assay to assess the sensibility of *Culicoides* to insecticide using WHO tubes. In complement of the exposed protocol, it was decided to maintain collected specimens during 24 hours (to avoid rapid high level of mortality), and then to perform the test placing about 50 unsorted individuals by tube. Videos of each protocol step will be provided to standardize the procedures.

Persons interested are: Roger Vénail and Marie Laure Setier-Rio (EID-Med as leader with Cirad), Simon Carpenter (IAH), Gil De Deken (ITM), Isabel Fonseca + José Meireles (FMV), Maria Goffredo (IZS to be confirmed), Karien Labuschagne (OVI), Xavier Lucientes (UNIZAR), Miguel Miranda (UIB), Nonito Pages (CRESA), Soufien Sghaier (IRVT), and Doreen Wener (DEI + FLI?).

EID-Med will provide to all a detailed protocol before June.

### Conclusions (Miguel Miranda)

Miguel Miranda reminded the general and specific objectives and emphasized that some objectives had been already reached.

As general conclusions, he highlighted:

- the need of linking morphology and molecular taxonomy;
- the agreement about the definition of group and complex terms;
- the need of effective connectivity and reliable sources of information.

Finally, he recommended:

- morphological studies combined with DNA Barcoding analysis are proposed (C. Garros will be the coordinator);
- a list of the Western Europe *Culicoides* species will be developed (J.C. Delecolle, B. Mathieu, C. Garros and R. Meiswinkel will be the coordinators);
- recommendations to authors about terminology and mat. & met. details about identification of *Culicoides* species will be given (D. Werner will be the coordinator);





- when possible, sequencing and incorporation of the sequences to Genbank is recommended;
- multicenter studies covering large scale populations for Culicoides phylogeny are suggested to be conducted (N. Pages will be the coordinator);
- intraspecific polymorphisms measured by morphometrics and molecular methods are needed (i.e. Obsoletus complex).

Simon Carpenter underlined the importance to find other source of funding because of the future end of the MedReoNet project. Frederigo Santini answered that European programs as COST (European Cooperation in Science and Technology, <http://www.cost.esf.org/>) could be used after the end of MedReoNet.

At the end, Jean-Claude warmly thanked all participants for their coming to Strasbourg.

# Annexe 11 : IIKC, documentation d'aide pour l'ouverture



IIKC - Interactive Identification Key for Palaearctic Biting Midge *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae)



## How to open IIKC?

1. Open the "Xper2" software from the desktop shortcut or alternatively with the program group "Xper2-Identification"



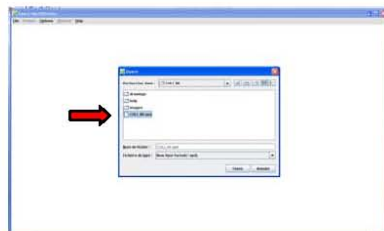
2. Select "Open a base" in the "File" menu



3. Select the folder "CULI\_IIK" on the "C:/" disk



4. Select the "CULI\_IIK.xpd" file



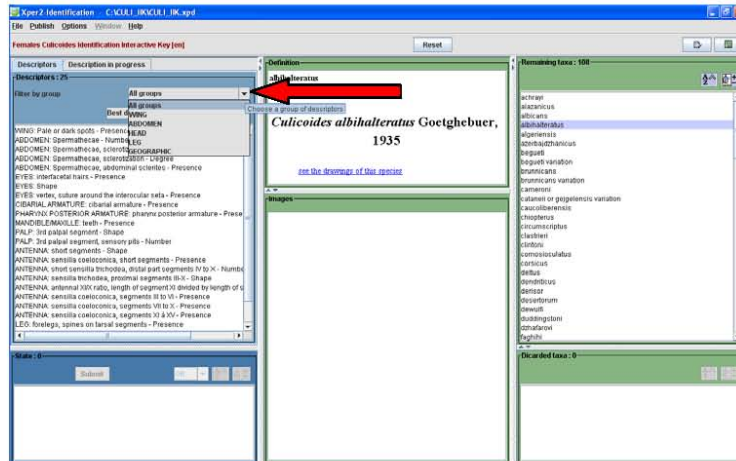
Now, the database is open!



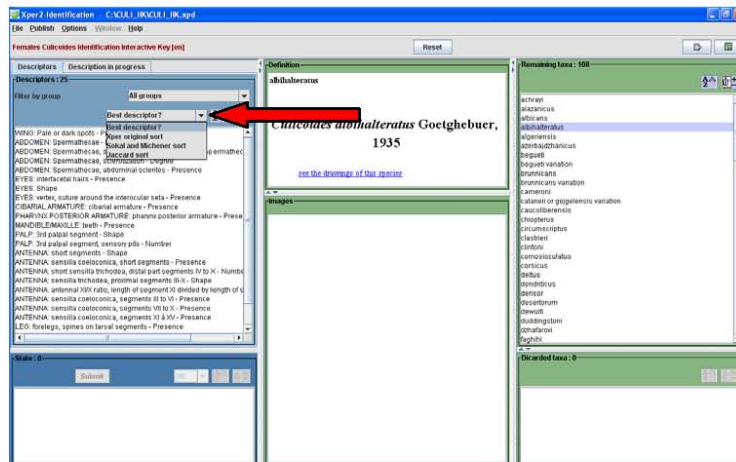


## 2. How to carry on the identification?

IIK is a multi-entry key therefore you can select a group of descriptors (wing, abdomen, leg, head, or geography). We recommend the use of “All groups”.



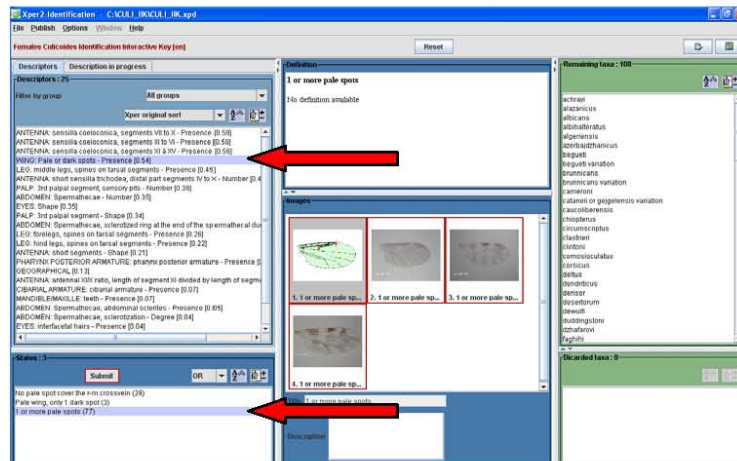
IIK allows short and quick identifications by classifying the descriptors according to their discriminating power. We recommend the use of the “Xper original sort”. When activated, a number into brackets appears for each descriptor (from 0 to 1) representing the discriminating power. Highest numbers are the most powerful descriptors.





Start the identification by choosing a descriptor you want to work with and select the state you observe. Then click on the “Submit” button. For a multiple selection, press the Ctrl button to select several states. At any moment you can **enlarge the pictures** by a double click on the left mouse button.

An operator list permit you to select XOR, AND, NOR, NXOR, etc. We do not recommend the use of operators other than “OR” (default).



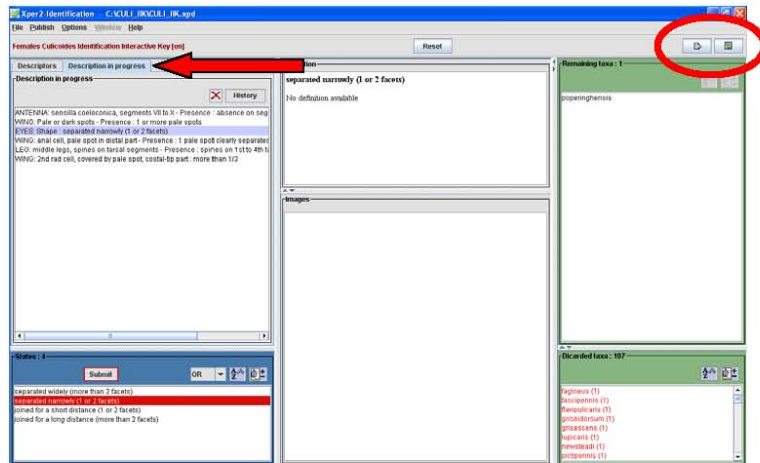
To **start a new identification**, click on the “Reset” button to initialize the IIRC. The classification according to the “Xper original sort” has to be selected again.

### 3. Some useful tools:

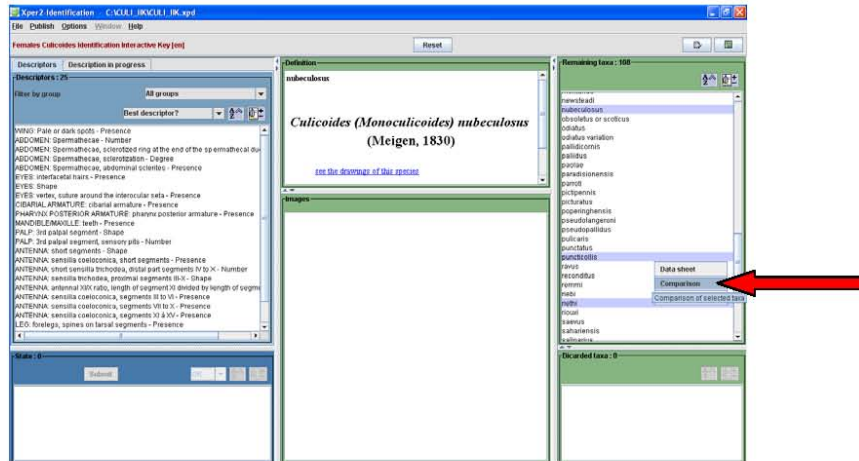
At any moment during the identification, you can check

- your progress (go to “Description in progress” tab),
- select or delete any steps (use the red cross button),
- modify your selection (change the selected state and click on “Submit”),
- generate an history of the identification (go to the “History” button).

At the upper right corner, the left button generates the database properties. The right button opens a help file called “**Help text with some taxonomic recommendations for a correct use of the IIRC**”.



IIC allows the comparison of different taxa. Press the Ctrl button and the left button on mouse to select the taxa you want to compare. Then click right button on mouse and select "Comparison".



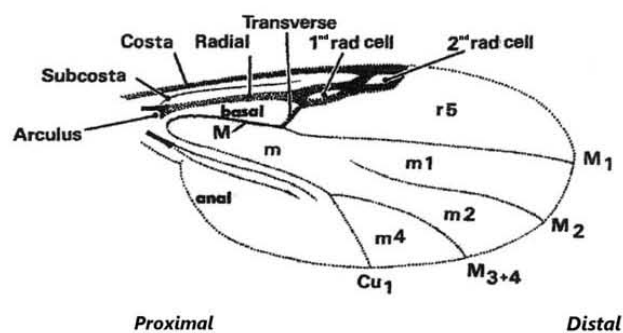
## Annexe 13 : IIKC, documentation sur la nomenclature et l'observation des caractères morphologiques

### Help text with some taxonomic recommendations for a correct use of the IIKC *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae)

**Warning:** This Key is developed to identify *Culicoides* females from slide mounted specimens by observation on a microscope. We don't recommend the use on a binocular.


- **Wings**

**Note:** Ideally, wings observation have to be done on a microscope with a low magnification (2,5x or 4x, not



x10) General view of a *Culicoides* wing:

Capital letters are used to named the nervures, lower-case for the cells. On the scheme, light green area point out what to observe. The presence of a spot (pale or dark depending the definition of the observed

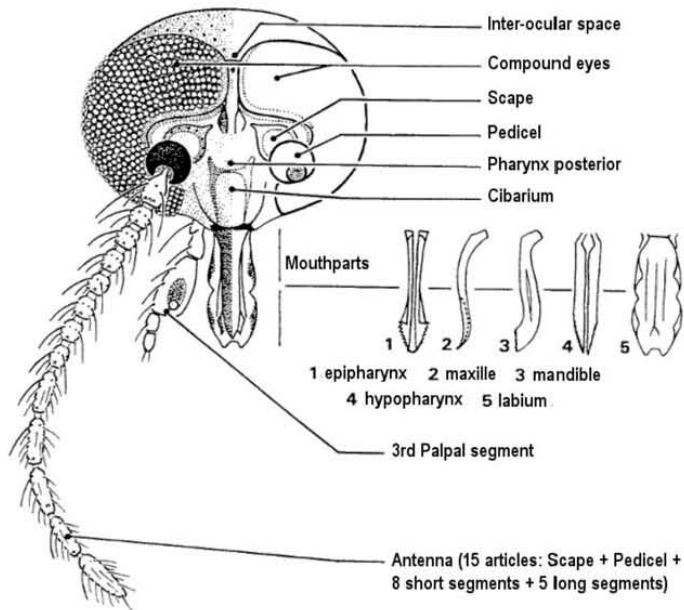
character) is represented by a red star (presence of a spot in the neighbourhood of the red star).  For example the presence of a spot in the proximal part of the m1 cell:



- **Head**

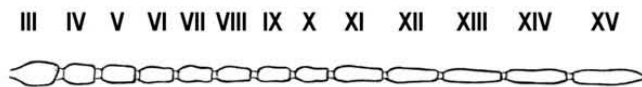


## Female Culicoides head



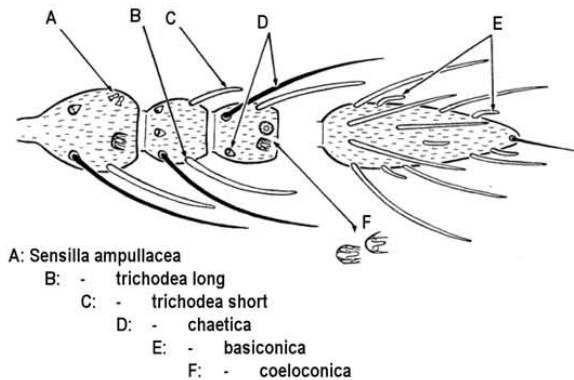
*Culicoides* antenna is compound of 15 segments. The first one, the scape, is ring-like and is hidden by the greatly enlarged second one, the pedicel. Flagellar articles started from the segment III to XV. In the female, the 8 firsts (from III to X) are shorter than the 5 lasts (from XI to XV segments are elongated). **Antennal ratio "XI/X ratio"** is the length of the first elongated segment (XI) divided by the last short segment (X). Here, only an estimate of the ratio is asked (no measures required).

### Antenna





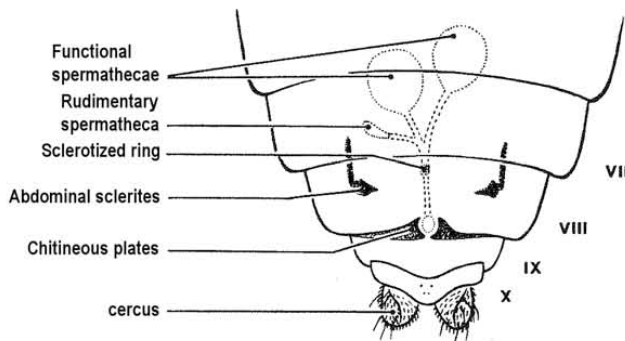
## SENSILLI



It's important to observe the **sensilli coeloconica distribution (SD)** on both antennae. If sensilli are present or absent on 1 segment of both antennae, you can consider the SD with confidence. In case of a SD disagreement on a segment of both antennae, most of the time, it means presence with an abnormal sensilli absence on a segment. Thus, in that case, you can select "presence" to the appropriate state of the descriptor. In the IIC, this SD is divided in 3 descriptors (from III to VI, from VII to X and from XI to XV). These descriptors are powerful but if you feel the SD variable according the observation of both antennae, it would be careful to not to use it. In that case, to reduce the error possibilities, you can use the others descriptors to reduce the taxa list and try the SD later. The **short trichodea sensilli** are not easy to observe. Sometimes the species with 1 seta trichodea short per short segments can present a second one on few segments. In that case, the species are considered as 1 seta per segment. The **long trichodea sensilli** are used only for their enlarged aspect. This observation is quite easy. The **sensilli ampullacea, chaetica and basiconica** are not used in this key. To evaluate the shape of the **sensory pits on the palp**, you have to check all around the pit using the fine focusing control of the microscope. If you don't, you can erroneously interpret an irregular shape as a regular one.

### • Abdomen

General view of the last abdominal segments of female

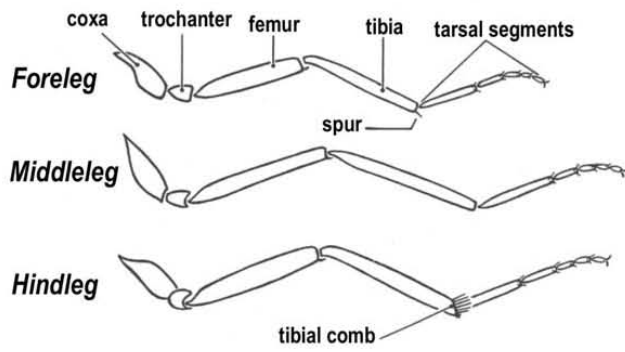


The presence of a **sclerotized ring** is an important morphological character, don't forget to check it! Some parallel ones can be difficult to observe even with a clear abdomen. To help to find it you can follow the spermathecae duct by moving the fine

focusing control of the microscope.

- **Legs**

The only difficulty is to not interpret a seta wider than the others like a spine. How to recognize a fore / middle or hind leg ? Foretibia present a spur well developed. Middletibia present no particular structure. Hindtibia present a comb of 2 rows of spines.



## Annexe 14 : Comparaison de l'extraction d'ADN non-destructive *versus* classique

Cette comparaison de l'extraction d'ADN non-destructive selon Löcker *et al.* (2009) *versus* extraction classique est réalisée pour des spécimens capturés et conservés depuis 1973.

Les 6 femelles de *C. sinanoensis* ont été collectées en 1973 par V. Glukhova. Trois femelles sont broyées et soumises à une étape de digestion enzymatique de protéinase k 10% pendant 1h sous incubation à 55°C (Figure 1). Le protocole d'extraction classique sur colonne est réalisé selon le protocole du fournisseur (DNeasy tissu kit, Qiagen©, USA).

Les trois autres femelles subissent une étape de digestion de protéinase k à 1% cette fois et laissées à incuber toute la nuit (O/N) à température ambiante (TA). La solution de digestion est alors récupérée et l'ADN extrait selon la même méthode que précédemment. Les spécimens sont transférés en alcool, puis dans un bain d'alcool/phénol à saturation avant dissection dans le baume du Canada.

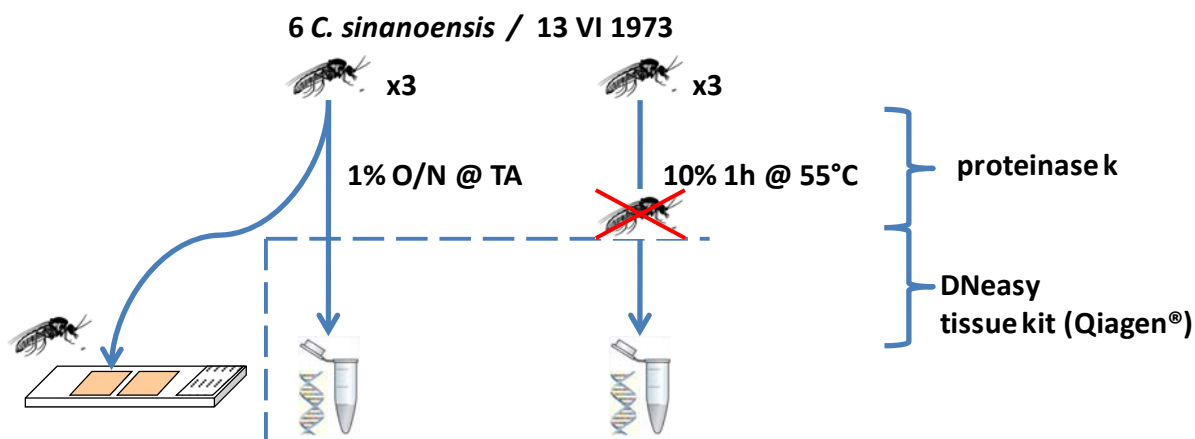


Figure 1 : Schéma du protocole de comparaison des extractions d'ADN destructive *versus* non-destructive.



# Index des espèces citées

## A

*abchazicus* Dzhafarov..... 47, 49, 68, 74, 131, 140, 141, 143, 144, 182  
*achrayi* Kettle and Lawson ..... 93  
*actoni* Smith..vii, 47, 49, 67, 69, 74, 81, 131, 134, 135, 136, 182  
*alachua* Jamnback & wirth ..... 47, 49, 68, 74, 131, 140, 142, 182  
*alazanicus* Dzhafarov ..... 93  
*albicans* (Winnertz)..... 93  
*albifascia* Tokunaga ..... 47, 182  
*albihalteratus* Goetghebuer ..... 93  
*algeriensis* Clastrier ..... 93  
*alticola* Kieffer ..... 47, 134, 135, 182  
*andicola* Wirth & Lee..... 47, 182  
*azerbajdzhanicus* Dzhafarov..... 93

## B

*begueti* Clastrier ..... 93, 103  
*belkini* Wirth and Arnaud ..... 17  
*bolitinos* Meiswinkel.. 20, 38, 47, 49, 63, 67, 69, 74, 81, 131, 140, 164, 182  
*boophagus* Macfie ..... 47, 49, 69, 74, 131, 132, 134, 182  
*boydi* Wirth & Mullens ..... 47, 182  
*brevipalpis* Delfinado .... 47, 49, 65, 67, 74, 75, 81, 131, 138, 182  
*brevitarsis* Kieffer .... 47, 49, 54, 63, 67, 69, 75, 81, 131, 182  
*brosseti* Vattier & Adam ..... 47, 67, 84, 182  
*brunnicans* Edwards ..... 93, 103  
*bubalus* Delfinado ..... 181

## C

*cameroni* Campbell and Pelham-Clinton ..... 93, 103  
*cataneii* Clastrier ..... 93, 208, 210  
*caucoliberensis* Callot, Kremer, Rioux and Descous..... 93, 107  
*certus* Das Gupta ..... 47, 182  
*chiopterus* (Meigen)....viii, 28, 31, 34, 35, 47, 49, 69, 71, 75, 92, 103, 131, 140, 142, 147, 159, 182, 208, 209, 210  
*clastrier* Callot, Kremer and Deduit ..... 93  
*clavipalpis* Mukerji ..... 181  
*clintoni* Boorman ..... 93  
*comosioculatus* Tokunaga ..... 93  
*comparis* Liu and Yu ..... 181  
*conaensis* Liu & Yu..... 47, 182  
*corsicus* Kremer, Leberre and Beaucournu-Saguez ..... 93

## D

*dasyops* Clastrier ..... 47, 134, 135, 182  
*definitus* Sen and Das Gupta ..... 47, 182  
*dendriticus* Boorman ..... 93  
*dentiformis* Mc Donald & Lu..... 47, 49, 60, 131, 182

*derisor* Callot and Kremer ..... 93  
*dewulfi* Goetghebuer .. 27, 28, 35, 37, 47, 49, 52, 63, 65, 72, 75, 92, 103, 131, 167, 182, 209, 211  
*dikhros* Tokunaga ..... 47, 182  
*dubitatus* Kremer, Rebholtz-Hirtzel & Delécolle 47, 67, 84, 182  
*duddingstoni* Kettle and Lawson ..... 94  
*dumdumi* Sen & Das Gupta..... 47, 67, 84, 182  
*dzhafarovi* Remm..... 94

## F

*faghihi* Navai ..... 94  
*fascipennis* (Staeger) ..... 93, 103  
*festivipennis* Kieffer ..... 20, 94, 103  
*filamentus* Liu, Yan & Liu ..... 47, 182  
*filicinus* Gornostajeva & Gachegova..... viii, 47, 131, 140, 182  
*flavipunctatus* Kitaoka..... 47, 67, 84, 182  
*fragmentum* Tokunaga ..... 47, 182  
*fulvus* Sen & Das Gupta..... 47, 49, 67, 75, 131, 182  
*furcillatus* Callot, Kremer and Paradis..... 94  
*furens* (Poey)..... 8, 17

## G

*gaponus* Yu..... 181  
*gejgelensis* Dzhafarov ..... 94  
*glabripennis* Goetghebuer ..... 47, 182  
*glushchenkoae* Glukhova..... 47, 140, 182  
*gornostaeva* Mirzaeva ..... viii, 47, 131, 140, 182  
*grahamii* Austen..... 34, 36, 47, 49, 75, 76, 131, 182  
*griseidorsum* Kieffer ..... 94  
*gulbenkiani* Caeiro ..vii, 47, 49, 63, 67, 69, 76, 84, 131, 138, 182  
*guttifer* (de Meijere) ..... 8

## H

*haranti* Rioux, Descous and Pech ..... 94, 103  
*hasegawai* Kanasugi & Kitaoka ..... 47, 182  
*hayakawai* Kitaoka ..... 47, 182  
*heliophilus* Edwards ..... 94, 103  
*helveticus* Callot, Kremer and Deduit..... 94  
*herero* (Enderlein) ..... 8  
*hermani* Spinelli & Borkent ..... 35, 47, 182  
*heteroclitus* Kremer and Callot..... 94  
*hirtulus* (Coquillett) ..... 47, 182  
*holcus* Lee ..... 47, 182  
*hui* Wirth & Hubert.....vii, 12, 47, 67, 69, 84, 138, 182

## I

*imicola* Kieffer .19, 20, 25, 26, 28, 29, 36, 37, 38, 47, 49, 51, 52, 54, 55, 56, 68, 69, 70, 71, 72, 76, 77, 86, 92, 103, 114, 131, 140, 142, 157, 158, 159, 163, 164, 165, 182, 209, 210, 211  
*impunctatus* Goetghebuer ..... 17, 92, 157

*impusilloides* Spinelli & Wirth ..... 35, 47, 131, 134, 182  
*incertus* Yu and Zhang, in Yu..... 181  
*indistinctus* Khalaf ..... 94  
*innoxius* Sen and Das Gupta ..... 181  
*insignipennis* Macfie ..... 181  
*iphthimus* Zhou and Lee..... 181

## J

*jacobsoni* Macfie ..... 47, 49, 65, 77, 78, 81, 131, 182  
*juddi* Cochrane..... 47, 182  
*jumineri* Callot and Kremer ..... 94  
*jurensis* Callot, Kremer and Deduit ..... 94

## K

*kanagai* Khamala & Kettle ..... 47, 56, 67, 78, 131, 134, 135, 164, 182  
*kepongensis* Lee ..... 181  
*kibatiensis* Goetghebuer ..... 47, 49, 65, 78, 131, 182  
*kibunensis* Tokunaga..... 20, 94, 103  
*kinabaluensis* Wirth and Hubert ..... 181  
*kingi* Austen..... 93  
*kurensis* Dzhafarov..... 94

## L

*landauae* Kremer, Rebholtz-Hirtzel and Bailly-Choumara..... 94  
*langeroni* Kieffer ..... 94  
*lansangensis* Howarth..... 181  
*lengi* Yu & Liu ..... 47, 183  
*liui* Wirth and Hubert ..... 181  
*longipennis* Khalaf ..... 94, 103  
*longirostris* Qu & Wang ..... 47, 183  
*loxodontis* Meiswinkel . 38, 47, 49, 69, 78, 81, 131, 140, 164, 183

## M

*malayae* Macfie..... 181  
*malevillei* Kremer and Coluzzi..... 94  
*mamaensis* Lee..... 47, 183  
*marleti* Callot, Kremer and Basset ..... 93  
*maritimus* Kieffer ..... 94  
*maritimus paucisensillatus* Callot, Kremer and Rioux..... 94  
*minimus* Wirth & Hubert ..... 47, 131, 134, 159, 183  
*minutissimus* (Zetterstedt) ..... 93, 103  
*miombo* Meiswinkel ... 47, 49, 69, 78, 79, 131, 140, 164, 183  
*montanus* Shakirzjanova ..... 35, 37, 47, 49, 69, 79, 92, 103, 130, 131, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 165, 183  
*motoensis* Lee ..... 47, 183

## N

*nielamensis* Liu and Deng ..... 181  
*nigritus* Fei and Lee ..... 181  
*nubeculosus* (Meigen)..... 29, 93, 101, 103, 107, 162  
*nudipalpis* Delfinado ..... 47, 68, 72, 79, 164, 183  
*nuijiangensis* Liu ..... 47, 183  
*nupurius* Kanasugi & Kitaoka..... 47, 183

## O

*obscurus* Tokunaga & Murachi ..... 45, 47, 49, 79, 131, 183  
*obsoletus* (Meigen)... iii, ix, xii, xv, 27, 28, 31, 33, 34, 35, 37, 43, 45, 47, 49, 52, 69, 71, 72, 79, 80, 92, 114, 125, 126, 130, 131, 140, 141, 142, 144, 145, 152, 156, 160, 162, 163, 165, 166, 167, 183, 208, 209, 210, 211  
*odiatatus* Austen..... 94  
*orestes* Wirth and Hubert ..... 181  
*orientalis* Macfie..... 33, 36, 45, 47, 49, 69, 80, 131, 183  
*orjelai* Wirth & Lee..... 47, 183

## P

*palauensis* Tokunaga ..... 47, 183  
*pallidicornis* Kieffer ..... 93  
*pallidus* Khalaf ..... 94  
*paolae* Boorman ..... 94  
*paradisionensis* Boorman..... 92, 94, 103, 107  
*paraensis* (Goeldi)..... 20, 166  
*parroti* Kieffer ..... 93, 101, 103  
*pastus* Kitaoka ..... 47, 183  
*pechumani* Cochrane ..... 47, 183  
*pelius* Liu and Yu ..... 181  
*peregrinus* Kieffer..... 181  
*pictipennis* (Staeger) ..... 94  
*picturatus* Kremer and Deduit ..... 93, 103  
*poperingensis* Goetghebuer ..... 94, 103  
*pseudolangeroni* Kremer, Chaker and Delécolle ..... 94  
*pseudopallidipennis* Clastrier..... 47, 49, 69, 80, 81, 131, 139, 140, 164, 183  
*pseudopallidus* Khalaf ..... 94  
*pullicaris* (L.) ... xv, 7, 26, 27, 29, 72, 92, 103, 114, 160, 162, 165  
*punctatus* (Meigen) ..... 7, 93, 103, 104, 209  
*puncticollis* (Becker) ..... 93  
*puracensis* Wirth & Lee..... 47, 183  
*pusilloides* Wirth & Blanton..... 35, 47, 131, 134, 183  
*pusillus* Lutz . 34, 35, 47, 49, 67, 69, 80, 131, 134, 136, 183

## Q

*qionghaiensis* Yu & Liu ..... 47, 183

## R

*ravus* de Meillon ..... 94  
*reconditus* Campbell and Pelham-Clinton ..... 93  
*remmi* Damian-Georgescu ..... 93  
*riebe* Delécolle, Mathieu, and Baldet ..... 94, 103  
*riethi* Kieffer ..... 93, 103  
*riouxi* Callot and Kremer ..... 93, 103  
*ruiliensis* Lee ..... 181

## S

*saevus* Kieffer..... 93, 102, 103, 104, 209, 210  
*sahariensis* Kieffer ..... 94  
*sanguisuga* (Coquillett) .... 47, 49, 69, 80, 131, 140, 143, 144, 183  
*santonicus* Callot, Kremer, Rault and Bach ..... 94  
*schultzei* (Enderlein)..... 158

*scoticus* Downes & Kettle .....iii, ix, xii, xv, 27, 28, 35, 43, 47, 49, 69, 72, 80, 92, 114, 125, 126, 131, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 152, 156, 165, 166, 183, 208, 209, 210, 211  
*segnis* Campbell and Pelham-Clinton ..... 93, 103  
*sejfadinei* Dzhafarov ..... 93, 103  
*semimaculatus* Clastrier ..... 94, 102, 103  
*sergenti* Kieffer ..... 94, 148  
*shaklawensis* Khalaf ..... 94  
*sikkimensis* Das Gupta ..... 45  
*simulator* Edwards ..... 94, 107  
*sinanoensis* Tokunaga ..... 47, 49, 69, 80, 81, 128, 131, 140, 142, 143, 144, 183, 209, 231  
*sousa-diasi* Caeiro ..... 47, 183  
*stigma* (Meigen) ..... 93, 103  
*suarezi* Rodriguez & Wirth ..... 47, 183  
*subfagineus* Delécolle and Ortega .....vii, 10, 93  
*subfasciipennis* Kieffer ..... 93  
*submaritimus* Dzhafarov ..... 95  
*sumatrae* Macfie ..... 181  
*suzukii* Kitaoka .. vii, 47, 49, 69, 81, 131, 132, 133, 134, 183

## T

*tainanus* Kieffer .....45, 47, 49, 81, 131, 183  
*tauricus* Gutsevich ..... 52, 93, 209  
*tibetensis* Chu ..... 47, 183  
*tobaensis* Tokunaga ..... 47, 183

*tororoensis* Khamala & Kettle .vii, 47, 49, 67, 69, 81, 84, 131, 138, 183  
*towadaensis* Okada ..... 47, 183  
*trifasciellus* Goetghebuer ..... 34, 47, 48, 67, 84, 183  
*trimaculatus* Mc donald & Lu .....46, 47, 181, 183  
*trimaculatus* McDonald and Lu .....46, 47, 181, 183  
*truncorum* Edwards ..... 95  
*tuttiifrutti* Meiswinkel, Cornet & Dyce ..... 38, 47, 49, 69, 81, 82, 131, 139, 140, 183

## U

*univittatus* Vimmer ..... 95

## V

*vexans* (Staeger) ..... 95, 103  
*wandourlensis* Callot, Kremer, Molet and Bach ..... 95

## W

*wadai* Kitaoka ... 47, 49, 69, 81, 82, 131, 132, 133, 134, 183  
*wandashanensis* Wang & Liu ..... 47, 183

## Y

*yamii* Lien, Lin and Weng ..... 181  
*yuchihensis* Lien, Lin and Weng ..... 181