

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par  
**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

Préparée au sein de l'école doctorale  
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé  
Spécialité : Biologie Santé  
Discipline : Entomologie médicale

Présentée par **Roger VENAIL**

**Sensibilité aux insecticides et évaluation  
préliminaire des méthodes de lutte  
antivectorielle disponibles contre  
les *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae)  
paléarctiques, vecteurs de virus émergents  
d'intérêt en santé animale**

Soutenue publiquement le 22 décembre 2014  
devant le jury composé de :

<b>M. Frederic FRANCIS,</b> Professeur, Université de Liège, Gembloux, Belgique	Président du jury et rapporteur
<b>M. Pierre GUILLET,</b> Ex Directeur de recherche, IRD, Marseille	Rapporteur
<b>M. Christophe LAGNEAU,</b> Directeur technique, EID, Montpellier	Examineur
<b>M. Thierry BALDET,</b> Responsable de projets, IDRC-CRDI, Ottawa, Canada	Directeur de thèse
<b>M. Thierry LEFRANCOIS,</b> Responsable UMR CMAEE, Cirad, Montpellier	Co-directeur de thèse
<b>M. Simon CARPENTER,</b> Professeur, TPI, Woking, Royaume-uni	Co-directeur de thèse



**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**Année 2015**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II**

**École Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé  
Spécialité : Biologie Santé**

soutenue publiquement le 22 décembre 2014

par

**Roger VENAIL**

**Sensibilité aux insecticides et évaluation préliminaire des  
méthodes de lutte antivectorielle disponibles contre  
les *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) paléarctiques,  
vecteurs de virus émergents d'intérêt en santé animale**

**JURY**

<b>M. Frederic FRANCIS,</b> Professeur, Université de Liège, Gembloux, Belgique	Président du jury et rapporteur
<b>M. Pierre GUILLET,</b> Ex Directeur de recherche, IRD, Marseille	Rapporteur
<b>M. Christophe LAGNEAU,</b> Directeur technique, EID, Montpellier	Examineur
<b>M. Thierry BALDET,</b> Responsable de projets, IDRC-CRDI, Ottawa, Canada	Directeur de thèse
<b>M. Thierry LEFRANCOIS,</b> Responsable UMR CMAEE, Cirad, Montpellier	Co-directeur de thèse
<b>M. Simon CARPENTER,</b> Professeur, TPI, Woking, Royaume-uni	Co-directeur de thèse





## **Sensibilité aux insecticides et évaluation préliminaire des méthodes de lutte antivectorielle disponibles contre les *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) paléarctiques, vecteurs de virus émergents d'intérêt en santé animale**

---

Les *Culicoides* sont des petits insectes hématophages vecteurs d'arbovirus responsables d'importantes pertes économiques au niveau mondial dans l'industrie agroalimentaire incluant le virus de la fièvre catarrhale ovine et le virus de Schmallenberg. Afin de réduire le contact entre les *Culicoides* et leur hôte, plusieurs moyens de lutte peuvent être utilisés comme la lutte écologique (modification des habitats larvaires), la lutte biologique (introduction d'un ennemi naturel dans leur environnement), la lutte mécanique (confinement des animaux dans des bâtiments) et la lutte chimique (utilisation d'insecticides). Cette dernière, restant la plus utilisée en Europe, est recommandée par les autorités sanitaires pour réduire la transmission de la maladie, ainsi que la vaccination et la restriction de mouvements des animaux pendant les périodes critiques de circulation du virus. L'utilisation de produits insecticides reste le premier recours en absence de vaccin efficace contre les nouveaux virus et les différentes souches circulantes. Néanmoins, leur efficacité est incertaine et variable selon les études menées jusqu'à présent, visant leur évaluation. Ce travail de thèse tend à **améliorer les connaissances sur les méthodes de lutte antivectorielle disponibles contre les *Culicoides* européens vecteurs de virus émergents d'intérêt en santé animale** et de proposer des procédures standardisées qui nous ont permis d'obtenir des valeurs de références, inexistantes jusqu'à présent, mais indispensables dans la lutte antivectorielle contre les *Culicoides*.

**Mots clés :** *Culicoides*, vecteurs, virus émergents, lutte antivectorielle

## **Insecticide susceptibility and preliminary evaluation of vector control methods available against Palearctic *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors of emerging viruses with interest in animal health**

---

*Culicoides* are small haematophagous insect, vectors of arboviruses responsible for significant economic losses worldwide in the food industry including the Bluetongue virus and Schmallenberg virus. In order to reduce contact between *Culicoides* and their host, several control methods can be used as the ecological control (reduction / destruction of larval habitats), biological control (introduction of a natural enemy in their environment), mechanical control (confinement of animals in buildings) and chemical control (use of insecticides). The latter remains the most widely used in Europe, is recommended by health authorities to reduce transmission of the disease, as well the vaccination and restriction of movement of animals during critical periods of virus circulation. The use of insecticides is the first resort in the absence of an effective vaccine against the new virus and different circulating strains. However, their efficacy has been evaluated in previous studies and is still uncertain and variable. This thesis aims to improve the knowledge of vector control methods available against European *Culicoides* vectors of viruses emerging with animal health interest and propose standardized procedures that allowed us to obtain reference values, scarce to date, but necessary for vector control against *Culicoides*.

**Keywords:** *Culicoides*, vectors, emerging viruses, vector control



*A mi familia*



# Remerciements

---

Et voilà, ces 3 années de thèse se sont écoulées et je suis arrivé au bout avec le soutien de beaucoup de personnes...

Je tenais tout d'abord à remercier Thierry Baldet et Simon Carpenter pour leur encadrement et leur soutien tout au long de cette période, malgré les kilomètres qui nous séparaient. J'ai eu le privilège d'avoir deux grands « coaches » avec de grandes qualités humaines et pédagogiques. Merci Thierry pour la confiance accordée et d'avoir partagé avec moi un peu de tes immenses connaissances. Thank you Simon for offering me the possibility of working with you, for opening the doors of your lab and for letting me feel like I was part of your team. J'espère pouvoir continuer à travailler avec vous.

Je tenais aussi à exprimer ma gratitude à Thierry Lefrançois d'avoir accepté de m'accompagner pour cette phase finale.

Je remercie également Messieurs Frederic Francis et Pierre Guillet qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également à Monsieur Christophe Lagneau d'avoir accepté de juger mon travail.

Mes remerciements vont aussi vers les membres des comités de thèse, Dorothée Missé, Michel Franc, Thibaud Martin, Fabrice Chandre et Christophe Lagneau. Merci pour vos conseils et votre soutien.

Je voudrais ensuite remercier l'EID méditerranée pour avoir permis que les paillasses de laboratoire deviennent mon terrain de jeu. Merci à la direction de m'avoir autorisé à participer à ce projet. Merci au garage pour m'avoir dépanné de tous les outils (perceuse, scie, béton, etc...) pour bricoler et fabriquer le matériel nécessaire pour mes tests. Merci à Marie, Bruno, Magalie et Patrick pour avoir bichonné mes souris. Merci à Beth et Marie-Laure pour l'aide en Corse. Merci à Sandrine, Stéphanie, Leslie, Pierre et Frank pour avoir allégé la lourdeur administrative. Merci aux footballeurs nocturnes. Sandie merci d'avoir contribué à mon retour à l'EID plusieurs années après mon stage de master.

Merci au Cirad, plus particulièrement à l'unité mixte de recherche Cirad-INRA "Contrôle des maladies animales, exotiques et émergentes" (CMAEE) pour avoir fait appel à moi pour la partie lutte contre les *Culicoides* du projet EDENext. Merci pour votre confiance. A Océane, Olivier, Sylvie et Renaud, merci pour l'excellente organisation de ce projet et d'avoir choisi des pays lointains pour nos meetings. À toute l'équipe « vecteurs » merci pour votre collaboration et votre implication dans mes activités. Nous avons tous fait du terrain ensemble et ce fut particulièrement agréable, non ? Oh, oui ! Les aventures à Tours, en Corrèze, dans le Var, dans les PO, en Corse, un peu plus loin à Barcelone (merci Nitu pour la visite du P3) et à Dakar sont inoubliables. A Laëtitia merci pour ces milliers de PCR's. A Hélène merci d'avoir fait en sorte que ces cartes soient lisibles. A Jonathan le belge, Ignace le

## *Remerciements*

---

malgache, Simon le canadien, Xavier le biterrois et Geoffrey le burkinabé, le colombien vous remercie pour tout. Claire et Thomas, vous avez été des personnes très importantes depuis mes débuts dans le monde des insectes. Plein de bons conseils, avec vos approches complémentaires, vous m'avez épaulé pendant ces trois années et je vous en serai toujours reconnaissant.

Thanks to TPI (ex IAH) for opening their doors, for letting me use their midges and for providing us the midges to start the colony in Montpellier. Thanks to Simon, James, Eric, Anthony, Andrew, Lara and Eva for all the help and advices. Cheers mates.

To the people of the CBD group from the EDENext project: gracias Javier, Miguel y Ricardo, gràcies Sandra i Nitu, jeredief Moussa et Assane, thanks Beth and Kate, tak Rene and merci Catherine, it was a real pleasure spending that time together in Montpellier, Tunis, Lisboa, Izmir, Budapest, Barcelona and Rovaniemi.

Merci à l'IRD de m'avoir accueilli dans ses locaux. À Fabrice merci pour la silicone, les tubes OMS, le papier filtre, les substances actives, mais surtout pour m'avoir fait découvrir le monde de la biochimie (to be resistant or not). À Frédéric Simard pour l'aide apportée à la concrétisation de cette these.

Merci aux deux familles qui m'ont ouvert leurs portes et qui m'ont autorisé à piéger dans leurs élevages. Aux Virolles (le meilleur beurre de la Corrèze) et aux Jungen (le meilleur mouton de Corse), merci pour votre hospitalité et votre sincérité. C'est grâce à des rencontres avec des personnes comme vous que je veux continuer à faire ce métier.

Clarita, ne pas te dire merci aurait été une preuve d'ingratitude car nous avons partagé beaucoup de choses ensemble. Gracias por todo. Cuidate!

A mi familia:

A los de acá, a mi mujer gracias por tu paciencia, sé que no fue fácil vivir conmigo durante estos últimos años. Gracias por soportar mis ausencias durante mis viajes y durante las muchas noches que pasé al frente del computador. A mi príncipe y a mi princesa, mi motivación, mi energía, gracias por haberme dado la fuerza de seguir adelante.

A mi compañero, colega y hermano de alma, gracias por servirme de ejemplo. Gracias gordillo.

A las dos de más allá, ma y elsi, gracias por ese apoyado incondicional y por todo ese amor que solo la familia puede dar a pesar de los miles de kilómetros.

Y a los del más allá, don Pedrito, don Carlos, doña Silvia, la Meme y mi hermanita Nadia, mis ángeles de la guarda. No pudieron vernos, pero el gordo y yo ya somos doctores!

Ce travail de thèse a bénéficié du soutien financier de l'Union Européenne, à travers le projet EDENext.

# Table des matières

---

Remerciements .....	i
Table des matières .....	iii
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	x
Liste des abréviations .....	xiii
Liste des publications scientifiques .....	xiv
Liste des communications scientifiques .....	xvi
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
Objectifs de la thèse .....	7
<b>Chapitre 1 : Généralités.....</b>	<b>11</b>
1.1 Les <i>Culicoides</i> : biologie et écologie.....	13
<i>Manuscrit #1</i>	
Assessing diversity and abundance of vector populations at a national scale: example of <i>Culicoides</i> surveillance in France after Bluetongue virus emergence .....	19
Overview of <i>Culicoides</i> population surveillance in France.....	21
First record of <i>Culicoides imicola</i> in mainland France and surveillance of its extension .....	23
Species diversity .....	29
Species distribution and seasonal dynamics .....	36
Indoor and outdoor activity.....	38
Field-collected infected individuals.....	40
Conclusions.....	42
References.....	42
1.2 Le rôle vecteur des <i>Culicoides</i> .....	45
1.3 Législation et réglementation sanitaires .....	49
1.4 Méthodes de lutte contre les <i>Culicoides</i> .....	51
1.4.1 La lutte écologique.....	51
1.4.2 La lutte biologique .....	52
1.4.3 La lutte mécanique.....	52
1.4.4 La lutte chimique .....	53
1.4.4.1 Les différentes méthodes.....	53

1.4.4.2 Connaissances actuelles sur l'évaluation des insecticides contre les <i>Culicoides</i> .....	54
<b>Chapitre 2 : Comment évaluer la sensibilité des <i>Culicoides</i> aux substances actives insecticides ?.....</b>	<b>69</b>
Introduction du chapitre 2.....	71
2.1 Sensibilité des <i>Culicoides</i> aux substances actives insecticides en France.....	73
<i>Manuscrit #2</i>	
Laboratory and field-based test of deltamethrin insecticides against adult <i>Culicoides</i> biting midges .....	75
Introduction.....	75
Material and methods.....	76
Results.....	77
Discussion.....	78
Acknowledgments .....	80
References cited .....	80
<i>Manuscrit #3</i>	
Insecticide susceptibility of <i>Culicoides</i> biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in France .....	83
Introduction.....	84
Material and methods.....	85
Results.....	88
Discussion.....	89
Acknowledgments .....	90
References.....	90
2.2 Sensibilité des <i>Culicoides</i> aux substances actives insecticides en Europe et Afrique.....	103
<i>Manuscrit #4</i>	
Sensitivity of <i>Culicoides obsoletus</i> (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test.....	103
Introduction.....	103
Material and methods.....	104
Results.....	104
Discussion.....	105
Acknowledgments .....	106



References.....	106
<i>Manuscrit #5</i>	
Susceptibility of <i>Culicoides obsoletus</i> (Diptera: Ceratopogonidae) to cypermethrin in laboratory conditions .....	109
Introduction.....	110
Material and methods.....	110
Results.....	111
Discussion .....	112
Acknowledgments .....	113
Bibliography .....	114
<i>Manuscrit #6</i>	
Insecticide susceptibility of <i>Culicoides</i> biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): a multicentric study using a modified WHO standard assay.....	119
Background.....	120
Material and methods.....	121
Results.....	123
Discussion.....	124
Acknowledgments .....	126
References.....	127
Discussion du chapitre 2.....	139
<b>Chapitre 3 : Comment évaluer l'efficacité des produits insecticides appliqués directement sur les animaux et des répulsifs contre les <i>Culicoides</i> ?.....</b>	<b>141</b>
Introduction du chapitre 3.....	143
3.1 Efficacité des produits insecticides appliqués directement sur les animaux contre les <i>Culicoides</i> .....	148
<i>Manuscrit #7</i>	
Assessment of the efficiency of insecticide formulations against <i>Culicoides</i> biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) using an original approach.....	149
Introduction.....	150
Material and methods.....	151
Results.....	153
Discussion .....	154
Conclusion .....	155
Acknowledgments .....	155
References.....	155

3.2 Efficacité des répulsifs contre les <i>Culicoides</i> .....	161
<i>Manuscrit #8</i>	
Feeding inhibition and lethal properties of various essential oils against adult <i>Culicoides</i> biting midges .....	161
Introduction.....	162
Material and methods.....	163
Results.....	165
Discussion.....	166
Conclusion .....	167
Acknowledgments .....	168
References.....	168
Discussion du chapitre 3.....	174
<b>Chapitre 4 : Comment évaluer l'efficacité des matériaux imprégnés ou traités d'insecticide contre les <i>Culicoides</i> ? .....</b>	<b>177</b>
Introduction du chapitre 4.....	179
4.1 Protocole et premiers résultats pour le test en tunnel adapté pour évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées contre les <i>Culicoides</i> .....	180
4.2 Protocole et résultats préliminaires pour le test en cône adapté pour évaluer l'efficacité des supports traités contre les <i>Culicoides</i> .....	184
Discussion du chapitre 4.....	187
<b>Discussion générale .....</b>	<b>189</b>
<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>197</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>203</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>217</b>

# Liste des figures

---

## Chapitre 1

<b>Figure 1.1</b> <i>Culicoides nubeculosus</i> femelle non gorgée et gorgée .....	14
<b>Figure 1.2</b> Œufs de <i>Culicoides nubeculosus</i> .....	14
<b>Figure 1.3</b> Larve et nymphes de <i>Culicoides nubeculosus</i> .....	15
<b>Figure 1.4</b> Accouplement de <i>Culicoides nubeculosus</i> .....	16
<b>Figure 1.5</b> Cycle de vie des <i>Culicoides</i> .....	16
<b>Figure 1.6</b> Fig. 4.1 Localization of <i>Culicoides</i> surveillance sites in France, 2002-2009 ...	22
<b>Figure 1.7</b> Fig. 4.2 Collection sites in Corsica with maximum catches of <i>Culicoides imicola</i> per year from 2002 to 2008 .....	22
<b>Figure 1.8</b> Fig. 4.3 The two models of UV-light trap used during <i>Culicoides</i> surveillance in France.....	24
<b>Figure 1.9</b> Fig.4.4 Distribution area of <i>Culicoides imicola</i> in the Var department from 2003 to 2010.....	25
<b>Figure 1.10</b> Fig 4.5 Distribution area of <i>Culicoides imicola</i> in the Var department based on catches from 2003 to 2010 .....	27
<b>Figure 1.11</b> Fig.4.6 Maximum catch of <i>Culicoides imicola</i> in the Var department from 2003 to 2010.....	28
<b>Figure 1.12</b> Fig.4.7 Diversity of <i>Culicoides</i> species collected in different French regions, as the proportion of total annual catches .....	37
<b>Figure 1.13</b> Fig.4.8 Seasonal dynamics of <i>Culicoides imicola</i> in Corsica and <i>Culicoides obsoletus/scoticus</i> in different French regions in regard to monthly rainfall and temperatures .....	38
<b>Figure 1.14</b> Fig.4.9 Boxplots of main <i>Culicoides</i> species of veterinary interest abundance collected in eight sites in north-eastern France from 2007 to 2008 depending on trap location (indoor and outdoor) and on animal presence .....	40
<b>Figure 1.15</b> Patho-systèmes de FCO : distributions des sérotypes de FCO et des principaux vecteurs .....	48

## Chapitre 2

<b>Figure 2.1</b> Tubes OMS d'exposition contenant les papiers imprégnés d'insecticides et placés en position verticale .....	71
<b>Figure 2.2</b> Fig.1 a) Arles Merino sheep, b) contact between biting midges and the tight of the sheep, c) observation cages, d) exposure cage top view and e) exposure cage bottom view (mesh only on the top of the lid .....	77
<b>Figure 2.3</b> Fig. 2. Mortality of <i>Culicoides nubeculosus</i> at the end of 1h exposure to deltamethrin concentrations (%) and after 24h post-exposure.....	78

<b>Figure 2.4</b> Fig. 3. Boxplot of the 24h post-exposure corrected mortality of <i>C. nubeculosus</i> after 1, 4, 6 and 13 days following the application of deltamethrin pour-on formulation (Butox® 7.5 pour-on).....	78
<b>Figure 2.5</b> Figure 1. Lethal concentrations LC <sub>50</sub> , LC <sub>90</sub> and 95% confidence intervals for <i>C. obsoletus</i> , <i>C. imicola</i> and <i>C. nubeculosus</i> exposed to six active ingredients .....	100
<b>Figure 2.6</b> Figure 2. Sigmoidal curves of dose-response estimations of 3 species of <i>Culicoides</i> exposed to different insecticides active ingredient .....	101
<b>Figure 2.7</b> Fig. 1. Sensitivity of <i>C. obsoletus</i> when exposed to various concentrations of deltamethrin for 1h and after 24h post exposure indicating LD <sub>50</sub> and LD <sub>90</sub> .....	105
<b>Figure 2.8</b> Fig. 2. Regression model showing the variability of response to deltamethrin of the <i>Culicoides</i> population assayed.....	105
<b>Figure 2.9</b> Figure 1 Sigmoidal dose-response curve of <i>Culicoides obsoletus</i> after 1h exposure to cypermethrin .....	118
<b>Figure 2.10</b> Figure 1 Overview of sigmoidal dose-response curves of different populations of <i>Culicoides</i> exposed to deltamethrin and permethrin active ingredients.....	136
<b>Figure 2.11</b> Figure 2 Lethal concentrations LC <sub>50</sub> , LC <sub>90</sub> and 95% confidence intervals for different populations of <i>Culicoides</i> exposed to deltamethrin.....	137
<b>Figure 2.12</b> Figure 3 Lethal concentrations LC <sub>50</sub> , LC <sub>90</sub> and 95% confidence intervals for different populations of <i>Culicoides</i> exposed to permethrin.....	138

### Chapitre 3

<b>Figure 3.1</b> Mise en contact de la souris traitée avec les <i>Culicoides</i> et femelles gorgées ...	145
<b>Figure 3.2</b> Dispositifs pour évaluer l'inhibition de repas sur les <i>Culicoides</i> avec des répulsif.....	146
<b>Figure 3.3</b> Fig. 1. Estimated persistence of insecticidal formulations applied to mice against <i>Culicoides nubeculosus</i> .....	160
<b>Figure 3.4</b> Figure 1. Feeding rate and mortality rate of <i>Culicoides nubeculosus</i> , observed 24 hours after 20 min exposure to different treatments .....	172
<b>Figure 3.5</b> Figure 2. Feeding rate and mortality rate of <i>Culicoides obsoletus</i> , observed 24 hours after 1 hour exposure to different treatments .....	173

### Chapitre 4

<b>Figure 4.1</b> Test tunnel adapté pour évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées contre les <i>Culicoides</i> .....	181
<b>Figure 4.2</b> Premiers résultats de l'efficacité de moustiquaires imprégnées sur le taux de passage et le taux de mortalité induite de <i>C. nubeculosus</i> suite à l'adaptation du test en tunnel .....	182
<b>Figure 4.3</b> Taille de <i>C. nubeculosus</i> , <i>C. imicola</i> et <i>C. obsoletus</i> , calculé en élevant au cube la longueur de l'aile .....	183

<b>Figure 4.4</b> Premiers résultats sur l'efficacité de la peinture Inesfly IGR VET PYR contre <i>C. nubeculosus</i> et <i>A. aegypti</i> évaluée avec le test en cône.....	185
<b>Figure 4.5</b> Visualisation de l'effet <i>Knock Down</i> causé par la peinture insecticide appliquée sur un support bétonné à des individus de <i>C. nubeculosus</i> lors de test en cône OMS.....	186

# Liste des tableaux

---

## Chapitre 1

<b>Tableau 1.1</b> Table 4.1 Summary of <i>Culicoides</i> catches in the Var department, 2004-2010.....	26
<b>Tableau 1.2</b> Table 4.2 Maximal spread of <i>Culicoides imicola</i> over the years in the Var department.....	27
<b>Tableau 1.3</b> Table 4.3 Updated list of <i>Culicoides</i> species recorded in France, and their distribution areas .....	30
<b>Tableau 1.4</b> Table 4.4 Mean number observed (max) and predicted <i>Culicoides</i> for the most abundant species from May to October 2007 and 2008 depending on the trap location and the animal presence .....	39
<b>Tableau 1.5</b> Sensibilité de différentes espèces de <i>Culicoides</i> à différentes substances actives et produits insecticides évaluée en utilisant les tunnels à vent.....	56
<b>Tableau 1.6</b> Sensibilité de différentes espèces de <i>Culicoides</i> à différentes substances actives évaluée en utilisant les tubes OMS .....	57
<b>Tableau 1.7</b> Efficacité létale des différentes formulations appliquées sur des supports contre les <i>Culicoides</i> .....	58
<b>Tableau 1.8</b> Efficacité létale de différentes formulations insecticides appliquées sur les animaux contre les <i>Culicoides</i> , évaluée en les exposant aux poils coupés d'animaux traités .....	59
<b>Tableau 1.9</b> Efficacité létale de différentes formulations insecticides appliquées sur les animaux contre les <i>Culicoides</i> évaluée en les exposant directement aux animaux traités .....	60
<b>Tableau 1.10</b> Efficacité létale des différentes formulations insecticides d'épandage contre les <i>Culicoides</i> .....	61
<b>Tableau 1.11</b> Efficacité répulsive de différentes formulations contre les <i>Culicoides</i> évaluée en les exposant directement aux produits.....	62
<b>Tableau 1.12</b> Efficacité répulsive de différentes formulations contre les <i>Culicoides</i> évaluée en les exposant directement aux animaux traités .....	64
<b>Tableau 1.13</b> Efficacité répulsive de différents produits contre les <i>Culicoides</i> évaluée en les capturant avec un piège dont le filet est imprégné de produit.....	64
<b>Tableau 1.14</b> Efficacité répulsive de différentes formulations contre les <i>Culicoides</i> évaluée en les collectant à proximité d'animaux traités.....	66
<b>Tableau 1.15</b> Efficacité répulsive de différentes formulations contre les <i>Culicoides</i> évaluée sur humain.....	67
<b>Tableau 1.16</b> Efficacité des différentes formulations insecticides contre la transmission du virus de la FCO .....	68

## Chapitre 2

<b>Tableau 2.1</b> Table 1 Susceptibility of field populations of <i>Culicoides imicola</i> (Corsica, France) and <i>Culicoides obsoletus</i> s.s. (Mediterranean littoral, France) and of a laboratory strain of <i>Culicoides nubeculosus</i> (IAH colony) to deltamethrin: delayed mortality 24 h after 1h exposure to different concentrations .....	78
<b>Tableau 2.2</b> Table 2 Susceptibility of different field populations of <i>Culicoides</i> midges to pyrethroid insecticides in laboratory trials .....	79
<b>Tableau 2.3</b> Table 1. List of the most commonly authorised veterinary medicinal products used for the treatment of livestock to control ectoparasites in Europe.....	96
<b>Tableau 2.4</b> Table 2. Susceptibility values (LC <sub>50</sub> and LC <sub>90</sub> , expressed in % of active ingredient) of field-collected adult female <i>Culicoides obsoletus</i> (Corrèze, France) and <i>Culicoides imicola</i> (Corsica, France) and laboratory-reared <i>Culicoides nubeculosus</i> (CIRAD colony) to different active ingredients: mortality recorded 24 h after 1h exposure to different concentrations .....	97
<b>Tableau 2.5</b> Table 3. Susceptibility values (LC <sub>50</sub> and LC <sub>90</sub> , expressed in mg/m <sup>2</sup> of active ingredient) of field-collected adult female <i>Culicoides obsoletus</i> (Corrèze, France) and <i>Culicoides imicola</i> (Corsica, France) and laboratory-reared <i>Culicoides nubeculosus</i> (CIRAD colony) to different active ingredients: delayed mortality 24 h after 1h exposure to different concentrations .....	98
<b>Tableau 2.6</b> Table 4. Insecticide diagnostic doses (twice the LC <sub>99</sub> ) for field-collected adult female <i>Culicoides obsoletus</i> (Corrèze, France) and <i>Culicoides imicola</i> (Corsica, France) and laboratory-reared <i>Culicoides nubeculosus</i> (CIRAD colony) .....	99
<b>Tableau 2.7</b> Table 1. Effect of deltamethrin on the mortality of <i>Culicoides obsoletus</i> under laboratory conditions.....	105
<b>Tableau 2.8</b> Table 1. Mortality rate (MR) and knock-down (KD) effect of different concentrations of cypermethrin assayed on nulliparous females of <i>C. obsoletus</i> under laboratory conditions.....	117
<b>Tableau 2.9</b> Table 1 Origin of <i>Culicoides</i> tested populations and date of collection .....	132
<b>Tableau 2.10</b> Table 2 Concentrations in percentage of deltamethrin and permethrin active ingredients used to assess the insecticide susceptibility of different populations of <i>Culicoides</i> .....	133
<b>Tableau 2.11</b> Table 3 Susceptibility values (LC <sub>50</sub> and LC <sub>90</sub> , expressed in % of active ingredient.) of different populations of <i>Culicoides</i> to deltamethrin and permethrin active ingredients: mortality recorded 24 h after 1h exposure to different concentrations.....	134
<b>Tableau 2.12</b> Table 4 Susceptibility values (LC <sub>50</sub> and LC <sub>90</sub> , expressed in mg/m <sup>2</sup> of active ingredient.) of different populations of <i>Culicoides</i> to deltamethrin and permethrin active ingredients: mortality recorded 24 h after 1h exposure to different concentrations.....	135

### Chapitre 3

<b>Tableau 3.1</b> Table 1. List of veterinary medical product tested.....	158
<b>Tableau 3.2</b> Table 2. Mortality of <i>Culicoides nubeculosus</i> postexposure to treated mice at 1, 5, 8, 12 and 15 days after the application of formulations and the estimation of persistence in days .....	159
<b>Tableau 3.3</b> Table 1. Average feeding and mortality rates (min-max) of <i>Culicoides nubeculosus</i> and <i>Culicoides obsoletus</i> after exposure to plant derived and synthetic treatments .....	171

### CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

<b>Tableau récapitulatif</b> Méthodes proposées pour l'évaluation de l'efficacité des formulations insecticides ou répulsives contre les <i>Culicoides</i> .....	202
--	-----



## Liste des abréviations

---

- AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché
- ARC-OVI** : Agricultural Research Council - Onderstepoort Veterinary Institute
- Bti** : *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*
- Cirad** : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
- CRESA** : Centre de Recerca en Sanitat Animal
- DEET** : N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide
- DDT** : dichlorodiphényldichloroéthane
- DDSV** : Direction Départementale des Services Vétérinaires
- DGAL** : Direction Générale de l'Alimentation
- EFSA** : European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
- EID Méd** : Entente Interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen
- FCO** : Fièvre Catarrhale Ovine
- IGR** : Insect Growth Regulator (Inhibiteur de croissance des insectes)
- INRA** : Institut National de Recherche Agronomique
- ISRA** : Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
- LAV** : Lutte anti-vectorielle
- LIN-IRD** : Laboratoire insectes nuisibles – Institut de Recherche pour le Développement
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- PBO** : Butoxyde de piperonyl
- SBV** : virus de Schmallenberg
- TPI** : The Pirbright Institute
- UBV** : Ultra-bas volume
- UIB** : Universitat de les Illes Balears
- WHO** : World Health Organisation (OMS)

# Liste des publications scientifiques

---

- Manuscrit #1* ..... 19  
**Venail R**, Balenghien T, Guis H, Tran A, Setier-Rio ML, Delécolle JC, Mathieu B, Cêtre-Sossah C, Martinez D, Languille J, Baldet T and Garros C., 2012. Assessing diversity and abundance of vector populations at a national scale: example of *Culicoides* surveillance in France after Bluetongue virus emergence.  
Arthropods as Vectors of Emerging Diseases, 2012  
H. Mehlorn (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg,  
Parasitology Research Monographs 3, 77-102.
- Manuscrit #2* ..... 75  
**Venail R**, Mathieu B, Setier-Rio ML, Borba C, Alexandre M, Viudes G, Garros C, Allène X, Carpenter S, Baldet T and Balenghien T., 2011. Laboratory and field-based test of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges.  
Journal of Medical Entomology. 2011, 48(2) : 542-546
- Manuscrit #3* ..... 83  
**Venail R**, Lhoir J, Rakotoarivony I, Allène X, Setier-Rio ML, Scheid B, Gardes L, Gosset A, Lancelot R, Gimonneau G, Garros C, Balenghien T, Carpenter S and Baldet T. Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in France.  
Soumis à PLoS One, le 05 mai 2014
- Manuscrit #4* ..... 103  
del Río R, **Venail R**, Calvete C, Barceló C, Baldet T, Lucientes J and Miranda M., 2014. Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test.  
Parasitology, 2014, 141(4):542-546  
doi:10.1017/S0031182013001935
- Manuscrit #5* ..... 109  
del Río R, Barceló C, **Venail R**, Lucientes J and Miranda M. Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) to cypermethrin in laboratory conditions.  
Soumis à Pest Science Management, le 22 avril 2014
- Manuscrit #6* ..... 119  
**Venail R**, Fall M, del Río R, Talavera S, Labuschagne K, Balenghien T, Garros C, Cêtre-Sossah C, Miranda M, Pagès N, Venter G, Carpenter S and Baldet T. Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): a multicentric study using a modified WHO standard assay.  
Soumis à Parasites & Vectors, le 13 janvier 2015
- Manuscrit #7* ..... 149  
**Venail R**, Balenghien T, Carpenter S and Baldet T. Assesment of the efficiency of insecticide formulations against *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) using a novel approach.  
À soumettre à Veterinary Parasitology

*Manuscrit #8* ..... 161

**Venail R**, Lachance S, Lhoir J, Rakotoarivoany I, Garros C, Balenghien T, Carpenter S and Baldet T. Feeding inhibition and lethal properties of various essential oils against adult *Culicoides* biting midges.

En préparation

*Manuscrit hors thèse #9* ..... 219

Viennet E, Garros C, Rakotoarivony I, Allène X, Gardès L, Lhoir J, Fuentes I, **Venail R**, Crochet D, Lancelot R, Riou M, Moulia C, Baldet T and Balenghien T., 2014. Host-seeking activity of bluetongue virus vectors: endo/exophagy and circadian rhythm of *Culicoides* in Western Europe.

PLoS One, 2014, 7(10):e48120  
doi:10.1371/journal.pone.0048120

# Liste des communications scientifiques

---

## Communications orales:

**Venail R (2014)** Méthodes de lutte contre les *Culicoides* européens, vecteurs de virus émergents. Conseil Scientifique et Technique de l'EID Méditerranée. 13 novembre 2014. Montpellier, France.

**Venail R (2014)** Perspectives in *Culicoides* control. EDENext Meeting CBD group. 26-28<sup>th</sup> March 2014. Rovaniemi, Finland

**Venail R (2013)** *Culicoides* control. EDENext PhD & Post-Doc Meeting. 18-19<sup>th</sup> March 2013. Barcelona, Spain

**Venail R (2012)** *Culicoides* control in Europe. 20<sup>th</sup> Dec 2012. Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

**Venail R, Balenghien T, Baldet T, Guis H, Setier-Rio ML, Delécolle JC, Mathieu B, Tran A, Martinez D, Languille J, & Garros C (2012)** Assessing diversity and abundance of vector populations at a national scale: example of *Culicoides* surveillance in France after bluetongue virus emergence. 18<sup>th</sup> Conference E-SOVE, 8-11<sup>st</sup> Oct 2012, Montpellier, France

**Venail R (2012)** *Culicoides* control. EDENext PhD & Post-Doc Meeting 26-29<sup>th</sup> March 2012, Izmir, Turkey

**Venail R (2011)** *Culicoides*-borne diseases. Intervention and control. EDENext Meeting 29–31<sup>st</sup> March 2011, Budapest, Hungary

Garros C, Mathieu B, Viennet E, Delécolle JC, Setier-Rio M-L, Allène X, Gardés L, Rakotoarivoany I, **Venail R**, Guis H, Baldet T, Cêtre-Sossah C, Balenghien T (2011) 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. GCE meeting, 5-9<sup>th</sup> March 2011, Bangkok, Thailand

## Posters:

**Venail R, Lachance S, Lhoir J, Rakotoarivoany I, Garros C, Balenghien T, Carpenter S and Baldet T (2013)** Feeding inhibition and lethal properties of various essential oils against adult *Culicoides* biting midges. EDENext PhD & Post-Doc Meeting, 18-19<sup>th</sup> March 2013. Barcelona, Spain

del Rio R, **Venail R**, Monerris R, Paredes-Esquivel C, Miquel M, Lucientes J and Miranda M (2012) Sensitivity of *Culicoides* biting midges to deltamethrin determined by the WHO standard susceptibility test. 18th Conference E-SOVE 2012. 8-11<sup>th</sup> Oct 2012. Montpellier, France

Lachance S, Baldet T, **Venail R**, Balenghien T and Garros C (2012) Repellent properties of various essential oils and synthetic products against *Culicoides nubeculosus* and *Culicoides obsoletus*. 18th Conference E-SOVE 2012. 8-11<sup>th</sup> Oct 2012. Montpellier, France

Balenghien T, Garros C, Delécolle JC, Setier-Rio ML, Akaddar A, Allène X, Delécolle D, Gardès L, Mathieu B, Rakotoarivoany I, **Venail R**, Drouet M and Baldet T (2012) Monitoring of *Culicoides* populations in France. 18th Conference E-SOVE. 8-11<sup>th</sup> Oct 2012. Montpellier, France



**INTRODUCTION**

**GÉNÉRALE**





La classe des *Insecta* est le groupe d'organismes le plus abondant sur la Terre. Plus d'un million d'espèces ont été identifiées jusqu'à présent, mais selon les estimations, ce chiffre pourrait se situer entre 3 et 30 millions (Mora *et al.*, 2011 ; Gaston, 2013). Si l'on considère l'ensemble de la diversité connue du règne animal, les insectes représenteraient donc 90 % des espèces recensées (May, 1988). Les hypothèses avancées pour expliquer la grande diversification du groupe sont la petite taille des individus qui faciliterait la dispersion et la colonisation des territoires et l'exploitation de nouvelles niches. L'acquisition du vol, le nombre de générations, l'existence de stades d'arrêt de développement (diapause) et la plasticité génétique ont permis cette large diversité adaptative (Southwood *et al.*, 1979 ; Gullan and Cranston, 2010). Le rôle des insectes dans le fonctionnement des écosystèmes est primordial. Pour l'homme, il peut être considéré comme hautement bénéfique (exemple de la pollinisation en agriculture) ou nuisible (exemple des ravageurs des cultures). Les insectes peuvent ainsi avoir un rôle pathogène pour les vertébrés, en étant allergisants, urticants, vésicants, venimeux, ou être responsables de la transmission d'agents pathogènes (vecteur biologique ou mécanique) (Rodhain and Pérez, 1985). Les insectes hématophages occupent une place toute particulière à cause des nuisances considérables qu'ils peuvent occasionner, mais surtout à cause des conséquences sanitaires des pathogènes qu'ils peuvent transmettre (Rodhain and Pérez, 1985). Globalement, les maladies à transmission vectorielle représentent 17 % de la charge mondiale estimée des maladies infectieuses touchant les populations humaines, le paludisme étant la maladie vectorielle responsable du plus grand nombre de décès dans le monde (OMS). Outre leur rôle de vecteurs, les insectes hématophages peuvent aussi constituer une nuisance importante de par leurs piqûres. Ainsi, l'impact des piqûres de certaines espèces du genre *Culicoides* Latreille (Diptera : Ceratopogonidae) sur les activités touristiques et économiques (exploitation forestière, agriculture) est bien documenté (Hendry and Godwin, 1988 ; Linley *et al.*, 1988 ; Lehane 2005). En Colombie, les piqûres importantes et répétées des moucheron de l'espèce *Culicoides pachymerus* Lutz sont considérées comme un problème de santé publique provoquant des problèmes dermatologiques (Santamaría *et al.*, 2008).

Les interactions pathogène/vecteur/hôte sont soumises à des contraintes génétiques, climatiques, environnementales, démographiques et sociétales, qui peuvent induire une réduction de la transmission ou l'émergence de maladies. Les trente dernières années ont vu l'émergence ou la recrudescence de plusieurs maladies à transmission vectorielle (Chikungunya, dengue, fièvre *West Nile*, fièvre catarrhale ovine, maladie de Lyme) (Kilpatrick *et al.*, 2013). L'émergence d'une maladie à transmission vectorielle peut résulter de l'introduction et de la circulation d'un agent pathogène dans une nouvelle zone ou une nouvelle population d'hôtes (Morse, 1995). L'agent pathogène peut être introduit par l'arrivée d'un hôte vertébré infecté dans un environnement habité par un vecteur compétent ou par l'arrivée d'un vecteur infecté compétent dans un environnement peuplé par des hôtes vertébrés sensibles (de la Rocque *et al.*, 2011).

L'augmentation de ces émergences a contraint les autorités sanitaires et les pouvoirs publics à agir en vue de protéger les populations cibles et réduire l'incidence de ces maladies. La vaccination des populations sensibles est considérée comme une réponse efficace pour

réduire les pertes liées aux maladies et pour tenter d'interrompre le cycle entre les hôtes virémiques et les vecteurs. Mais, les vaccins ne sont pas toujours disponibles ou d'un usage opérationnel difficile. De plus, la vaccination de la faune sauvage (pouvant constituer un éventuel réservoir de l'agent pathogène), est une tâche complexe à mettre en place. Il n'existe pas de données probantes démontrant l'efficacité de l'utilisation active ou passive d'animaux non sensibles afin d'empêcher la transmission des maladies en détournant le vecteur de l'hôte à protéger (zooprophylaxie). Ce détournement, qu'on peut assimiler à un effet de dilution, peut augmenter les densités de vecteurs et en conséquence augmenter la transmission. La lutte antivectorielle vise à réduire les populations des espèces impliquées dans la transmission des pathogènes ou à interrompre le contact hôte/vecteur en utilisant différentes méthodes selon les vecteurs ciblés et selon les contextes épidémiologiques et socio-économiques. La lutte antivectorielle comprend la lutte biologique, la lutte écologique, la lutte chimique, l'éducation et la mobilisation sociale, mais aussi l'intégration de toutes ces méthodes dans une lutte antivectorielle intégrée.

Parmi les maladies virales transmises par des vecteurs et émergentes en Europe, la fièvre catarrhale ovine (FCO) et la maladie de Schmallenberg ont eu un impact considérable dans les filières bovines et ovines, engendrant des problèmes économiques majeurs. Les moucheron hémato-phages du genre *Culicoides* assurent la transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine, appartenant au genre *Orbivirus* (Reoviridae) (Du Toit, 1944) et du virus de Schmallenberg du genre *Orthobunyavirus* (Bunyaviridae) (Hoffmann *et al.*, 2013).

La FCO est une maladie non contagieuse, potentiellement mortelle chez les ovins, qui s'exprime dans une moindre mesure chez les bovins, caprins et autres ruminants sauvages. Les symptômes varient en fonction du pouvoir pathogène des sérotypes et de la sensibilité des races ovines (Maclachlan and Gard, 2009). De par son grand pouvoir de diffusion et les graves conséquences socio-économiques et sanitaires, la FCO fait partie de la liste des maladies notifiables à l'OIE. Elle est signalée pour la première fois en Afrique du Sud dans le *Report of the Cattle and Sheep Diseases Commission* de 1876 après l'introduction de moutons de race Mérinos d'origine européenne dans la colonie du Cap. Les animaux malades présentaient des inflammations aux niveaux des pieds et de la bouche (Henning, 1956). La maladie se répand vers le nord sur le continent africain, et malgré quelques incursions sporadiques dans le sud de l'Europe, elle est considérée pendant longtemps comme une maladie exotique en Europe jusqu'à ce qu'elle soit diagnostiquée en 1998 dans l'ouest du bassin méditerranéen (Panagiotatos, 2004). Le mouvement des animaux malades (Mellor *et al.*, 2000) et la dispersion passive par le vent de *Culicoides* infectés, étant possible sur des grandes distances (Sellers *et al.*, 1978 ; Sellers and Pedgley, 1985), auraient contribué à sa propagation. Les émergences de FCO dans l'ouest du bassin méditerranéen ont été associées à la présence de l'espèce afro tropicale *Culicoides imicola* Kieffer, vecteur confirmé du virus de la FCO (Mellor *et al.*, 2008) Mais, en août 2006, le sérotype 8 apparaît soudainement dans le nord de l'Europe, où *C. imicola* n'est pas présent, touchant 5 états membres de l'Union européenne (Allemagne, Belgique, France, Luxembourg et Pays-Bas), puis s'étend en 2007 et 2008 à l'ensemble de l'Europe occidentale. En absence du vecteur historique de la maladie *C. imicola* (Du Toit, 1944), la transmission a été assurée par les espèces de *Culicoides* autochtones suite à l'introduction du virus. L'émergence du sérotype 8 de la FCO dans toute

l'Europe entre 2007 et 2008 a constitué une crise sanitaire sans précédent qui a eu des conséquences graves pour les filières ovines et bovines impactant le commerce international d'animaux et de leurs produits et causant des pertes économiques importantes (Velthuis *et al.*, 2010). Parallèlement, un autre sérotype (le 1) présent au Maghreb en 2006, s'est propagé vers le nord passant par le sud de l'Espagne et du Portugal en 2007 pour atteindre le pays Basque, et une large part du sud-ouest de la France (Wilson and Mellor, 2009). Pendant la même période, une incursion anecdotique du sérotype 6 est identifié aux Pays-Bas, l'utilisation illégale d'un vaccin atténué a été évoqué pour expliquer son introduction, comme pour le sérotype 11, identifié en 2009 en Belgique, lui aussi proche d'une souche vaccinale produite en Afrique du Sud (Wilson and Mellor, 2009). À ce jour 26 sérotypes sont identifiés et récemment, en mai 2014, un nouveau sérotype a été isolé chez des caprins en Corse, il s'agirait du sérotype 27.

Le virus de Schmallerberg, a été détecté plus récemment, en novembre 2011 en Allemagne. Les signes cliniques de cette maladie qui n'affecte que les ruminants, incluent fièvre, diarrhée et une diminution de la production de lait (Hoffmann *et al.*, 2013). Mais surtout cette maladie est responsable de malformations congénitales et de mortalités (Garigliany *et al.*, 2012). Il a été démontré que les *Culicoides* paléarctiques sont responsables de la transmission de ce virus en Europe (De Regge *et al.* 2012 ; Rasmussen *et al.* 2012 ; Elbers *et al.* 2013 ; Goffredo *et al.* 2013 ; Larska *et al.* 2013 ; Veronesi *et al.* 2013 ; Balenghien *et al.* 2014). Dès son apparition en 2011, le virus Schmallerberg s'est rapidement étendu en Europe (Doceul *et al.* 2013) à une vitesse de progression du front supérieure (EFSA, 2014) à celle observée pour le sérotype 8 de la FCO (Pioz *et al.* 2011).

Les enjeux socio-économiques et sanitaires liés à l'émergence des maladies virales animales transmises par les *Culicoides* en Europe sont considérables (Hoogendam, 2007, Velthuis *et al.* 2010 ; Velthuis *et al.* 2011). Les mesures de police sanitaire relative à la lutte contre la FCO prévoient notamment des campagnes de vaccination de masse et la mise en place de méthodes de lutte anti-vectorielle. En l'absence de vaccins efficaces ou disponibles au moment de la crise sanitaire, les mesures de lutte anti-vectorielle restent un des seuls moyens disponibles pour réduire la transmission. Jusqu'à récemment, l'efficacité des mesures de LAV mises en œuvre contre les *Culicoides* en Europe n'était pas connue, bien que préconisées dans le cadre des mesures de police sanitaire. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse s'inscrit, avec le soutien du projet européen EDENext *Biology and control of vector-borne infection in Europe* (FP7-HEALTH-2010-Single-stage, <http://www.edenext.eu/>).

Le défi méthodologique de ce travail est complexe puisque les procédures de référence pour évaluer l'efficacité des insecticides et des répulsifs contre les *Culicoides* sont inexistantes. Historiquement, les mesures de LAV ont été largement utilisées contre les populations de moustiques en particulier dans le cadre de la lutte contre le paludisme (Carnevale *et al.* 2009). Depuis les années 1980, l'OMS a mis en place une série de procédures afin de déterminer l'efficacité des mesures de contrôle mises en œuvre (WHO, 1981). Ces procédures sont aujourd'hui considérées comme des références pour définir la sensibilité aux insecticides des populations cibles de vecteurs, évaluer l'efficacité des

formulations insecticides utilisées, et enfin détecter l'existence de phénomènes de résistance aux insecticides dans ces populations. Le modèle moustique est de ce fait très largement documenté, comparé aux autres modèles d'arthropodes d'intérêt, et les protocoles d'études optimisés pour ce groupe.

D'autre part, la collecte et la manipulation de *Culicoides* vivants présentent des contraintes techniques dues à la saisonnalité marquée de certaines espèces et à leurs petites tailles qui augmentent leurs sensibilités aux conditions extérieures lors de la manipulation. À ce jour, une seule espèce de *Culicoides* à distribution paléarctique a pu être maintenue en conditions d'élevage : *Culicoides nubeculosus* Meigen. Cependant, sur le terrain, cette espèce n'est pas vectrice des virus de la fièvre catarrhale ovine et de Schmallenberg.

## Objectifs de la thèse

---

Les *Culicoides* sont les vecteurs du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) et d'autres agents pathogènes d'intérêt vétérinaire. Jusqu'à présent, la lutte contre la FCO en Europe s'est appuyée sur des mesures de restriction des mouvements d'animaux, l'utilisation de vaccins inactivés (et secondairement atténués) et des mesures de lutte anti-vectorielle pour tenter de réduire le taux de contact entre les *Culicoides* et les hôtes via la stabulation des animaux et l'utilisation sélective d'insecticides (pulvérisation dans les bâtiments d'élevage et les moyens de transport, application sur les animaux). L'utilisation de vaccins inactivés monovalents reste le moyen le plus efficace pour lutter contre la FCO comme cela a été démontré en Europe notamment lors de l'épizootie liée au sérotype 8 de la FCO. Mais en période de crise, en cas d'épidémie pour une région nouvellement touchée ou en cas de l'apparition d'un nouveau sérotype ou d'un nouveau virus, quand aucun vaccin n'est disponible, la lutte contre les vecteurs peut s'avérer le seul moyen disponible immédiatement pour tenter de diminuer le contact hôte-vecteur et/ou réduire les populations de vecteurs en dessous des seuils nécessaires à la transmission afin de contrôler la maladie. La lutte anti-larvaire, largement employée contre certaines espèces de moustiques, ne peut être utilisée contre la plupart des espèces de *Culicoides* vectrices à cause de la petite taille et de la dispersion des habitats larvaires (bouses de ruminants), à cause de l'ubiquité des gîtes larvaires (matières organiques animales ou végétales en décomposition) ou de l'absence de données précises sur l'identification des autres habitats. Par conséquent, seules les méthodes visant les adultes sont actuellement utilisées en Europe pour tenter de protéger les hôtes ou réduire les populations de *Culicoides* et ainsi diminuer le taux de transmission. Dès le début de la crise FCO de 2006-2008, différentes études ont consisté à évaluer l'efficacité de ces méthodes mais en utilisant diverses approches et méthodologies (détaillées dans le Chapitre 1: Généralités), rendant difficile la comparaison entre études et limitant la prise en compte de leurs résultats dans les recommandations nécessaires à une meilleure gestion des maladies transmises par les *Culicoides* en Europe.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est, après avoir proposé un cadre méthodologique standardisé, **d'évaluer l'efficacité de produits insecticides contre les espèces de *Culicoides* vecteurs de virus émergents en Europe** et ainsi répondre au questionnement « Les produits insecticides et répulsifs autorisés en Europe sont-ils efficaces pour le contrôle des *Culicoides* ? ». Pour répondre à cet objectif, nous avons mené des essais expérimentaux en laboratoire et sur le terrain. En l'absence de méthodes standardisées pour l'évaluation des insecticides contre les *Culicoides*, nous avons adapté et modifié des procédures de référence utilisées sur le modèle moustique. Ainsi, ce travail de thèse, propose une série de procédures standardisées qui peuvent être utilisées dans d'autres contextes, afin de combler des lacunes et aider à la prise de décisions concernant le choix des stratégies de lutte antivectorielle.

Dans un premier temps, afin de replacer le cadre théorique et conceptuel de ce travail de thèse, nous exposons des éléments nécessaires à la compréhension des objectifs et de la démarche que nous avons proposée.

Dans un second temps, afin de **déterminer la sensibilité des espèces de *Culicoides* d'importance vétérinaire aux substances actives** des insecticides les plus utilisés en Europe, nous avons adapté le protocole de référence de l'OMS (test en tube pour évaluer la sensibilité des moustiques aux substances actives insecticides) afin de l'utiliser avec les *Culicoides*. Nous avons mis au point la procédure en laboratoire avec la seule espèce de *Culicoides* européenne actuellement disponible en élevage, *C. nubeculosus*, et par la suite, nous avons testé plusieurs substances actives contre cette espèce et contre deux espèces vectrices de la FCO en Europe, *C. imicola* et *C. obsoletus* Meigen, dont les individus ont été collectés sur le terrain. Les tests réalisés nous ont permis d'obtenir des valeurs de référence, jusqu'à présent inexistantes, sur la sensibilité des *Culicoides* indispensables pour les essais sur l'efficacité de produits insecticides et répulsifs. Ces valeurs de référence (*Manuscrit #2*) ont été confirmées sur différentes populations de *C. imicola* et *C. obsoletus* à travers l'Europe et l'Afrique (*Manuscrits #3, 4 et 5*)

Dans un troisième temps, nous avons cherché à **évaluer l'efficacité de produits insecticides appliqués sur les animaux et de répulsifs contre les *Culicoides*** et à répondre aux questions « Les formulations disponibles ont-elles un effet létal sur les *Culicoides* ? » et « Protègent-elles les animaux contre les piqûres de *Culicoides* ? ». Nous avons mis en place deux approches expérimentales, l'une pour évaluer l'efficacité létale des traitements d'animaux avec des formulations adulticides (*pour-on*, pulvérisation et bains), l'autre pour évaluer l'efficacité répulsive des produits d'origine synthétique ou végétale. Nous avons mis au point les procédures au laboratoire avec *C. nubeculosus*, et testé sur le terrain les répulsifs contre *C. obsoletus*. Les résultats obtenus dans notre première approche ont révélé que les tests que nous avons réalisés en laboratoire (*Manuscrit #6*) et ceux réalisés sur le terrain (*Manuscrit #2*) sont comparables et qu'ils confirment une faible persistance des formulations épicutanées à base de pyréthrinoïdes disponibles pour le traitement des animaux. La seconde approche a révélé que des produits d'origine végétale pouvaient être aussi performants que le répulsif synthétique de référence, le DEET, en repoussant les *Culicoides* et en inhibant leur gorgement (*Manuscrit #7*).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à **évaluer l'efficacité de matériaux imprégnés ou traités d'insecticide**, pour répondre aux questions « Les moustiquaires imprégnées diminuent-elles le passage des *Culicoides* ? » et « exercent-elles un effet létal sur les *Culicoides* après contact ? ». Nous avons, en premier lieu, cherché à évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées en termes de réduction du taux de passage et de mortalité induite après contact afin de limiter le contact *Culicoides*/hôte. Nous avons mis au point, en laboratoire avec *C. nubeculosus*, une procédure en nous basant sur le test en tunnel de l'OMS et nous avons testé différentes moustiquaires imprégnées industriellement et à longue durée d'action (principe des Long Lasting Impregnated Nets). Les moustiquaires imprégnées peuvent réduire considérablement le passage des *Culicoides*, mais leur efficacité dépend de la

taille de la maille du tulle moustiquaire et de l'espèce ciblée. Nous avons par la suite cherché à évaluer l'efficacité et la persistance d'une peinture insecticide à usage vétérinaire appliqué sur un support dur (ciment) en termes de mortalité induite suite au contact. Nous avons utilisé le test en cône, procédure de référence de l'OMS, pour évaluer l'efficacité d'un support traité d'insecticide. La peinture testée semble peu efficace contre les *Culicoides*. Néanmoins, elle est efficace contre les réduves, les moustiques et les phlébotomes. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer son efficacité contre les *Culicoides*.

Enfin, une **discussion générale** permet de rassembler tous les résultats et de les analyser dans leur ensemble. Pour finir, une partie **conclusions et perspectives** permet de confronter les résultats obtenus aux connaissances actuelles sur la lutte contre les *Culicoides* et les autres vecteurs afin de proposer des concepts pratiques pour de futures études à poursuivre en laboratoire et sur le terrain.





# **Chapitre 1 :**

## **Généralités**



## 1.1 Les *Culicoides* : biologie et écologie

Les moucheron du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) sont des diptères piqueurs de petite taille (1 à 3 mm de longueur) (Figure 1.1). Ils ont été décrits pour la première fois, comme les moustiques, sous la dénomination du genre *Culex* en 1713 par G. Derham. En 1809, P. Latreille définit le genre *Culicoides*. Aujourd'hui, environ 1 300 espèces sont décrites dans le monde (Borkent and Wirth, 1997) et au moins 80 ont été répertoriées en France.

Les *Culicoides* ont une distribution très large dans le monde à l'exception de quelques régions dont la Nouvelle Zélande, la Patagonie, l'Antarctique et quelques îles hawaïennes. Leur distribution altitudinale se situe entre le niveau de la mer et à plus de 4 000 m (Mellor *et al.* 2000). Les femelles de la plupart des espèces (96 % des 1 300) sont hématophages (Meiswinkel and Braack, 1994) et leur piqûre est généralement douloureuse. Les hôtes privilégiés peuvent être des mammifères, des oiseaux, des reptiles, des amphibiens et même d'autres insectes selon les espèces (Meiswinkel and Braack, 1994). Dans les régions côtières tropicales ou de tourbières en Europe du nord, certaines espèces sont très abondantes et agressives, causant des nuisances importantes pour les populations humaines et leurs activités (Carpenter *et al.*, 2008 ; Santamaría *et al.*, 2012), ou les animaux domestiques (Logan *et al.*, 2010). La plupart des espèces de *Culicoides* ont une activité crépusculaire, piquant préférentiellement le matin à l'aube et le soir avant le coucher du soleil, mais, certaines espèces paléarctiques peuvent aussi piquer pendant la journée comme *Culicoides nubeculosus*, *Culicoides newsteadi* Austen et *Culicoides vexans* Stager.

Au cours de leur vie, les *Culicoides* passent par 6 stades immatures (œuf, 4 stades larvaires et nymphe) et un stade adulte (Figure 1.5). Après l'accouplement (Figure 1.4), les femelles prennent leurs repas de sang pour apporter les protéines essentielles à la maturation et au développement des œufs. La ponte a lieu généralement de 2 à 8 jours après le repas de sang selon les conditions extérieures. Les sites de pontes et le nombre d'œufs sont variables selon les espèces. Les œufs sont déposés généralement dans des endroits humides, chargés en matière organique, animale ou végétale, en décomposition : cela inclut les zones au sol présentant des déchets organiques (feuilles mortes, fèces), les trous d'arbres et les abords de zones en eau. Certaines espèces en région paléarctique sont connues pour leurs préférences halophiles comme *Culicoides salinarius* Kieffer, *C. circumscriptus* Kieffer, *C. maritimus* Kieffer, *C. submaritimus* Dzhafarov et *C. newsteadi*. Les œufs (entre 10 et 700) sont clairs et brunissent rapidement à l'air (Figure 1.2). Leurs sites de repos restent peu connus, mais il est décrit que pendant la journée, les *Culicoides* se reposent sous le feuillage des arbres.



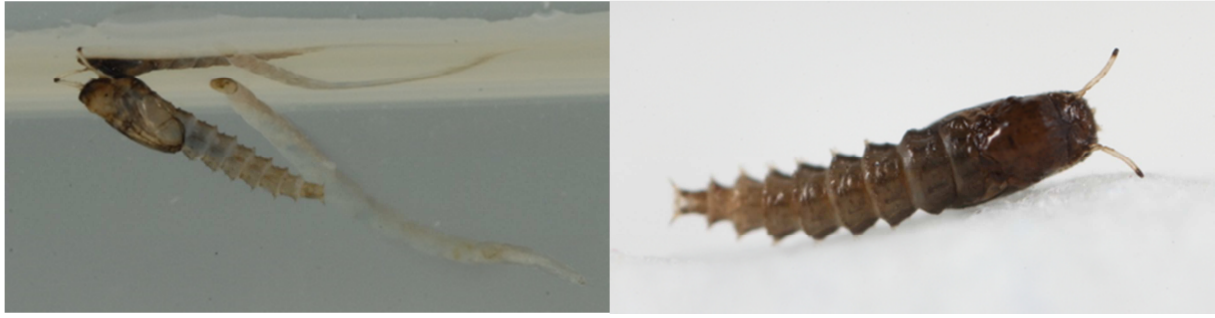
**Figure 1.1** *Culicoides nubeculosus* femelle non gorgée (à gauche) et gorgée (à droite) (photos prises par J. B. Ferré, EID Méditerranée)



**Figure 1.2** Œufs de *Culicoides nubeculosus* (photo prise par J. B. Ferré, EID Méditerranée)

Les larves sont vermiformes et de longueur variable selon le stade de développement, entre 0,3 mm et 1 cm (Figure 1.3). Elles sont enfouies dans les premiers centimètres du substrat, mobiles, très actives et se nourrissent de matière organique, de bactéries et de protozoaires présents dans le milieu. Le développement larvaire comprend quatre stades et peut durer entre 2 semaines en conditions estivales, jusqu'à plusieurs mois en conditions hivernales. Au terme du quatrième stade, les larves remontent en surface et cherchent un support pour se transformer en nymphe (Figure 1.3).

Les nymphes ont une forme très caractéristique avec un céphalothorax bien distinct de l'abdomen et une longueur variable entre 1 et 3 mm (Figure 1.3). À ce stade, le sexe est défini et des différences morphologiques entre les deux sexes peuvent être observées. En effet, les structures génitales mâles (pinces génitales et processus) sont visibles à la base de l'abdomen. Les nymphes sont mobiles mais peu actives et ne se nourrissent pas, ce qui favorise leur hibernation en zone tempérée. Fixées à un support physique, les nymphes donnent naissance par une fente dorsale à un jeune adulte après 2 à 10 jours.



**Figure 1.3** Larve et nymphes de *Culicoides nubeculosus* (photos prises à gauche par J. B. Ferré, EID Méditerranée et à droite par J. Lhoir, Cirad)

Les adultes (ou imagos) ont un corps composé, comme tous les insectes, d'une tête, d'un thorax et d'un abdomen (Figure 1.4). La tête porte des yeux composés, une paire d'antennes orientés vers l'avant et des pièces buccales orientées de haut en bas (position hypognathe). L'appareil buccal est de type piqueur en forme de trompe placée entre deux palpes maxillaires. Le thorax porte les trois paires de pattes et les ailes. L'abdomen porte à sa partie terminale les structures génitales mâles ou femelles. En plus de l'appareil reproducteur différencié, le dimorphisme sexuel entre les *Culicoides* mâles et femelles se caractérise principalement par des anatomies externes différentes. Le mâle possède un corps et des ailes plus allongés, des antennes plumeuses et une pince génitale (hypopygium) (Figure 1.4). Les adultes des deux sexes ont une alimentation glucidique à base de nectar de fleurs. Seules les femelles piquent des animaux pour obtenir les apports protéiniques, contenus dans le sang, nécessaires à la maturation des œufs.

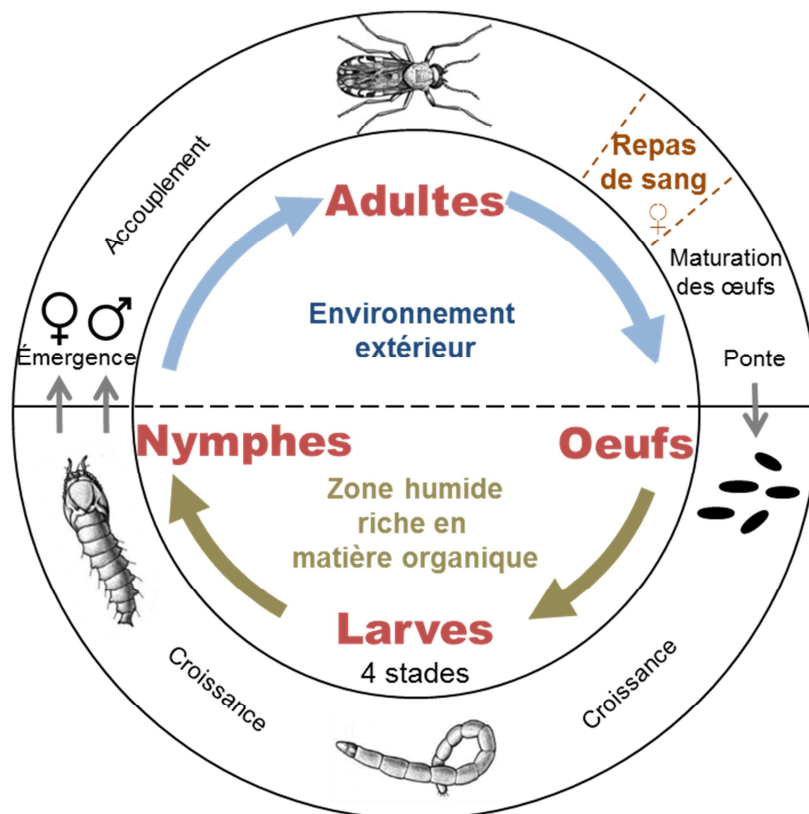
L'accouplement se fait en vol, sur un substrat (Figure 1.4) et même pendant le repas de sang de la femelle (Kettle, 1962). Après l'accouplement, la femelle stocke les spermatozoaires des mâles dans les spermathèques et recherche un hôte pour prendre son repas de sang. Une fois les œufs matures, ils sont pondus et la femelle est prête pour prendre un autre repas de sang et faire une autre ponte. Le temps écoulé entre deux repas de sang, ou cycle gonotrophique, est variable selon l'espèce et les conditions environnementales, telles que l'humidité, la température et la luminosité (Mair and Blackwell, 1998). La longévité des adultes est aussi variable selon l'espèce et les conditions. En moyenne, elle est de 10 à 20 jours, mais peut atteindre 90 jours. Les mâles ont une longévité plus courte que les femelles (Mellor *et al.* 2000).

La dispersion active des *Culicoides* adultes est supposée être faible, de l'ordre du kilomètre, ces insectes étant réputés mauvais voiliers. Ils ne se déplaceraient que de quelques centaines de mètres par jour et ne s'éloigneraient pas des lieux de repas et de ponte (Mellor *et al.*, 2000). Néanmoins, des études de marquage/capture/recapture ou les résultats d'analyses de repas de sang montrent une capacité de dispersion supérieure (Garros *et al.*, 2011, Kirkeby *et al.*, 2013, Sanders and Carpenter, 2014). Parallèlement, ils peuvent être transportés facilement par les vents sur de longues distances. Cette dispersion passive par les vents faciliterait la colonisation des îles ou leur arrivée sur d'autres continents (Braverman and

Chechik, 1996) et contribuerait à la diffusion des agents pathogènes dont ils sont vecteurs lorsque des spécimens transportés par le vent sont infectés (Burgin *et al.*, 2013).



**Figure 1.4** Accouplement de *Culicoides nubeculosus*: mâle à gauche, et femelle à droite (photos prises par J. B. Ferré, EID Méditerranée)



**Figure 1.5** Cycle de vie des *Culicoides* (source des dessins <http://illuminationstudios.com/>)

Le *Manuscrit #1* (Parasitology Research Monographs. Vol 3. 2012) a été réalisé en synthétisant les données d'abondance et de diversité des *Culicoides* capturés lors des activités de surveillance menées en France de 2002 à 2008. Ce manuscrit n'entrant pas rigoureusement dans l'objectif principal de la thèse, il est présenté ici dans le cadre des généralités sur la biologie et l'écologie des *Culicoides* d'intérêt vétérinaire.





## Chapter 4

# Assessing Diversity and Abundance of Vector Populations at a National Scale: Example of *Culicoides* Surveillance in France After Bluetongue Virus Emergence

R. Venail, T. Balenghien, H. Guis, A. Tran, M.-L. Setier-Rio, J.-C. Delécolle, B. Mathieu, C. Cêtre-Sossah, D. Martinez, J. Languille, T. Baldet, and C. Garros

**Abstract** Biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) are small hematophagous dipterans responsible for transmitting major viruses to livestock such as African horse sickness virus in equids, and epizootic haemorrhagic disease and bluetongue viruses (BTV) in ruminants. Between 1998 and 2005, BTV outbreaks occurred into many countries around the Mediterranean basin associated with the northward extension of *C. imicola*, which colonized new Mediterranean territories in the past decades due to the global increase of temperatures. In August 2006, BTV serotype 8 (BTV-8) was unexpectedly introduced in the Netherlands and was intensively transmitted by autochthonous Palaearctic *Culicoides* species, leading in 2007 and 2008 to a major sanitary crisis in whole continental Europe with huge economic losses due to animal movement restrictions. This chapter presents a synthesis of the data gathered through the different entomological surveillance networks implemented in France since 2000 when *C. imicola* was recorded for

---

R. Venail (✉) • M.-L. Setier-Rio  
EID Méditerranée, 34184 Montpellier, France  
e-mail: [rvenail@eid-med.org](mailto:rvenail@eid-med.org)

T. Balenghien • H. Guis • C. Cêtre-Sossah • D. Martinez • T. Baldet • C. Garros (✉)  
Cirad, UMR Contrôle des Maladies, 34398 Montpellier, France  
e-mail: [claire.garros@cirad.fr](mailto:claire.garros@cirad.fr)

A. Tran  
Cirad, UPR Animal et Gestion Intégrée des Risques, 34398 Montpellier, France

J.-C. Delécolle,  
UdS, IPPTS, Faculté de Médecine, 67000 Strasbourg, France

B. Mathieu  
EID Méditerranée, 34184 Montpellier, France  
UdS, IPPTS, Faculté de Médecine, 67000 Strasbourg, France

J. Languille  
Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire, Paris, France

H. Mehlhorn (ed.), *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases*,  
Parasitology Research Monographs 3, DOI 10.1007/978-3-642-28842-5\_4,  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

77

the first time in France. These networks aimed at first to monitor the spread and establishment of the invasive *C. imicola* and then from 2006 onwards, to study the diversity and dynamics of autochthonous *Culicoides* species. The data collected enable to describe for the first time the spread of *C. imicola* into French mainland, propose an updated list of *Culicoides* species for France, describe the *Culicoides* species distribution and seasonal dynamics, and report assays to identify BTV in field-collected *Culicoides* during outbreaks.

**Keywords** Bluetongue • *Culicoides* • *Culicoides imicola* • Entomological surveillance • France

Assessing accurately diversity and abundance of organisms is one of the most difficult challenges in ecological studies, especially for taxonomic groups such as insects, which can be highly diverse and abundant (Southwood and Henderson 2000). Efficiency of this assessment has decisive sanitary interests when target groups are vectors of pathogens. Surveillance of insect vector populations may aim to (1) detect introduction of invasive species into a new territory, (2) detect the presence and circulation of a given pathogen in insect population, before appearance of vertebrate cases and (3) follow up characteristics of vector populations to help assess pathogen transmission risk. Sampling strategies depend on the objectives as illustrated by the changes in surveillance system of *Culicoides* populations in France from 2001 to 2009 due to changes in bluetongue virus (BTV) transmission.

Biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) are small hematophagous dipterans responsible for nuisance limiting touristic industry, causing acute allergic dermatitis in horses and transmitting major viruses to livestock such as African horse sickness virus in equids, and epizootic haemorrhagic disease and bluetongue viruses in ruminants (Mellor et al. 2000, 2009). Bluetongue was reported for the first time in the Europe in 1924 in Cyprus, which was until 1998 the only European area where bluetongue was endemic (Gambles 1949). Elsewhere, BTV presence was limited to periodic incursions in the south of the Iberian Peninsula and in some Greek islands. These zones, where incursions occurred, coincided with the distribution area of *C. imicola*, which is considered the main BTV vector in Africa and in the Middle East (Du Toit 1944). Indeed, *C. imicola* was first reported in the European continent in southern Spain and in southern Portugal (Mellor et al. 1983, 1985), and this species was not recorded outside the South of Iberian Peninsula despite *Culicoides* investigation in the 1970s (Mellor et al. 2000). At that time, some Palaeartic species were considered able to act as secondary vector such as *C. obsoletus*, based on virus isolations (Jennings and Mellor 1988). Between 1998 and 2005, BTV outbreaks occurred into many countries around the Mediterranean basin (Mellor and Wittmann 2002). This transmission was associated with the northward extension of *C. imicola*, which colonized new Mediterranean territories in the past decades favoured by the global increase of temperatures (Guis et al. 2012; Purse et al. 2005). In August 2006, BTV serotype



8 (BTV-8) was unexpectedly introduced near Maastricht (the Netherlands) and was intensively transmitted by autochthonous Palaearctic *Culicoides* species (Enserink 2006; Meiswinkel et al. 2008; Mellor et al. 2009; Saegerman et al. 2008), leading in 2007 and 2008 to a major sanitary crisis in whole continental Europe with huge economic losses due to animal movement restrictions (Velthuis et al. 2010).

This chapter presents a synthesis of the data gathered through the different entomological surveillance networks implemented in France since 2000 when *C. imicola* was recorded for the first time in France. These networks aimed at first to monitor the spread and establishment of the invasive *C. imicola* and then from 2006 onwards, to study the diversity and dynamics of autochthonous *Culicoides* species. The data collected enable to describe for the first time the spread of *C. imicola* into French mainland, assess the spatio-temporal variations in species distribution and dynamics, propose an updated list of *Culicoides* species for France, and report assays to identify BTV in field-collected *Culicoides* during outbreaks.

#### 4.1 Overview of *Culicoides* Population Surveillance in France

*Culicoides imicola* was recorded for the first time in France in September 2000 in Corsica (Delécolle and de La Rocque 2002), a Mediterranean island close to the Italian island of Sardinia, just before the emergence of BTV serotype 2 in October 2000. Since then, the French ministry in charge of agriculture mandated the Centre international de coopération en recherche agronomique pour le développement (Cirad), and its associated partners (Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (IPPTS), and l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen (EID-Med)), to implement *Culicoides* trappings in Corsica and in the Mediterranean littoral of French mainland aiming to (1) establish *C. imicola* distribution and dynamics in Corsica and to (2) detect an eventual introduction and establishment of *C. imicola* to French mainland. Then, from 2002 to 2008, surveillance of *C. imicola* populations was implemented in 12 sheep or cattle farms in Corsica with one night trapping every 3 weeks with outdoor traps (Figs. 4.1 and 4.2).

Moreover, from 2002, 19 sites along the Mediterranean coast of the French mainland (involving seven departments (administrative units): Pyrénées-Orientales, Aude, Hérault, Gard, Bouches-du-Rhône, Var and Alpes-Maritimes) (Fig. 4.1) were sampled, one night collection per site every month (Baldet et al. 2004). Additional traps were used in departments close to known established *C. imicola* populations in countries bordering France: in Pyrénées-Orientales and Alpes-Maritimes and in Pyrénées-Atlantiques in 2005 (Fig. 4.1). Indeed, in neighbouring countries, the closest populations of *C. imicola* are present in Spain, in Catalonia Peralda (Girona, Spain) (Sarto i Monteys et al. 2005) and in the Basque Country (Goldarazena et al. 2006), and in Italy (Torina et al. 2004). The Mediterranean littoral surveillance system is largely developed below in the section entitled "First Record of *Culicoides imicola* in Mainland France and Surveillance of Its Extension".

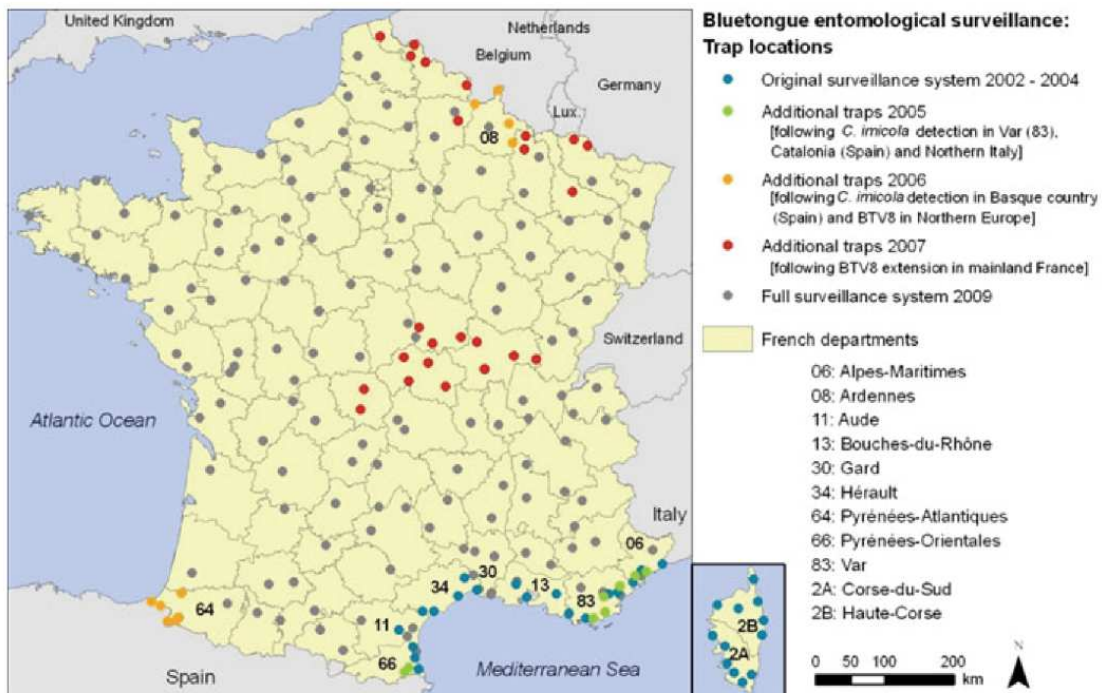


Fig. 4.1 Localization of *Culicoides* surveillance sites in France, 2002–2009

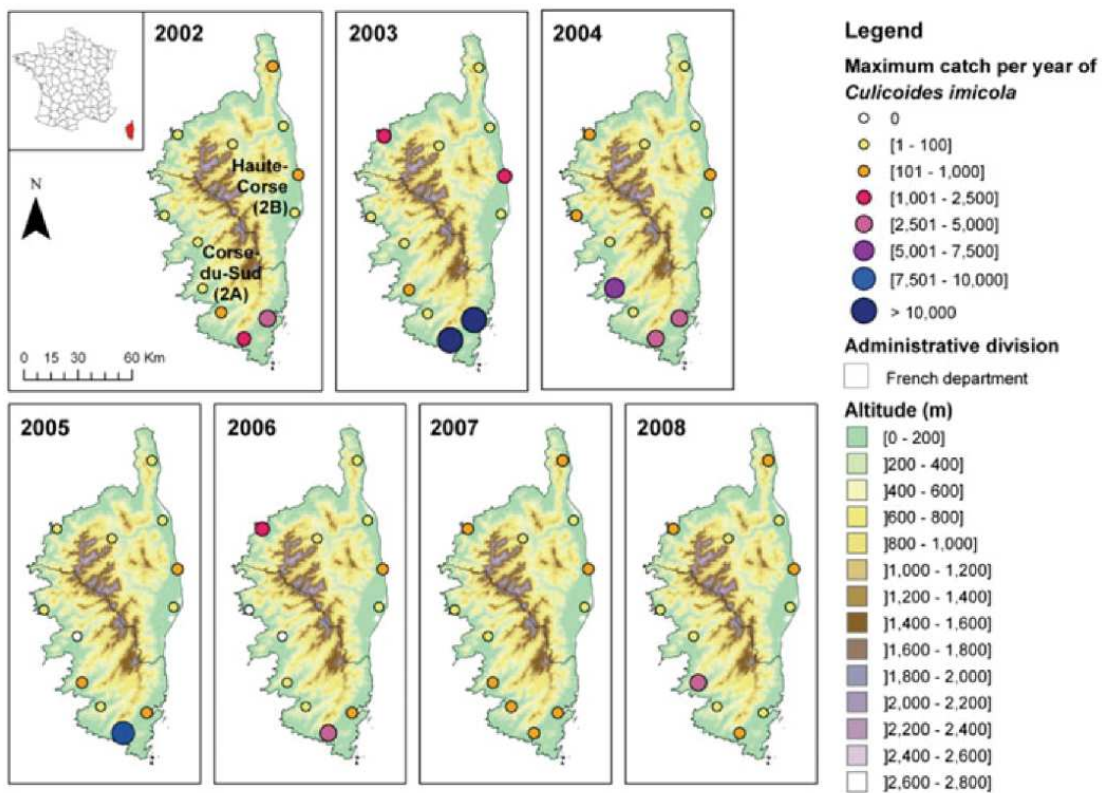


Fig. 4.2 Collection sites in Corsica with maximum catches of *Culicoides imicola* per year from 2002 to 2008

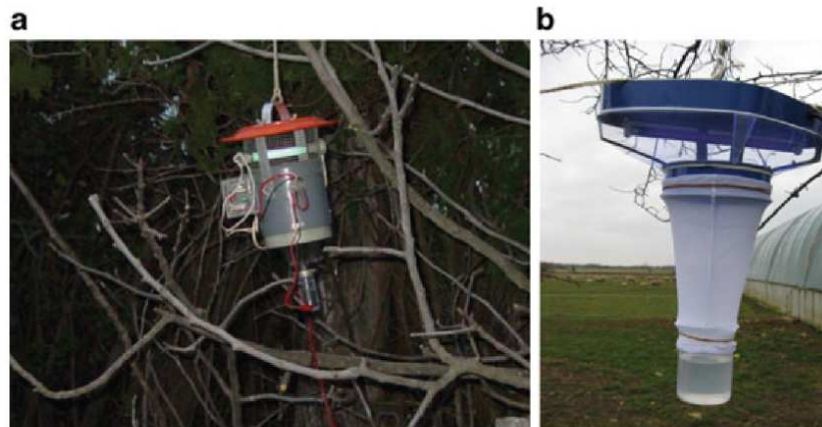


In 2006, when BTV-8 emerged in northern Europe, France was initially marginally affected with only seven outbreaks along the Belgian border. In late September 2006, four cattle farms in the Ardennes department were thus sampled one night weekly to confirm the absence of *C. imicola*, describe *Culicoides* diversity and the end of their activity period (Baldet et al. 2008). Due to the large BTV spread in Belgium, the Netherlands and Germany in late 2006, the surveillance network was extended early 2007 to 15 farms along the northern border, with outdoor and indoor traps (Fig. 4.1). In late 2007, following the disease front evolution, the surveillance included 13 farms in the centre of France (Fig. 4.1). The aim of this network was (1) to determine the start and the end of the active period of *Culicoides* populations by trapping one night per week from March to April and from October to December and (2) to follow up *Culicoides* dynamics via monthly collections from May to September. At that time, the transmission of BTV by autochthonous *Culicoides* species occurred massively throughout the whole French territory (15,253 infected farms with BTV-8 in 2007, 23,959 infected farms with BTV-8 in 2008 and 4,339 infected farms with BTV serotype 1 in 2008). Indeed, BTV-1 was introduced in the Basque country from southern Spain and spread mainly in south-western France. The trapping frequency was standardized in 2008 for all traps of French mainland, with weekly collections at the start or end of *Culicoides* activity (from February to April and from October to December) and monthly collections the rest of the year. Trap localizations remained unchanged except in the Mediterranean littoral where the number of traps was reduced to 13 traps. Finally, from 2009 to date, in order to obtain information on the whole territory, the number of traps was increased to 160 distributed in the mainland and Corsica with 1–2 traps per department monitored at the same frequency as described just above (Balenghien et al. 2010, 2011).

In all surveillance catches, all *Culicoides* specimens were sorted by species, sex and physiological stages for females (nulliparous, parous or engorged). Subsampling following a standardized procedure was applied when abundance was high.

## 4.2 First Record of *Culicoides imicola* in Mainland France and Surveillance of Its Extension

Following the first record of *C. imicola* in August 2000 in Sardinia, Italy (Goffredo et al. 2001), and given the short distance between Sardinia and Corsica, France (12 km), French authorities mandated an entomological surveillance of the island early in October in order to establish whether *Culicoides imicola* was present (and established) on the island and thereafter assess the risk of BTV spreading to French mainland (Fig. 4.1). Early October 2000, 2 weeks before the first BTV outbreaks in Corsica, an entomological survey was conducted in nine farms during a week, with one night trapping using UV-light suction traps (Rieb trap) (Fig. 4.3).



**Fig. 4.3** The two models of UV-light trap used during *Culicoides* surveillance in France. Rieb traps (picture from IPPTS) were used from 2000 to 2006 in Corsica, from 2002 to 2005 on the Mediterranean littoral, and in 2006 in the southwest France (a). OVI traps (picture from Vet Services, department Indre) were used in 2006 onwards in all trapping sites except Corsica where they were implemented in 2007 (b)

This survey recorded for the first time *C. imicola* in Corsica (October 2000) (Delécolle and de La Rocque 2002). It also highlighted that the species could be very abundant (with a single-night catch of 12,000 individuals at Porto-Vecchio in the south-east) and distributed in almost all the studied sites throughout the island, notably on the littoral (Fig. 4.2). Given the proximity of Corsica to the French mainland (180 km), the authorities dread the establishment of these populations into the French mainland. Therefore, an entomological survey was carried out with one night trapping in eight locations for three departments (Hérault, Gard and Bouches-du-Rhône) along the Mediterranean littoral in May 2001 and in the Var department in October 2011 (Fig. 4.1). A total of 419 *Culicoides* were trapped, and no *C. imicola* individuals were captured. In Corsica, in June 2001, 12 farms were prospected during a week confirming the presence of *C. imicola* in high numbers. In 2002, a wider surveillance programme was implemented in Corsica (12 sites) and in the French mainland (19 sites) (Figs. 4.1 and 4.2). This network enabled to trap the first *C. imicola* individuals on the mainland in 2003: one male the 22nd of May, in the Var department, and one nulliparous female the 24th of September in the Alpes-Maritimes department (Fig. 4.4), confirming that individuals could spread passively from Corsica. Additional nights of trapping conducted in and around both positive sites failed to confirm the presence of established populations.

These catches coincided with a year of high abundance of *C. imicola* within Corsica and, particularly, in the north-east of the island in 2003 (Figs. 4.2 and 4.8). The next year, in June 2004, a gravid female was collected by the surveillance network in the valley of Argens (Var department), followed by one parous female late September, one nulliparous and two parous females early October. An expected critical zone of establishment was defined in the valley of Argens. Thus, additional trappings were carried out in October 2004 in this area (Table 4.1, Fig. 4.4).

This extensive trapping during 2 consecutive nights in 16 sites localized in the critical zone revealed that *C. imicola* was present in 10 sites, with a total of 240



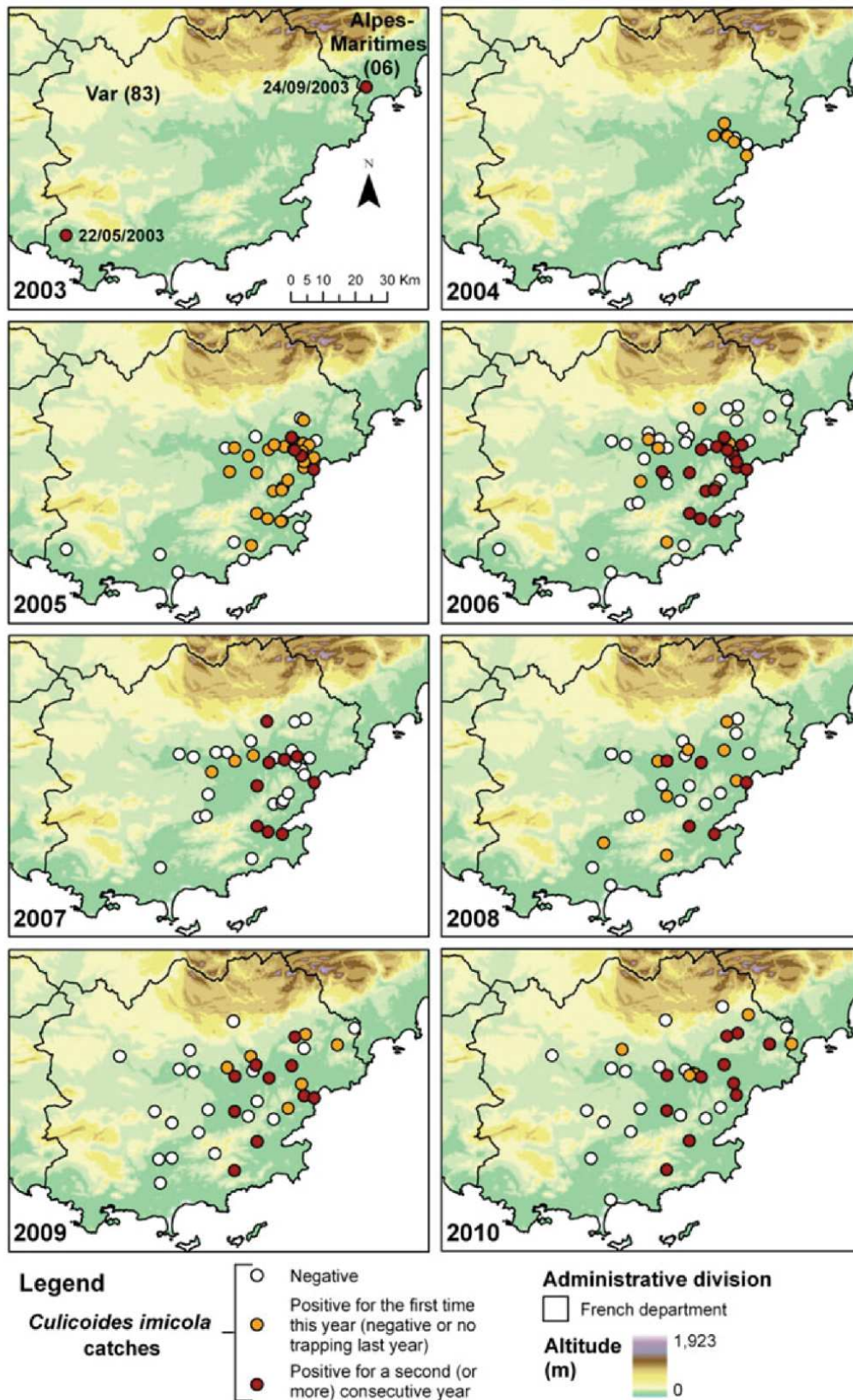


Fig. 4.4 Distribution area of *Culicoides imicola* in the Var department from 2003 to 2010

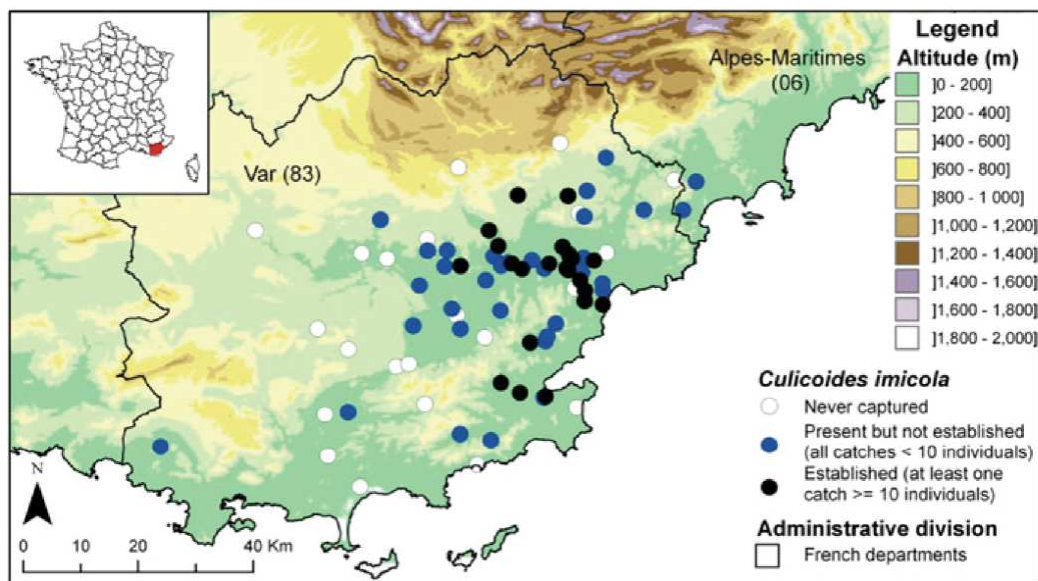
**Table 4.1** Summary of *Culicoides* catches in the Var department, 2004–2010

Year	2004	2005	2006	2006	2006	2007	2008	2009	2010
Sampling dates	19-20/10	26/09-10/10	19-23/09	26-29/09	01-04/10	29/09-04/10	28/09-02/10	06-10/09	
Number of sites	16	42	51	45	34	29	35	34	
Negative sites (0 <i>C. imicola</i> ) [% total]	6 [37.5]	12 [28.6]	40 [78.4]	22 [48.9]	22 [64.7]	16 [55.2]	19 [54.3]	17 [50]	
Positive sites with 1–10 <i>C. imicola</i> [% total]	7 [43.75]	21 [50]	8 [15.7]	13 [28.9]	6 [17.6]	7 [24.2]	11 [31.4]	11 [32.3]	
Positive sites with 11–100 <i>C. imicola</i> [% total]	2 [12.5]	5 [11.9]	2 [3.9]	7 [15.5]	2 [5.9]	3 [10.3]	2 [5.7]	5 [14.7]	
Positive sites with >100 <i>C. imicola</i> [% total]	1 [6.25]	4 [9.5]	1 [2]	3 [6.7]	4 [11.8]	3 [10.3]	3 [8.5]	1 [2.9]	
Number of <i>C. imicola</i>	240	4,636	257	8,935	948	1,348	546	1,497	
Number of other <i>Culicoides</i>	379	6,954	27,056	2,112	3,420	1,264	2,159	3,270	
Total number of <i>Culicoides</i>	619	11,590	27,313	11,047	4,368	2,612	2,705	4,770	



**Table 4.2** Maximal spread of *Culicoides imicola* over the years in the Var department

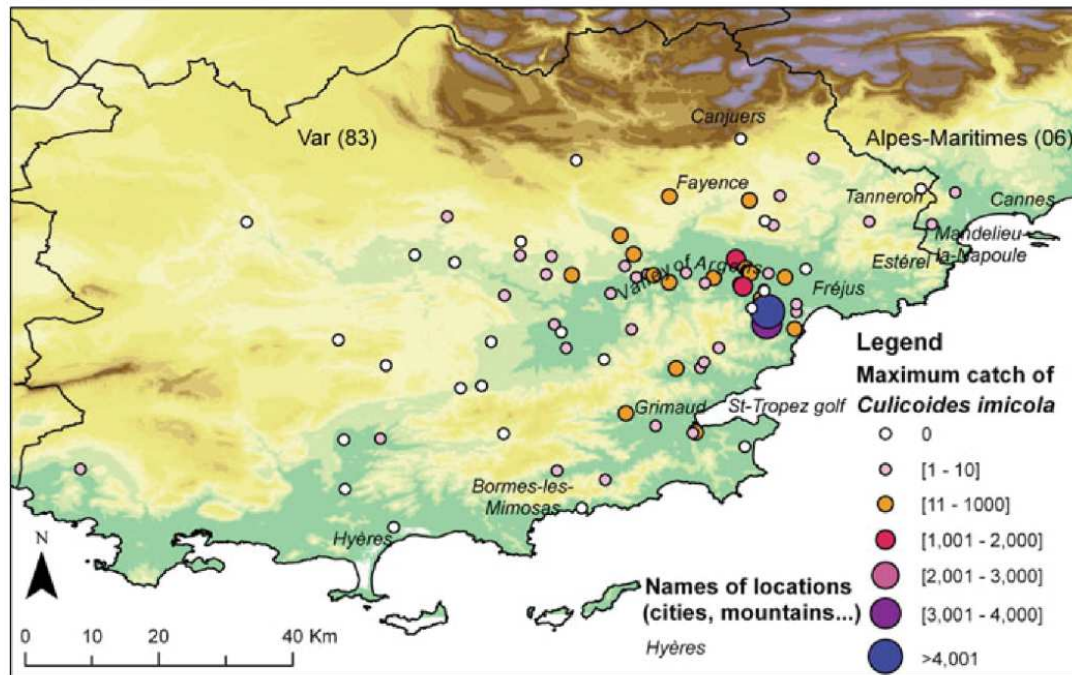
Year	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2004–2010
Number of traps positive for the first time	25	7	2	4	4	6	Total = 48
Maximal distance between a trap positive for the first time that year and its nearest positive trap of the preceding years (in km)	30.66	11.60	5.52	18.89	10.44	9.84	Max = 30.66 Mean = 14.49



**Fig. 4.5** Distribution area of *Culicoides imicola* in the Var department based on catches from 2003 to 2010

*C. imicola* trapped out of 619 *Culicoides*. It thus confirmed the presence and lasting establishment of *C. imicola* on the French mainland (Fig. 4.4). Since 2004, the different *C. imicola* populations established in the valley of Argens have been surveyed each year by extensive trapping conducted during one night in several sites at the end of the summer to follow their geographical extension (Table 4.1). From 2003 to 2010, a gradual extension of the distribution area of *C. imicola* in the Var department was observed (Table 4.1, Fig. 4.4).

In 2007, out of the 34 studied sites, 12 were positive for *C. imicola*, with four sites separated by a few kilometers collecting 90% of the total number of *C. imicola* individuals (Fig. 4.4). One isolated population was detected at Grimaud, south of the Argens valley. In 2008, *C. imicola* populations remained restricted to some areas: the valley of Argens, the coastal plains of Fréjus and St Tropez golf, and some sites such as Cannet-des-Maures, Grimaud, Bormes-les-Mimosas and Pierrefeu-du-Var. In 2009, despite important floods in June in the known distribution area of *C. imicola*, new positive sites were recorded eastward (Mandelieu-la Napoule, département Alpes-Maritimes, Callian, département Var), highlighting an eastward expansion. Up to now, the distribution area of *C. imicola* seemed to be



**Fig. 4.6** Maximum catch of *Culicoides imicola* in the Var department from 2003 to 2010

limited by physical barriers such as the massifs of Estérel and Tanneron (600 m) to the east, planes of Canjuers (1,000 m) and la Colle du Rouet (500 m), slowing down its progression to the east (Cannes), south-east (Hyères) and north (Fayence) of the Var department (Figs. 4.5 and 4.6).

To estimate the spread of *C. imicola* over the years, the distance between each trap site which was positive in a given year and the closest nearest neighbouring site which was found positive at least once during the preceding years was computed. The maximal observed spread of *C. imicola* per year corresponds to the maximal distance between two nearest neighbours for that year. This relies on the hypothesis that *C. imicola* has spread between sites following the shortest possible path. The sites positive in 2003 were not included as they did not lead to the establishment of *C. imicola* populations the following year.

Over the 2004–2010 period, the average spread was 14.5 km/year. The maximal observed spread was 30.7 km/year and occurred in 2005. That year, the spread may have been overestimated as in 2004, the trapping campaign was not large enough to encompass a ring of negative trapping sites around positive sites, indicating that *C. imicola* may have spread further than what was observed in 2004. The speed of colonization of this species over land seems to be limited by topography and vegetation cover (Tran et al. 2007) (Figs. 4.5 and 4.6).

The potential extension of *C. imicola* from Spain to the Pyrénées-Orientales department was also surveyed starting 2009 since this species is permanently established in the Spanish bordering area (Catalonia). In October 2008, three erratic individuals were collected by the surveillance network at the lowest point along the



France-Spain border in the Pyrénées-Orientales department. To check whether *C. imicola* was absent from this region, additional trappings were carried out in October 2009 but did not collect any *Culicoides* because of heavy rains and wind. The following year, in October 2010, 11 sites were sampled for a week with one night trapping, and one site was positive with one parous female. The site was localized closed to the highway, suggesting that erratic individuals may passively be transported through the Pertus pass. Surveillance in this area is maintained, as this area is identified as risk of *C. imicola* establishment despite the efficient natural barrier of the Pyrenees Mountains and the North to South dominant winds.

### 4.3 Species Diversity

Through these surveys, the fauna list of *Culicoides* of France was updated. For most of the collections, traps were set up close to the hosts of interest (cattle and/or sheep); therefore, the checklist is probably not exhaustive and only related to the biting midge species related to domestic ruminants and therefore with a veterinary interest. Establishment of faunistic inventories is important to list the biodiversity, to analyse the possible spread of species into new territories and to analyse species communities in relation to the environment. Species diversity varies depending on the environment, reflecting differences in soil composition and meteorological conditions, and locally different breeding practices. When assessing the diversity of species to record rare or locally distributed species, it is important to keep in mind that collecting efforts often vary over time and that the type of trap used may bias the diversity of species sampled; for example, light traps are not appropriate to collect diurnal species.

Before bluetongue emergence in France, Delécolle (1985) recorded 65 species over the mainland territory with 45 recognized species in the Northeast region. A first checklist was published by Kremer et al. (1971) for Corsica recording 11 *Culicoides* species. However, the first bluetongue outbreaks in 2000, the first record of *C. imicola* on the island (Delécolle and de La Rocque 2002) and the resulting entomological surveillance increased the number of species records. Zientara et al. (2000) reported 21 species, and Delécolle and de La Rocque (2002) later recognized 37 species with 7 new species for Corsica. In 2005, Delécolle et al. (2005) updated the list of *Culicoides* in Corsica to 58 species with the first description of *C. riebi*. Today, the species list for French biting midges includes 83 species for mainland and 61 species for Corsica with recently three new records for mainland France: *C. manchuriensis*, *C. abchazicus* and *C. saevus* (Table 4.3). This list provides all the species collected through the surveillance networks plus some species recorded by experts but rarely collected (Delécolle and de La Rocque 2002; Delécolle et al. 2005). Whereas *C. imicola* can be dominant in Corsica, the common species collected in mainland France are the two sibling species of the *Obsoletus* Complex: *C. obsoletus* and *C. scoticus* usually referred as *C. obsoletus*/*C. scoticus* because females are morphologically indistinguishable, *C. chiopterus*,

**Table 4.3** Updated list of *Culicoides* species recorded in France, and their distribution areas

Species name	Synonyms following the world biting midge catalogue				
	Distribution				
	Mainland France		Mediterranean		Corsica
	Atlantic coast	centre and northeast	littoral		
<i>C. abchazicus</i> Dzhafarov, 1964		x (SR)			
<i>C. achrayi</i> Kettle and Lawson, 1955	x	x	x		x
<i>C. alazanicus</i> Dzhafarov, 1961	x	x	x		x
<i>C. albicans</i> (Winnertz), 1852		x			
<i>C. albihalteratus</i> Goetghebuer, 1935 <sup>a</sup>	x (SR)	x (SR)			
<i>C. begueti</i> Clastrier, 1957	x	x (SR)	x		x
<i>C. brunnicans</i> Edwards, 1939	x	x	x		x
<i>C. cameroni</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960		x	x		x (SR)
<i>C. cataneii</i> Clastrier, 1957	x	x	x		x
<i>C. caucoliberensis</i> Callot, Kremer, Rioux and Descous, 1967					X (SR)
<i>C. chiopterus</i> (Meigen), 1830					
<i>C. circumscriptus</i> Kieffer, 1918					
	<i>C. amoenus</i> (Winnertz), 1852; <i>C. similis</i> (Goetghebuer), 1927; <i>C. dobyi</i> Callot and Kremer, 1969				
	<i>C. nadayanus</i> Kieffer, 1918; <i>C. edwardsi</i> Goetghebuer, 1921; <i>C. algarum</i> Kieffer, 1924; <i>C. salicola</i> Kieffer, 1924;				
	<i>C. pictidorsum</i> Kieffer, 1924; <i>C. albonotatus</i> Vimmer, 1932; <i>C. albosignatus</i> Vimmer, 1932; <i>C. polymaculatus</i> Vimmer, 1932; <i>C. pulcher</i> Zilahi-Sebess, 1934;				
	<i>C. kirovabadicus</i> Dzhafarov 1964; <i>C. matsuenis</i> Lien, Weng and Lin, 1996; <i>C. meridionalis</i> Xue, Liu and Yu, 2003				
<i>C. clastrieri</i> Callot, Kremer and Déduit, 1962	x	x	x (SR)		x
<i>C. clintoni</i> Boorman, 1984		x			
<i>C. comosioculatus</i> Tokunaga, 1956		x			
	<i>C. chaetophthalmus</i> Amosova, 1957; <i>C. caucasicus</i> Sergejev, 1959; <i>C. setosus</i> Gutsevich, 1960				



Table 4.3 (continued)

Species name	Synonyms following the world biting midge catalogue	Distribution			
		Mainland France			
		Atlantic coast	centre and northeast	Mediterranean littoral	Corsica
<i>C. impunctatus</i> Goetghebuer, 1920	<i>C. minor</i> Tokunaga, 1941	x	x	x	
<i>C. indistinctus</i> Khalaf, 1961 <sup>a</sup>		x	x		x
<i>C. jumineri</i> Callot and Kremer, 1969		x		x	x
<i>C. jurensis</i> Callot, Kremer and Deduit, 1962			x		
<i>C. kibunensis</i> Tokunaga, 1937	<i>C. cubitalis</i> Edwards, 1939; <i>C. ponkikiri</i> Kono et Takahasi, 1940; <i>C. sittinohensis</i> Okada, 1941	x	x	x	x
<i>C. kurensis</i> Dzhafarov, 1960		x (SR)	x	x	x
<i>C. longipennis</i> Khalaf, 1957	<i>C. flavisimilis</i> Dzhafarov, 1964	x	x	x	x
<i>C. lupicaris</i> Downes et Kettle, 1952 <sup>a</sup>		x	x	x	x
<i>C. malevillei</i> Kremer and Coluzzi, 1971		x		x (SR)	x
<i>C. manchuriensis</i> Tokunaga, 1941	<i>C. setiger</i> Goetghebuer, 1938; <i>C. goetghebueri</i> Arnaud, 1956; <i>C. machardy</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960; <i>C. ochraceimaculatus</i> Shevchenko, 1970; <i>C. mesostigma</i> Remm, 1971; <i>C. vistulensis</i> Skierska, 1973	x	x (SR)		
<i>C. maritimus</i> Kieffer, 1924 <sup>a</sup>	<i>C. submaritimus</i> Dzhafarov, 1962	x	x	x	x
<i>C. maritimus paucisensillatus</i> nv. sp. <sup>a</sup>			x (SR)		
<i>C. minutissimus</i> (Zetterstedt), 1855	<i>C. nanulus</i> Kieffer, 1919; <i>C. albihalter</i> Kieffer, 1919; <i>C. bychowskyi</i> Dzhafarov, 1964; <i>C. tugaiicus</i> Dzhafarov, 1960	x	x		x
<i>C. montanus</i> Shakirzjanova, 1962	<i>C. biclavatus</i> Kieffer, 1924; <i>C. halophilus</i> Kieffer, 1924; <i>C. edwardsi</i> Goetghebuer, 1933; <i>C. edwardstanus</i> Goetghebuer, 1933	x	x	x	x (SR)
<i>C. newsteadi</i> Austen, 1921				x	x

<i>C. nubeculosus</i> (Meigen), 1830	<i>C. puncticollis</i> Goetghebuer, 1912; <i>C. punctaticollis</i> Goetghebuer, 1920	x	x	x	
<i>C. obsoletus</i> (Meigen), 1818	<i>C. varius</i> (Winnertz), 1852; <i>C. yezoensis</i> (Matsumura), 1911; <i>C. obscuripes</i> Santos Abreu, 1918; <i>C. lacteinervis</i> Kieffer, 1919; <i>C. rivicola</i> Kieffer, 1921; <i>C. clavatus</i> Kieffer, 1921; <i>C. heteroceris</i> Kieffer, 1921; <i>C. pegobius</i> Kieffer, 1922; <i>C. kabyliensis</i> Kieffer, 1922; <i>C. conctus</i> Kieffer, 1922; <i>C. intermedius</i> Okada, 1941; <i>C. sinrensis</i> Cambournac, 1956; <i>C. seimi</i> Shevchenko, 1967	x	x	x	x
<i>C. odiatus</i> Austen, 1921 <sup>a</sup>	<i>C. niger</i> Dzhaifarov, 1960; <i>C. indistinctus</i> Khalaf, 1961; <i>C. lailae</i> Khalaf, 1961; <i>C. kurekshaicus</i> Dzhaifarov, 1962; <i>C. conicus</i> Remm, 1968	x	x	x	x
<i>C. pallidicornis</i> Kieffer, 1919	<i>C. susae</i> Kieffer, 1919; <i>C. dileucus</i> Kieffer, 1921; <i>C. brunneiscutellatus</i> Zilahi-Sebess, 1933; <i>C. bruneoscutellatus</i> Zilahi-Sebess, 1934; <i>C. niger</i> Root and Hoffman, 1937	x	x	x	x
<i>C. paolae</i> Boorman, 1996					x
<i>C. paradisionensis</i> Boorman, 1988					x
<i>C. parroti</i> Kieffer, 1922					x
<i>C. pictipennis</i> (Staeger), 1839	<i>C. arcuatus</i> (Winnertz), 1852; <i>C. guttularis</i> Kieffer, 1919; <i>C. maculatus</i> Zilahi-Sebess, 1936; <i>C. achkamalicus</i> Dzhaifarov, 1964; <i>C. luganicus</i> Shevchenko, 1972	x	x	x	x
<i>C. picturatus</i> Kremer and Déduit, 1961					x
<i>C. poperinghensis</i> Goetghebuer, 1953					x
<i>C. pseudopallidus</i> Khalaf, 1961					x
<i>C. pulicaris</i> (Linné), 1758					x
<i>C. punctatus</i> (Meigen), 1804	<i>C. setosinervis</i> Kieffer, 1913; <i>C. pullatus</i> Kieffer, 1915; <i>C. stephensi</i> Carter, 1916; <i>C. cinerellus</i> Kieffer, 1919; <i>C. quinquepunctatus</i> Goetghebuer, 1921; <i>C. flaviplumus</i> Kieffer, 1924; <i>C. sawamotoi</i> Kono and Takahasi, 1940	x	x	x	x
	<i>C. punctatus</i> Latreille, 1809; <i>C. ocellaris</i> Kieffer, 1921; <i>C. kasachstanicus</i> Shakirzjanova, 1963	x	x	x	x

(continued)

Table 4.3 (continued)

Species name	Synonyms following the world biting midge catalogue	Distribution			
		Mainland France			
		Atlantic coast	centre and northeast	Mediterranean littoral	Corsica
<i>C. puncticollis</i> (Becker), 1903	<i>C. algecirensis</i> (Strobl), 1900; <i>C. impressus</i> Kieffer, 1918; <i>C. distigma</i> Kieffer, 1922; <i>C. donatieni</i> Kieffer, 1922; <i>C. sciniphes</i> Kieffer, 1925; <i>C. bipunctatus</i> Vimmer, 1932; <i>C. tripunctatus</i> Vimmer, 1932; <i>C. wenigi</i> Vimmer, 1932; <i>C. flavitarsis</i> Vimmer, 1932; <i>C. griseovittatus</i> Vimmer, 1932; <i>C. luteosignatus</i> Vimmer, 1932; <i>C. vavrai</i> Vimmer, 1932	x	x	x	x
<i>C. reconditus</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960		x			
<i>C. riebi</i> Delécolle, Mathieu and Baldet, 2005		x		x	
<i>C. riethi</i> Kieffer, 1914	<i>C. cordatus</i> Kieffer, 1921; <i>C. crassiforceps</i> Kieffer, 1924	x	x		x (SR)
<i>C. riouxi</i> Callot and Kremer, 1961		x	x	x	
<i>C. saevius</i> Kieffer, 1922	<i>C. drensii</i> Zilahi-Sebess, 1934; <i>C. puncticeps</i> Goetghebuer, 1934; <i>C. micromaculithorax</i> Khalaf, 1957		x	x	
<i>C. sahariensis</i> Kieffer, 1923	<i>C. baghdadensis</i> Khalaf, 1957; <i>C. coluzzii</i> Callot, Kremer and Bailly-Choumara, 1970		x	x	
<i>C. salinarius</i> Kieffer, 1914	<i>C. halobius</i> Kieffer, 1914; <i>C. meinerti</i> Kieffer, 1915; <i>C. punctatidorsum</i> Kieffer, 1924	x	x		x (SR)
<i>C. santonicus</i> Callot, Kremer, Rault and Bach, 1966		x	x	x	x
<i>C. scoticus</i> Downes and Kettle, 1952		x	x	x	x
<i>C. segnis</i> Campbell and Pelham-Clinton, 1960		x	x	x	
<i>C. semimaculatus</i> Clastrier, 1958	<i>C. karajevi</i> Dzhafarov, 1961	x		x	x
<i>C. shaklawensis</i> Khalaf, 1957	<i>C. caspius</i> Gutsevich, 1959	x	x (SR)	x (SR)	x





*C. dewulfi*, *C. pulicaris*, *C. newsteadi* and *C. punctatus* (Baldet et al. 2008; Balenghien et al. 2010, 2011) with some species locally being widely collected, as *C. brunnicans* in western France (Viennet et al. 2011). *Culicoides chiopterus* and *C. dewulfi* are rarely collected in Corsica.

Species identification based on morphological features is difficult for *Culicoides* midges. Most often slide mounting is required to validate identification by experts and to record new species. Moreover, cryptic diversity is suspected for important species groups (Pages et al. 2009), and numerous complexes are still in need of revision. Future works with combined molecular and morphological approaches may increase the fauna list for France.

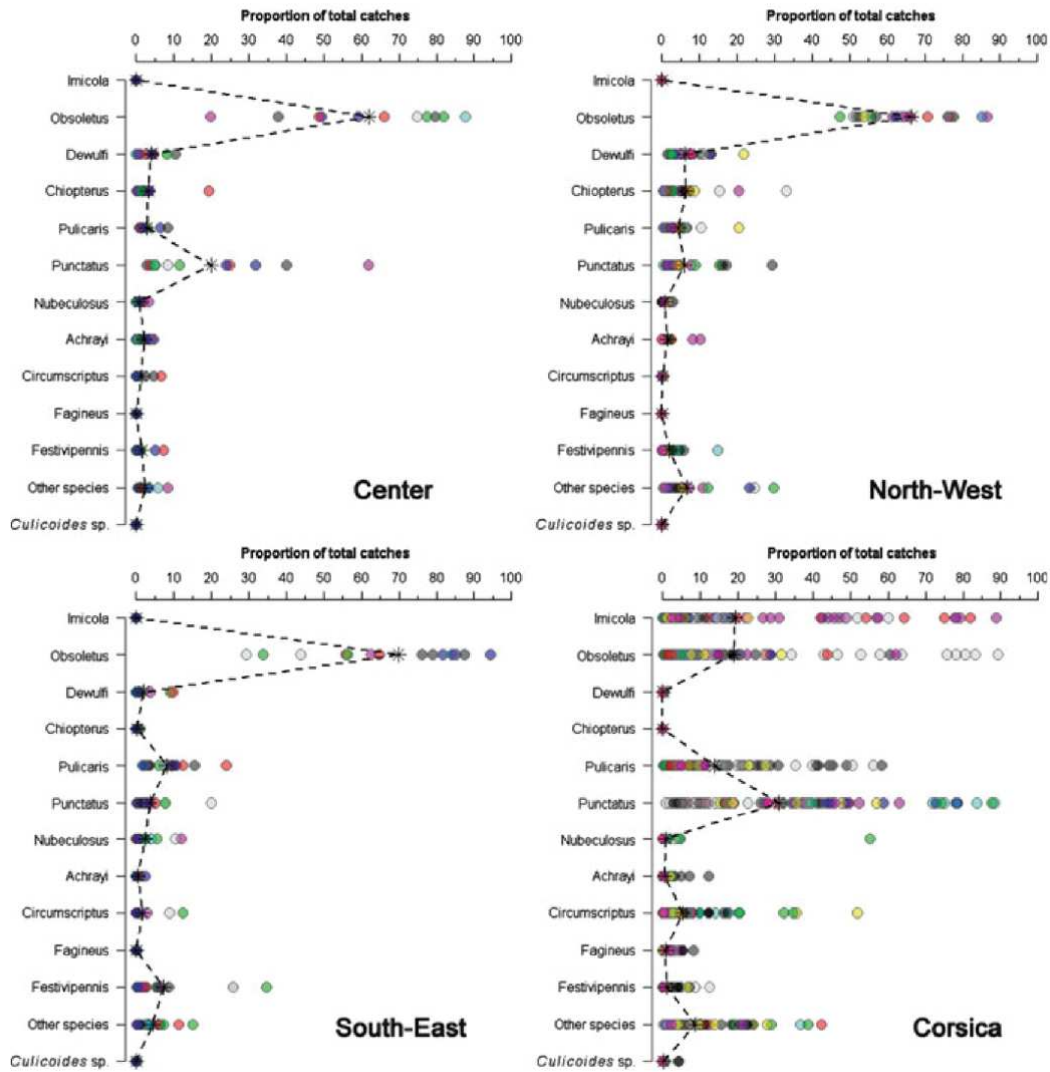
#### 4.4 Species Distribution and Seasonal Dynamics

The current species distribution results from the influence of intrinsic factors (spread ability, ecological amplitude and potential of evolution) and extrinsic factors (geographic, climatic, geologic and biotic). Moreover, seasonal dynamics of insect populations is driven mainly by climatic factors, i.e. rainfalls and temperature. France has a wide range of climate and ecogeographic zones which can explain the observed differences in species abundance and dynamics.

Corsica presents a Mediterranean climate characterized by dry and hot summers, and wet and mild winters. *Culicoides newsteadi*, *C. imicola*, *C. obsoletus/C. scoticus* and *C. pulicaris* were the dominant species. The three former could represent 80–90% of the total annual catch according to the sites (Fig. 4.7). Only six *C. dewulfi* and no *C. chiopterus* were collected by the surveillance network in Corsica from 2002 to 2008, both species remaining rare in Corsica.

*Culicoides imicola* and *C. obsoletus/C. scoticus* showed different seasonal dynamics in Corsica (Fig. 4.8). *Culicoides imicola* was present mainly from May to November, with highest abundance in August, September or October. *Culicoides imicola* populations progressively increased with monthly temperatures regardless of rainfall. Indeed, highest abundances were observed in 2003, considered as a dry and hot year. On the contrary, *C. obsoletus/C. scoticus* populations seemed to be limited by dryness. *Culicoides obsoletus/C. scoticus* populations were abundant around May and declined during summer dry months. This phenomenon was particularly marked in 2003. Nevertheless, populations could increase again in case of rainy summer as observed in 2002. In Corsica, *C. obsoletus/C. scoticus* populations became usually rare in January except in some year when populations were present all the year round as in winter 2002/2003.

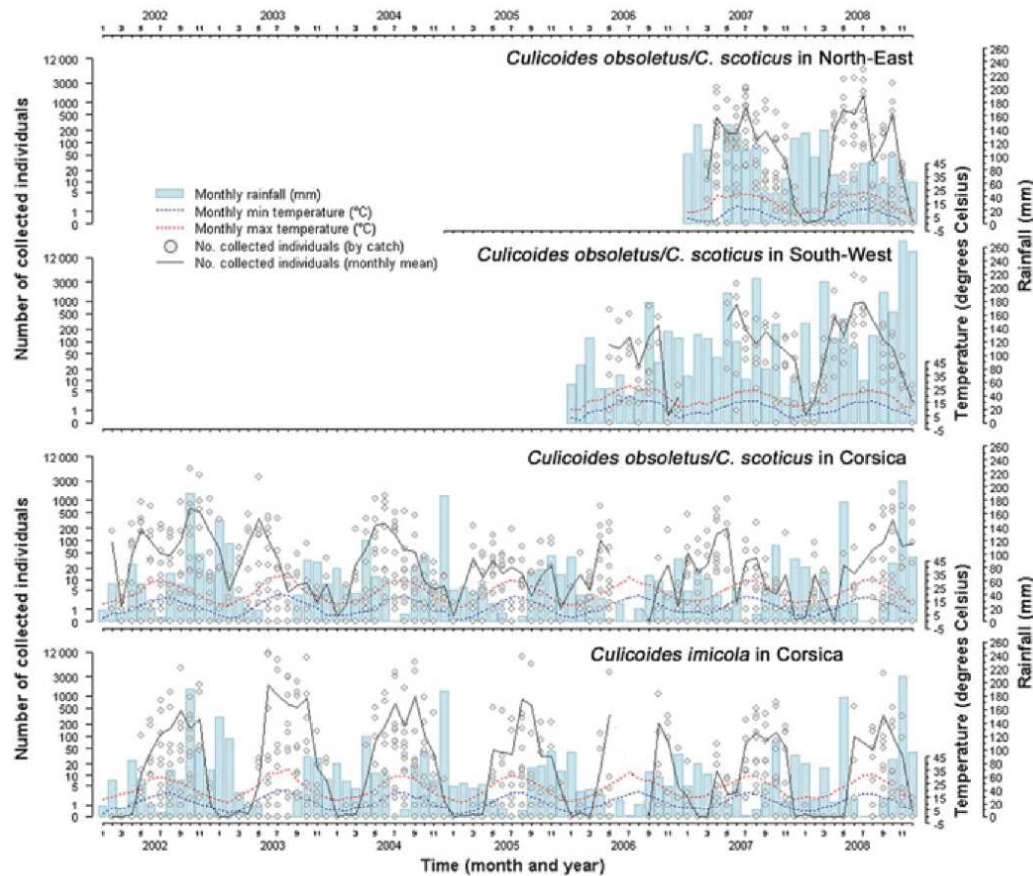
South-western France presents an oceanic climate characterized by warm, but not hot summers and cool, but not cold winters, with a narrow annual temperature range. Rainfall is more abundant during winter. Due to low latitude and proximity to the ocean, this region presents particularly mild winter. The two species of the Obsoletus Complex were dominant, representing 30–95% of the total annual catches (Fig. 4.7). In sites where *C. obsoletus/C. scoticus* were not ultra-dominant, secondary species



**Fig. 4.7** Diversity of *Culicoides* species collected in different French regions, as the proportion of total annual catches. Each colour represents one site, which could be sampled different years. Stars represent the average proportion (whatever the site or the year). For convenience, species are grouped without any taxonomic validity. *Imicola*: *C. imicola*; *Obsoletus*: *C. obsoletus* and *C. scoticus*; *Dewulfi*: *C. dewulfi*; *Chiopterus*: *C. chiopterus*; *Pulicaris*: *C. flavipulicaris*, *C. lupicaris* and *C. pulicaris*; *Punctatus*: *C. punctatus* and *C. newsteadi*, *Nubeculosus*: *C. nubeculosus*, *C. puncticollis* and *C. riethi*; *Achrayi*: *C. achrayi*, *C. fascipennis*, *C. pallidicornis*, *C. picturatus* and *C. subfasciipennis*; *Circumscriptus*: *C. circumscriptus*, *C. salinarius* and *C. sphagnumensis*; *Fagineus*: *C. fagineus* and *C. subfagineus*; *Festivipennis*: *C. clastrieri*, *C. festivipennis*, *C. paloae* and *C. shaklawensis*; *Culicoides* sp.: unidentified specimens

were *C. festivipennis*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris* and *C. nubeculosus*. *Culicoides dewulfi* represented up to 10% of the annual catch, whereas *C. chiopterus* was very rare. Centre of France presents a gradient from continental to mountainous climate characterized by cold winter and mild and wet summer. The dominant species were *C. obsoletus*/*C. scoticus* or *C. punctatus* depending on the sites. *Culicoides dewulfi*, and more rarely *C. chiopterus*, could be locally abundant representing up to 10% and 16%. The north-eastern France presents a west-eastern gradient of climate: from





**Fig. 4.8** Seasonal dynamics of *Culicoides imicola* in Corsica and *Culicoides obsoletus/Culicoides scoticus* in different French regions in regard to monthly rainfall and temperatures

oceanic to continental climate. This latter is characterized by high thermal amplitude, whereas rainfalls are regular, slightly higher in summer. *Culicoides obsoletus/C. scoticus* were clearly dominant, representing 45–90% of the total annual catches. *Culicoides dewulfi* and *C. chiopterus* may be abundant depending on the site: up to 20% and 35%. The other abundant species were *C. lupicaris*, *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. achrayi*, *C. festivipennis*, *C. impunctatus*, *C. simulator* and *C. vexans*.

In non-Mediterranean mainland regions, *C. obsoletus/C. scoticus* dynamics were mainly unimodal, summer months being sufficiently wet. Nevertheless, populations may decrease during August in some years, as observed in 2006 in south-western France or in 2008 in north-eastern France, probably due to lack of rainfall in some sites.

## 4.5 Indoor and Outdoor Activity

Endophagous behaviour of Palaearctic species was reported by Overgaard Nielsen and Christensen (1975) in Denmark. In late 2006, comparing UV-light trap collections inside and outside sheds in the Netherlands, Meiswinkel et al. (2008)

**Table 4.4** Mean number observed (max) and predicted *Culicoides* for the most abundant species from May to October 2007 and 2008 depending on the trap location and the animal presence (plus their interactions)

Effect	Value	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>		<i>C. chiopterus</i>		<i>C. dewulfi</i>	
		Observed	Predicted <sup>b</sup>	Observed	Predicted	Observed	Predicted
Trap location	Indoor	570 (3,452)	<b>125</b> <sup>***</sup>	37 (362)	7	37 (634)	<b>7</b> <sup>***</sup>
	Outdoor	156 (2,532)	<b>31</b>	11 (107)	4	23 (271)	<b>6</b>
Animal	Presence	377 (3,452)	73	28 (362)	<b>9</b> <sup>***</sup>	33 (634)	<b>6</b> <sup>***</sup>
	Absence	164 (2,532)	83	8 (67)	<b>2</b>	18 (108)	<b>7</b>
Year	2007	210 (2,155)	51	14 (204)	<b>2</b> <sup>**</sup>	28 (271)	3
	2008	420 (3,452)	105	27 (362)	<b>9</b>	29 (634)	10
Loc × Pres <sup>a</sup>	–	$p < 0.001$		$p < 0.01$		$p < 0.001$	

<sup>a</sup>Interaction between trap location and animal presence

<sup>b</sup>Predicted values are in *bold* if  $p < 0.05$

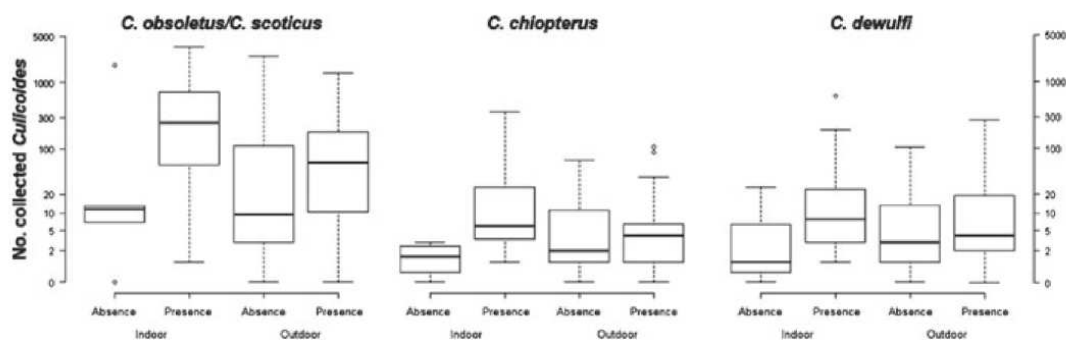
$p$  values were given for effect modalities compared to a reference value, i.e. “indoor” for trap location or “absence” for animal presence (\*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$ )

collected threefold more *Culicoides* outside than inside, where cattle are kept for the night. Using the same methodology in France at the same period, Baldet et al. (2008) collected *Culicoides* in greater number inside than outside. Authors conceded that results are difficult to interpret because of the variation in building opening and in cattle abundance close to trap in the different collection sites (Baldet et al. 2008). With a standardized approach, Baylis et al. (2010) identified that the presence of animals and the opening of stable increased the indoor number of *Culicoides* collected by UV-light trap.

In north-eastern France, two OVI light-traps were placed in eight sites, one trap inside stables and the other outside in 2007 and 2008. Presence of animals indoor or outdoor was recorded. We used these surveillance data to test the influence of trap location (indoor vs. outdoor) and animal presence on *Culicoides* abundance during favourable months (from May to October). We modelled the *Culicoides* abundance using a generalized linear model with a Poisson distribution, with trap location, animal presence (plus their interaction) and year as fixed effects and site and date as random effects.

It seemed clear that it was not possible to interpret effect of trap location (indoor vs. outdoor) on *Culicoides* abundance, without taking into account animal presence. Indeed, interactions between trap location and animal presence had influence on *Culicoides* abundance ( $p < 0.01$ ) for *C. obsoletus/C. scoticus*, *C. chiopterus* and *C. dewulfi* (Table 4.4). UV-light traps collected only few *Culicoides* indoor in the absence of animal (Fig. 4.9). On the contrary, indoor collections in the presence of animals were more abundant than outdoor (Fig. 4.9), maybe due to a higher efficiency of the trap indoor than outdoor or due to a higher density of animals around the trap indoor than outdoor (Garcia-Saenz et al. 2011). Outdoor collections may be abundant even if animals were not present (Fig. 4.9), but animal presence increased the number of collected *Culicoides*. These results confirmed the importance of presence of animals in increasing the indoor number of *Culicoides* collected by UV-light trap (Baylis et al. 2010). Future investigations should include the





**Fig. 4.9** Boxplots of main *Culicoides* species of veterinary interest abundance collected in eight sites in north-eastern France from 2007 to 2008 depending on trap location (*indoor and outdoor*) and on animal presence

opening of stable to untangle complex influences of animal presence and opening of stable on indoor abundance of *Culicoides*.

#### 4.6 Field-Collected Infected Individuals

Reliable detection of bluetongue virus from field-collected specimens is difficult due to several constraints related to the genus *Culicoides* itself and to laboratory procedures. A species can be incriminated as a confirmed vector species when four criterions are met: biology compatible with vector/host contacts (abundance of species, contact with host of interest), ability of species to be infected after infectious blood meal, ability of the species to transmit the virus by bite, and detection or isolation of the virus within the field-collected species specimens (WHO 1961). This last criterion is challenging and requires insects to be collected at the moment of intense transmission to maximize the chances of collecting infected *Culicoides*. Virus detection is usually achieved with real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) and virus isolation with cell cultures or embryonated chicken eggs. However, these results are meaningless in terms of vector implication if biting midge pools are not sorted out by species, sex and physiological status and if engorged females are not excluded from the pools tested.

Among Palaearctic species, BTV was isolated from field-collected pools of *C. obsoletus* (Mellor and Pitzolis 1979; Savini et al. 2004) and *C. pulicaris* (Caracappa et al. 2003; De Liberato et al. 2005). BTV-8 viral genome from *C. dewulfi* and *C. chiopterus* field individuals has been identified by real-time RT-PCR in the Netherlands (Dijkstra et al. 2008; Meiswinkel et al. 2007) and in France (see below). In Basque country, BTV-1 was detected by real-time RT-PCR from *C. obsoletus/C. scoticus*, *C. pulicaris* and *C. lupicaris* parous females (Romon et al. 2011). *Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* from United Kingdom have been

experimentally infected by serotypes 8 and 9 of bluetongue virus, *C. scoticus* having higher viral titers (Carpenter et al. 2008). In Sicily, pools of *C. pulicaris* were found infected with serotype 2 (Torina et al. 2004), but the taxonomic issues around this species and related species such as *C. lupicaris* make difficult the understanding of the involvement of this species in BTV transmission in northern Europe. This list of (potential) vector species is probably not exhaustive. It is therefore important to complete this list of potential vectors with information from other BTV-infected countries and with future vector competence experimentations with Palearctic *Culicoides* species.

To identify which species of *Culicoides* species were involved in BTV-8 transmission in France, individuals collected in infected farms were tested for the presence of BTV in France at two occasions in 2007. In mid-September 2007, a single-night collection was carried out using two UV-light suction traps (OVI trap) in a cattle farm localized in north-eastern France (Ardennes department). This cattle farm was chosen because animals were developing clinical signs of bluetongue. After morphological identification, *Culicoides* were divided into pools from 1 to 57 individuals of the same species, sex and physiological stage. Among collected individuals, 973 unfed parous females were tested for the presence of BTV by real-time RT-PCR: 731 *C. chiopterus* (15 pools), 159 *C. obsoletus/scoticus* (3 pools), 72 *C. dewulfi* (2 pools), 3 *C. lupicaris* (1 pool), 2 *C. pulicaris* (1 pool), 2 *C. nubeculosus* (1 pool), 2 *C. pallidicornis* (1 pool), 1 *C. achrayi* (1 pool) and 1 *C. salinarius* (1 pool). Among the 15 pools of *C. chiopterus*, 2 were positive for BTV-8, leading to an estimate of the minimum infection rate (MIR) of 2.7% for this species. This result confirms the role as vector species of *C. chiopterus* (Dijkstra et al. 2008).

In October 2007, an extensive biting midge collection (three consecutive days) in a sheep farm reporting BTV-8 clinical cases was carried out. The farm was located in north-eastern France (Alsace department) and composed by a central building surrounded by fields hosting about 220 animals (2.3% with clinical signs and 6.3% [1.3–17.2] positive by ELISA). *Culicoides* were collected using (1) six UV-light traps dispersed in the farm closed to the animals, including four traps baited with CO<sub>2</sub> and operated continuously, (2) mouth aspirator on the abdomen of a sheep from 10 to 14 h and from 15 to 18 h (30 min sessions) and (3) a backpack aspirator during afternoons (30 min sessions) around haystacks covered by a black plastic tarpaulin. UV-light traps collected 383 *Culicoides*, with 71% of *C. obsoletus/scoticus* (21.3 *Culicoides*/trap/day). On the sheep, 33 unfed females (23 *C. obsoletus/scoticus*, 9 *C. dewulfi* and 1 *C. chiopterus*) mainly (32/33) from 10 to 11 h (17°C at 11 h) were collected in 1 day. With the backpack aspirator, 1,076 *Culicoides* were collected (135 *Culicoides*/session) with 99% of *C. obsoletus/scoticus* females, mainly parous (92%) and gravid (80%). We did not detect BTV-8 from the 1,377 parous females tested. This reflects the low sensitivity of the underlying method as very small numbers of vectors are infected, even during high transmission phases, and the necessity to collect *Culicoides* at the exact moment of the transmission.



## 4.7 Conclusions

The entomological surveillance implemented since 2000 in France because of the northward expansion of *C. imicola* together with the emergence of bluetongue in Western Europe helps to understand the *Culicoides* dynamics and diversity and species role in BTV transmission.

The principal findings of the *Culicoides* surveillance in France can be summarized as follows: 1. *C. imicola*, the main southern European/African BTV vector which was involved in BTV outbreaks in Corsica, has settled in mainland France but is restricted currently to the littoral of the Var department. 2. Several Palaearctic *Culicoides* species were considered potential BTV vectors in French mainland, including *C. obsoletus/C. scoticus*, *C. chiopterus* and *C. dewulfi* in the absence of *C. imicola*. 3. The spatio-temporal dynamics of *Culicoides* in farms depends on environment and climatic factors and at a local scale on husbandry practices, but generally *C. imicola* is abundant during summer in the littoral of Corsica and *C. obsoletus/C. scoticus* occurred widely and abundantly from spring to autumn on sheep and cattle holdings across the whole French mainland.

The favourable climatic conditions that prevailed in Europe at the time of the emergence and expansion of BTV-8 from 2006 to 2008 appear to have promoted the successful transmission by several Palaearctic *Culicoides* species (Guis et al. 2012). BTV vectors are known worldwide to transmit also other viral pathogens to livestock, such as African horse sickness, Akabane and epizootic haemorrhagic disease viruses. It is thus probable that these pathogens could be transmitted if introduced into Europe during climatically favourable periods. Future temperature increase may enhance the vector capacity of Palaearctic *Culicoides* species and could favour the settlement of new exotic species in French territory such as *C. imicola*. For these reasons, the French veterinary authorities are advised to maintain exhaustive *Culicoides* surveillance network to follow the expansion of *C. imicola*—and the settlement of new exotic species—and to determine precisely the abundance and seasonality of *Culicoides* species in livestock premises. Entomological surveillance of *Culicoides*, potential vectors of pathogens to livestock, should be harmonized at the European level leading to more integrated approaches and, hence, comparability between datasets. These surveys should improve the predictive models developed such as those based on the basic reproductive ratio ( $R_0$ ) and would finally help to identify areas and periods at risk of transmission (Guis et al. 2012).

## References

- Baldet T, Delécolle J-C, Mathieu B, de La Rocque S, Roger F (2004) Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002. *Vet Ital* 40:226–231
- Baldet T, Delécolle JC, Cêtre-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. *Prevent Vet Med* 87:84–97



- Balenghien T, Garros C, Mathieu B, Setier-Rio ML, Allène X, Gardès L, Rakotoarivony I, Venail R, Akadar A, Drouet M, Delécolle J-C (2010) La surveillance des *Culicoides* en France. Bull Epidémiologique 35:8–9
- Balenghien T, Delécolle JC, Setier-Rio ML, Rakotoarivony I, Allène X, Venail R, Delécolle D, Lhoir J, Gardès L, Chavernac D, Mathieu B, Languille J, Baldet T, Garros C (2011) Fièvre catarrhale ovine: bilan de la surveillance entomologique en 2010 en France. Bull Epidémiologique 46:26–31
- Baylis M, Parkin H, Kreppel K, Carpenter S, Mellor PS, McIntyre KM (2010) Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. Med Vet Entomol 24:38–45
- Caracappa S, Torina A, Guercio A, Vitale F, Calabro A, Purpari G, Ferrantelli V, Vitale M, Mellor PS (2003) Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. Vet Rec 153:71–74
- Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Luntz AJ, Dallas JF, Triplet F, Mellor PS (2008) Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. Vet Rec 163:589–592
- De Liberato C, Scavia G, Lorenzetti R, Scaramozzino P, Amaddeo D, Cardeti G, Scicluna M, Ferrari G, Autorino GL (2005) Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. Vet Rec 156:301–304
- Delécolle J-C (1985) Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* du Nord-Est de la France thèse d'université, Université de Strasbourg, France
- Delécolle J-C, de La Rocque 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 catarrale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). Bull Soc Entomo France 107:371–379
- Delécolle J-C, Mathieu B, Baldet T (2005) Nouvelle contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. II. Mise à jour de la liste des espèces du genre, description de *Culicoides riebi* n. sp. et redescription de *Culicoides paradisionensis* Boorman, 1988 (Diptera: Ceratopogonidae). Bull Soc Entomol France 110:69–76
- Dijkstra E, van der Ven IJ, Hölzel DR, Van Rijn PA, Meiswinkel R (2008) *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. Vet Rec 162:422
- Du Toit RM (1944) The transmission of blue-tongue and horse sickness by *Culicoides*. Onderstepoort J Vet Sci 19:7–16
- Enserink M (2006) Emerging infectious diseases. During a hot summer, bluetongue virus invades northern Europe. Science 313:1218–1219
- Gambles RM (1949) Bluetongue of sheep in Cyprus. J Comp Pathol Therapeut 59:176–190
- Garcia-Saenz A, McCarter P, Baylis M (2011) The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. Med Vet Entomol 25:113–115
- Goffredo, M., Satta, G., Torina, A., Federico, G., Scaramozzino, P., Cafiero, M.A., Lelli, R., Meiswinkel, R., 2001. The 2000 bluetongue virus (BTV) outbreak in Italy : distribution and abundance of the principle vector *Culicoides imicola* Kieffer. In: Proc Tenth Int Symp Amer Assoc Vet Lab Diagnosticians, Salsomaggiore, Parma, pp 308–309
- Goldarazena A, Romon P, Aduriz G, Balenghien T, Baldet T, Delécolle J-C (2006) First record of *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue virus in Europe, in the Basque Country (northern Spain). Vet Rec 162:820–821
- Guis H, Caminade C, Calvete C, Morse AP, Tran A, Baylis M (2012) Modelling the effects of past and future climate on the risk of bluetongue emergence in Europe. J R Soc Interface R Soc 9:339–350
- Jennings DM, Mellor PS (1988) The vector potential of British *Culicoides* species for bluetongue virus. Vet Microbiol 17:1–10
- Kremer M, Leberre G, Beaucournu-Saguez F (1971) Note sur les *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) de Corse. Description de *C. corsicus* n. sp. Ann Parasitol 46:653–660
- 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

- Meiswinkel R, Baldet T, de Deken R, Takken W, Delécolle JC, Mellor PS (2008) The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe—the entomological perspective. *Prevent Vet Med* 87:55–63
- Mellor P, Pitzolis G (1979) Observations on breeding sites and light trap of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bull Entomol Res* 69:229–234
- Mellor PS, Wittmann EJ (2002) Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998–2001. *Vet J* 164:20–37
- Mellor PS, Boorman JPT, Wilkinson PJ, Martinez-Gomez F (1983) Potential vectors of bluetongue and African horse sickness viruses in Spain. *Vet Rec* 35:445–466
- Mellor PS, Jennings DM, Wilkinson PJ, Boorman JPT (1985) *Culicoides imicola* a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Vet Rec* 116:589–590
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45:307–340
- Mellor PS, Baylis M, Mertens PP (2009) Bluetongue. Elsevier, London
- Overgaard Nielsen B, Christensen O (1975) A mass attack by biting midge *Culicoides nubeculosus* (Mg.) (Diptera, Ceratopogonidae) on grazing cattle in Denmark a new aspect of sewage discharge. *Nordisk Veterinaermedicin* 27:365–372
- Pagès N, Munoz-Munoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Nunez JI (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
- Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, Baylis M (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3:171–181
- Romon P, Higuera M, Delecolle JC, Baldet T, Aduriz G, Goldarazena A (2012) Phenology and attraction of potential *Culicoides* vectors of bluetongue virus in Basque Country (northern Spain). *Vet Parasitol* 186:415–424
- Saegerman C, Mellor P, Uyttenhoef A, Hanon JB, Kirschvink N, Haubruge E, Delcroix P, Houtain JY, Pourquier P, Vandenbussche F, Verheyden B, De Clercq K, Czaplicki G (2008) The most likely time and place of introduction of BTv8 into Belgian ruminants. *PLoS One* 5:e9405
- Sarto i Monteys V, Ventura D, Pagès N, Aranda C, Escosa R (2005) Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe, into Catalonia, Spain. *Vet Rec* 156:415–417
- Savini G, Goffredo M, Monaco F, Di Gennaro A, de Santis P, Meiswinkel R, Caporale V (2004) The isolation of bluetongue virus from field populations of the *Obsoletus* Complex in central Italy. *Vet Ital* 40:286–291
- Southwood TRE, Henderson PA (2000) Ecological methods, 3rd edn. Blackwell Publishing, Oxford, UK
- Torina A, Caracappa S, Mellor PS, Baylis M, Purse BV (2004) Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. *Med Vet Entomol* 18:81–89
- Tran A, Guis H, Barragué B, Mathieu B, Setier-Rio M-L, Gerbier G, Roger F, Baldet T (2007) Use of remote sensing to assess the risk of emergence for a vector-borne disease: Introduction and diffusion of *Culicoides imicola*, bluetongue vector in Southern France. *Télédetection* 7: 419–432
- Velthuis AG, Saatkamp HW, Mourits MC, de Koeijer AA, Elbers AR (2010) Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prevent Vet Med* 93:294–304
- Viennet E, Garros C, Lancelot R, Allène X, Gardès L, Rakotoarivony I, Crochet D, Delécolle JC, Moulia C, Baldet T, Balenghien T (2011) Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasit Vectors* 4:119
- WHO (1961) Arthropod-borne viruses: report of a study group. In World Health Organization Technical Report Series (Geneva), p. 68.
- Zientara S, De La Rocque S, Gourreau JM, Grégory M, Diallo A, Hendrickx P, Libeau G, Sailleau C, Delécolle J-C (2000) La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000. *Epidémiol et santé anim* 40:129–134

## 1.2 Le rôle vecteur des *Culicoides*

Si la quasi-totalité des espèces du genre *Culicoides* sont hématophages, seule une petite proportion a été incriminée dans la transmission d'agents pathogènes. Une espèce est considérée comme vectrice, si les critères suivants sont respectés : i) l'espèce a un comportement de piqûre pour l'hôte d'intérêt, ii) l'espèce est capable de s'infecter après un repas de sang infectieux, iii) l'espèce est capable de transmettre l'agent pathogène par piqûre et iv) l'agent pathogène est détecté et isolé régulièrement à partir d'individus capturés sur le terrain (WHO, 1967).

Les *Culicoides* sont impliqués dans la transmission de 65 virus, de 15 espèces de protozoaires et de 25 espèces de filaires (Borkent, 2014). En santé publique, certaines espèces de *Culicoides* transmettent des filaires pour l'homme comme *Mansonella perstans*, *M. ozzardi* et *M. streperca* en Amérique Latine et en Afrique (Hawking, 1977, 1979 ; Linley, 1985 ; Simonsen *et al.*, 2011). En santé animale, les filaires *Onchocerca cervicalis* et *O. guttuosa* provoquent des pathologies discrètes respectivement chez les chevaux et les bovins (Linley, 1985). Les *Culicoides* sont responsables également de la transmission de protozoaires hémospordies aux oiseaux.

L'implication des *Culicoides* dans la transmission de virus est importante non seulement par le nombre de virus transmis mais aussi par l'impact sanitaire et socio-économique généré. En santé publique, le virus Oropouche (Bunyaviridae, genre *Orthobunyavirus*) est transmis par *C. paraensis* Goeldi. La répartition virale est limitée aux Amériques du Sud et Centrale. Depuis les premières épidémies, observées au Brésil entre 1961 et 1978 (Pinheiro *et al.* 1981), 500 000 cas ont été comptabilisés aux Amériques (da Silva Azevedo *et al.*, 2007). En santé animale, quatre maladies virales dont l'agent pathogène est transmis par les *Culicoides* sont d'importance majeure : la fièvre catarrhale ovine, la peste équine, la maladie hémorragique des cervidés et la maladie de Schmallerberg. Les agents pathogènes des trois premières maladies sont des virus du genre *Orbivirus* (Reoviridae). En raison de leur impact socio-économique dû aux pertes économiques et aux perturbations du commerce international, ces trois maladies figurent sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Office International des Épizooties (OIE). En revanche, la maladie de Schmallerberg, dont l'agent pathogène est un virus du genre *Orthobunyavirus* (Bunyaviridae), n'est pas notifiable à l'OIE. Cette maladie vectorielle émergente a infecté 3 745 exploitations en Europe entre 2011 et 2012 (EFSA, 2014).

La fièvre catarrhale ovine est une maladie non contagieuse qui touche les ruminants sauvages et domestiques. Cette pathologie se caractérise par des fièvres (>40°C), de l'abattement, un amaigrissement rapide, des larmoiements, des congestions des muqueuses, des œdèmes de la face, du jetage nasal, des difficultés respiratoires, parfois des cyanoses de la langue, des raideurs des membres et des avortements. Ces manifestations cliniques de la maladie entraînent des pertes de valeurs économiques des animaux infectés (qualité de la laine chez les ovins, diminution de la production laitière chez les bovins et caprins, perte de poids chez les bovins à viande), et parfois de la mortalité sur les troupeaux ou à la reproduction (Gourreau, 2009).

Elle est décrite pour la première fois dans les années 1780 par F. Vaillant au Cap de Bonne-Espérance en Afrique du Sud (Gutsche, 1979). En 1902, D. Hutcheon rapporte des signes cliniques similaires sur des moutons fiévreux dans la colonie du Cap, dans l'actuelle Afrique du Sud, qui rappellent les symptômes typiques du paludisme, ce qui l'amène à nommer la maladie *malarial catarrhal fever* ou « catarrhe enzootique du mouton » (Hutcheon, 1902). Quelques années plus tard, l'observation d'une coloration bleuâtre de la langue des animaux malades donne son nom à la maladie : *bluetongue* ou maladie de la langue bleue. En 1906, A. Theiler démontre que l'agent pathogène de la maladie est un virus associé au sang (Spreull, 1905). Le virus de la FCO a par la suite été isolé sur des œufs embryonnés (Mason, 1940), l'existence de plusieurs sérotypes démontrée (Howell, 1960) et le virus identifié comme appartenant au genre *Orbivirus* (Verwoerd *et al.*, 1970). Aujourd'hui, le nombre de sérotypes isolés et reconnus est de 26 (Batten *et al.*, 2008) ou 27 si le nouveau sérotype découvert récemment en Corse est confirmé ([www.plateforme-esa.fr](http://www.plateforme-esa.fr)).

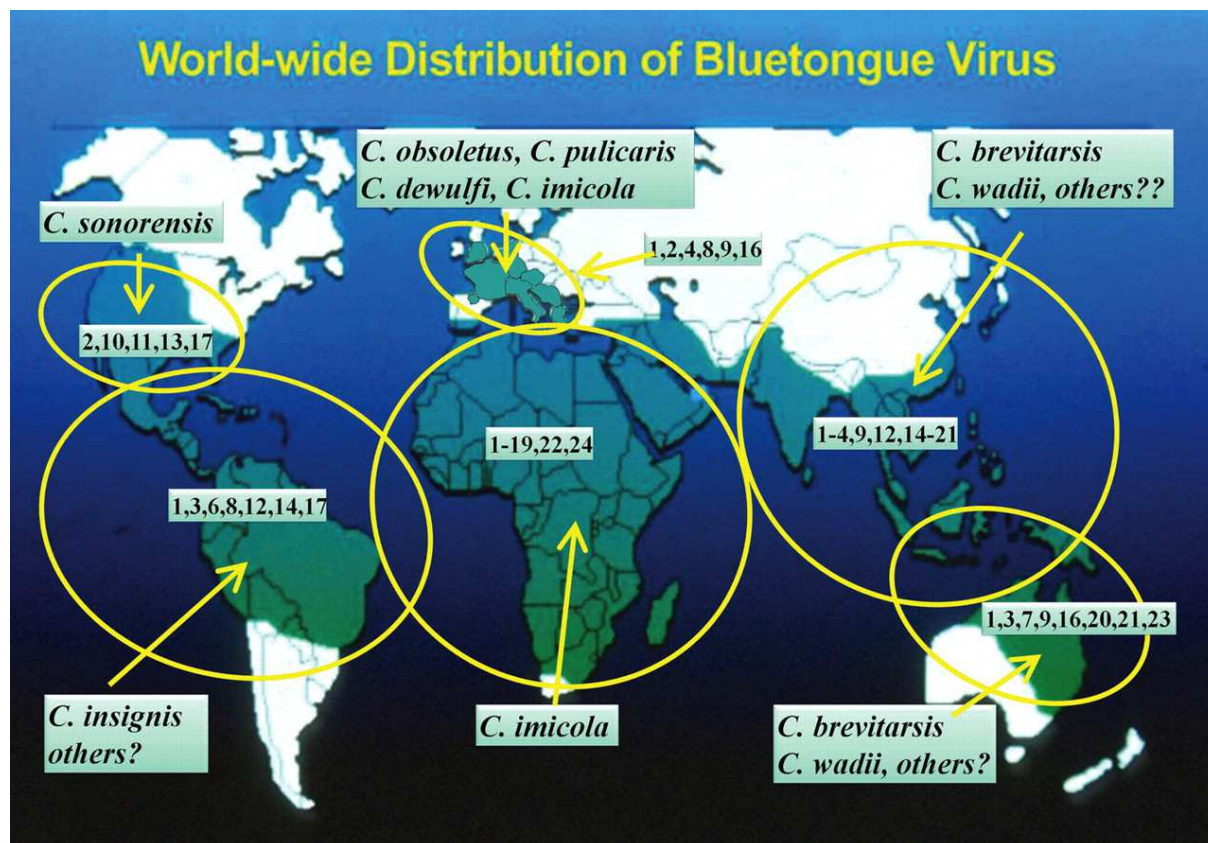
Les premiers cas d'animaux atteints de FCO ont été identifiés en Afrique du Sud sur des moutons Mérinos importés d'Europe (Hutcheon, 1902). D'autres foyers de la maladie ont ensuite été identifiés en Afrique de l'Ouest (Mali), vraisemblablement suite à l'introduction de moutons Mérinos infectés d'Afrique du Sud (Curasson, 1925). Il était probable que la maladie était enzootique sur tout le continent africain et qu'elle était seulement décrite sur des moutons de races améliorées importées d'Europe car les races autochtones infectées ne présentent pas de signes cliniques. Les races locales exposées régulièrement au virus auraient développées une résistance à la maladie. A l'opposé, les races importées n'ayant jamais été en contact avec le virus sont par conséquent plus sensibles. Historiquement, *C. imicola* est considéré comme le principal vecteur du virus de la FCO. En effet, en 1944, du Toit confirma que cette espèce était capable de transmettre le FCO après avoir inoculé du broyat de quelques femelles infectées collectées sur le terrain à des moutons (Du Toit, 1944). Pendant des années *C. imicola* a été considéré comme le seul vecteur du virus de la FCO en Afrique du Sud. Plus récemment, le rôle vecteur de *C. bolitinos* Meiswinkel est confirmé dans les régions où *C. imicola* est absent ou rare, notamment en zone de moyenne altitude dans la Province du Cap (Venter *et al.*, 1998).

Les premiers animaux infectés en Europe ont été identifiés à Chypre en 1924, mais ce n'est qu'en 1943, que les premiers foyers seront officiellement confirmés dans l'île (Gambles, 1949). D'autres foyers ont été identifiés à travers le monde : en Israël en 1949 (Komarov and Goldsmit, 1951), aux États-Unis en 1952 (Hardy and Price, 1952), au Pakistan en 1959 (Sarwar, 1962) et en Inde en 1963 (Sapre 1964). En Europe continentale, les premiers foyers ont été identifiés au Portugal en 1956 (Manso-Ribeiro and Noronha, 1958), puis en Espagne en 1958 (Lopez and Botija, 1958). Récemment la maladie s'est répandue autour du bassin méditerranéen. Entre 1998 et 2005, elle a été confirmée au Maroc, en Algérie, Tunisie, Israël, Chypre, Turquie, Grèce, Bulgarie, Albanie, Macédoine, Kosovo, Bosnie, Croatie, Italie, France (Corse), Espagne et au Portugal (Mellor *et al.*, 2008). Étant donné que l'aire de distribution de *C. imicola*, vecteur historique et avéré de la FCO en Afrique et au Moyen Orient et en expansion apparente sur le bassin méditerranéen (Du Toit, 1944), coïncidait avec l'aire de distribution de la maladie, cette espèce a longtemps été considérée comme le seul vecteur du virus de la FCO dans le bassin méditerranéen. Cependant, la présence dans certaines régions européennes (zone de moyenne altitude en Sicile, régions d'Italie du Nord)

de la maladie où *C. imicola* était absent a permis de suspecter d'autres espèces paléarctiques autochtones dans la transmission du virus.

En août 2006, dans la localité de Someren, près de Maastricht dans les Pays-Bas, la maladie fut confirmée chez des animaux qui présentaient des symptômes cliniques caractéristiques. Le 17 août 2006, l'introduction de la FCO, sérotype 8, fut déclarée officiellement par les Pays-Bas. L'introduction d'animaux infectés reste l'hypothèse la plus acceptée (Mellor *et al.*, 2000). Les espèces autochtones de *Culicoides* se sont avérées très efficaces dans la transmission de ce virus. La maladie a progressé dans toute l'Europe atteignant rapidement la Belgique, l'Allemagne, le Luxembourg, la France, le Danemark, la République Tchèque, la Suisse, l'Italie et le Royaume Uni. Parallèlement à la progression du sérotype 8 de la FCO depuis le nord de l'Europe, le sérotype 1 s'est propagé depuis le sud vers le nord de l'Europe en passant par l'Espagne et le Portugal pour atteindre la France (Wilson and Mellor, 2009). Aujourd'hui, en Europe, on incrimine plusieurs espèces locales dans la transmission du virus de la FCO : *C. obsoletus* Meigen (Mellor and Prrzous, 1979), *C. scoticus* Downes & Kettle, *C. chiopterus* Meigen (Carpenter *et al.*, 2008), *C. dewulfi* Goetghebuer (Meiswinkel *et al.*, 2008), *C. pulicaris* Linné (Torina *et al.*, 2004), *C. lupicaris* Downes & Kettle (Romón *et al.*, 2011).

À l'échelle mondiale, en associant les espèces vectrices présentes dans une zone et les différents sérotypes circulant, des patho-systèmes de FCO peuvent être définis (Figure 1.15). À ce jour, 6 patho-systèmes sont géographiquement identifiables : *C. sonorensis* Wirth & Jones/sérotypes d'Amérique du Nord (2, 10, 11, 13, 17) ; *C. insignis* Lutz/sérotypes d'Amérique du Sud, Amérique Centrale et Caraïbes (1, 3, 6, 8, 12, 14, 17) ; *C. obsoletus*, *C. chiopterus*, *C. pulicaris*, *C. dewulfi*, *C. imicola*/sérotypes d'Europe du Nord et centrale (1, 2, 4, 8, 9, 16) ; *C. imicola*/sérotypes d'Europe du Sud et Afrique (1-19, 22, 24) ; *C. brevitarsis* Kieffer, *C. wadii* Kitaoka/sérotypes d'Asie (1-4, 9, 12, 14-21) et *C. brevitarsis*, *C. wadii*/sérotypes d'Océanie (1, 3, 7, 9, 16, 20, 21, 23).



**Figure 1.15** Patho-systèmes de FCO : distributions des sérotypes de FCO et des principaux vecteurs (source Tabachnik, 2003).

La peste équine est une maladie non contagieuse, enzootique en Afrique subsaharienne, qui touche principalement les équins. Cette pathologie cause la mort de 95% des animaux atteints et présente plusieurs formes : pulmonaire, cardiaque, aigüe et fiévreuse. Elle a été mise en évidence en 1719 en Afrique du Sud, quand plus de 1 500 animaux sont morts en quelques mois. Entre 1987 et 1990, l'Espagne et le Portugal ont été touchés par le sérotype 4 de la peste équine (il existe 9 sérotypes reconnus), illustrant la capacité de cette maladie à émerger en Europe (Mellor and Hamblin, 2004).

La maladie épizootique hémorragique des cervidés est enzootique aux États-Unis, en Afrique subsaharienne, en Asie du Sud-est et en Australie et touche principalement les ruminants sauvages (Mellor *et al.*, 2000, Sailleau *et al.*, 2010). À ce jour, 7 sérotypes sont reconnus (Anthony *et al.*, 2009). Les signes cliniques sont similaires à ceux caractéristiques de la FCO chez les ovins (fièvre, faiblesse, œdèmes) accompagnés parfois d'un syndrome hémorragique et d'ulcérations. Elle a été observée pour la première fois aux États-Unis chez des cerfs de Virginie (Shope *et al.*, 1960). Elle a été aussi observée chez des bovins et des ovins domestiques (Howerth *et al.*, 2001).

La maladie de Schmallenberg, non contagieuse, touche les ruminants et se caractérise par des fièvres, altérations de l'état général, baisse de la production de lait, mais aussi par une mortalité importante et des malformations à la naissance (Garigliany *et al.*, 2012). Elle a



été détectée pour la première fois en novembre 2011 dans la ville de Schmallingenberg en Allemagne chez des bovins (Hoffmann *et al.*, 2013). Depuis sa détection, la maladie s'est répandue en Europe et touche actuellement une vingtaine de pays, et environ 10 000 élevages ([www.plateforme-esa.fr](http://www.plateforme-esa.fr)).

L'impact de ces maladies virales peut être direct, avec chez les animaux atteints des retards de croissance, des avortements, des pertes de production (poids, lait, viande, laine) et un taux de mortalité relativement élevé. Mais, les dommages peuvent aussi être indirects : perte de revenus suite aux refus d'animaux et de produits dérivés aux marchés pendant les périodes de restrictions de mouvements, et coûts additionnels liés au travail supplémentaire, à la vaccination, au traitement des animaux malades ou au contrôle des vecteurs (Gourreau, 2009).

### 1.3 Législation et réglementation sanitaires

---

La fièvre catarrhale ovine est une maladie réglementée en Europe, fixant notamment les dispositions relatives aux mesures de lutte. La directive 2000/75/CEE de la commission européenne établit que les états membres doivent notifier obligatoirement et immédiatement à l'OIE toute suspicion ou confirmation de circulation du virus ou de foyers de FCO. Les exploitations suspectes doivent être placées sous surveillance officielle, tous les individus morts, infectés ou susceptibles doivent être recensés. Le recensement des gîtes de reproduction des vecteurs et une enquête épidémiologique sont demandés. Tout mouvement d'animaux en provenance ou à destination de la ou des exploitations infectées est interdit, les animaux vivants doivent être confinés aux heures de forte activité des vecteurs et les cadavres des animaux doivent être détruits. L'utilisation d'insecticides autorisés est encouragée pour le traitement des animaux, des bâtiments et de leurs abords. Lorsque la maladie est confirmée la Commission fait procéder aux abattages jugés nécessaires, fait détruire les cadavres de ces animaux et fait mener une enquête épidémiologique. Cette enquête doit porter sur l'origine possible de la maladie, la présence et la distribution des vecteurs et la traçabilité des animaux de l'exploitation. Deux zones sont délimitées, la zone de protection avec un rayon de 100 km autour de toute exploitation infectée et la zone de surveillance 50 km au-delà de la zone de protection. Dans la zone de protection toutes les exploitations avec des animaux doivent être identifiées, une enquête épidémiologique doit être menée et la sortie des animaux, du sperme et des embryons de cette zone est interdite. Dans la zone de surveillance, toute vaccination contre la FCO est interdite. Ces recommandations ont été appliquées lors de la crise sanitaire de FCO qui a touché presque tous les États membres entre 2007 et 2008.

En avril 2007, l'EFSA a publié un rapport sur les vecteurs et les vaccins de la FCO en réponse à une demande de la Commission Européenne. Le rapport recommande l'utilisation de vaccins inactivés comme première ligne de défense en zone infectée, et le traitement insecticide des animaux à haute valeur économique (béliers et taureaux reproducteurs) dans les zones infectées et des moyens de transport des animaux pour prévenir les mouvements des

vecteurs infectés. Ces recommandations sur les traitements insecticides ont été données sans confirmation de leur efficacité.

En 2008, l'EFSA a publié un rapport (EFSA, 2008) dans lequel le rapport de 2007 est repris et complété. Ce document souligne l'absence d'évaluation des insecticides et répulsifs contre les *Culicoides* pour réduire le contact hôte/vecteur ou le risque de transmission lors du transit d'animaux. Il est aussi souligné la faible efficacité des formulations *pour-on* ou des clips auriculaires insecticides liée à la difficile diffusion du produit sur le corps de l'animal et à une persistance d'activité limitée dans le temps.

En 2009, l'AFSSA a émis un avis sur l'intérêt de la mise en œuvre des mesures de désinsectisation dans le protocole de lutte contre la fièvre catarrhale ovine. Ce document souligne que la lutte contre les stades larvaires n'est pas envisageable dans le contexte européen puisque l'épandage d'insecticide est réglementé et que les gîtes larvaires des espèces de *Culicoides* sont mal caractérisés ou inaccessibles. Concernant la lutte contre les adultes, le document argumente que les adulticides ne doivent pas être utilisés dans l'environnement en raison des conséquences environnementales très importantes et de leur faible efficacité. En revanche, en dernier ressort, l'avis recommande l'utilisation d'insecticides en application sélective (aspersions à l'intérieur des bâtiments d'élevage, application sur les animaux) en l'absence de vaccin pour les animaux à risque, les animaux infectés et les animaux qui doivent quitter les zones infectées pour, par exemple, l'abattage.

Le ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire publie l'arrêté du 22 juillet 2011 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre la fièvre catarrhale du mouton sur le territoire métropolitain. Concernant les insecticides, il est demandé aux éleveurs de traiter régulièrement leurs animaux et les bâtiments à l'aide de produits autorisés. Les véhicules transportant les animaux doivent être désinsectisés avant de quitter ou de traverser la zone de protection. Mais, ces recommandations manquent de détails par rapport à la substance active, la formulation et la concentration à utiliser.

Le Centre national d'expertise sur les vecteurs en mai 2012 a émis une analyse du cadre actuel de gestion de la surveillance et du contrôle des *Culicoides* vecteurs de fièvre catarrhale du mouton en France métropolitaine ([www.cnev.fr](http://www.cnev.fr)). Ce rapport s'intéresse aux mesures de police sanitaire. Concernant le recensement des espèces de *Culicoides* présentes dans un élevage infecté dans le but d'évaluer le risque, il est exposé que cette mesure peut être utile si les captures sont réalisées au moment même d'une transmission intense pour identifier la ou les espèces impliquées dans la transmission. Il est aussi signalé que la prospection larvaire peut permettre de récolter les espèces cryptiques qui sont peu ou pas capturées par le piège lumineux mais a peu d'intérêt opérationnel. En revanche, l'étude de l'écologie larvaire des *Culicoides* devrait être une priorité de recherche dans le but d'envisager ultérieurement des méthodes de lutte anti-larvaire



À propos du confinement des animaux des espèces sensibles, le CNEV, dans son avis, formule que cette stratégie est utile seulement si les bâtiments utilisés sont « *insect proof* » afin de limiter le contact hôte/vecteur. En plus, il a été démontré que certaines espèces de *Culicoides* ont un comportement endophage comme celles du groupe *Obsoletus* (Baldet, 2008) qui sont les plus présentes en Europe. L'efficacité de cette stratégie peut être augmentée si des animaux sont présents à l'extérieur, en même temps que l'on garde les animaux de valeur à protéger à l'intérieur.

Concernant le traitement insecticide, cet avis expose qu'il n'existe pas de données permettant de juger l'efficacité de traitements insecticides des bâtiments ou des véhicules de transport. En revanche, sur l'efficacité des traitements des animaux, l'avis affirme que les produits disponibles n'offrent pas une protection à 100 % efficace contre la piqûre des *Culicoides*.

## 1.4 Méthodes de lutte contre les *Culicoides*

---

La lutte contre les *Culicoides* a d'abord été dirigée contre les espèces de *Culicoides* représentant une nuisance importante dans certaines régions des États-Unis ou en Ecosse. En effet, dans ces zones, les densités importantes – des taux d'attaque de 10 à 635 moucheron par minute sur le bras exposé d'une personne ont pu être enregistrés (Carpenter *et al.*, 2005) – peuvent avoir des répercussions considérables sur les activités de plein air et affecter le tourisme local (Hendry and Godwin, 1988). Ainsi, les premiers essais de lutte contre les populations de *Culicoides* ont été réalisés en Floride dans les années 1950. La mangrove a été traitée avec du dichlorodiphényldichloroéthane (DDT) 5% à l'aide d'un avion épandeur sans prendre en compte l'impact sur la faune non cible et sur l'environnement. Les résultats obtenus étaient faibles et limités dans le temps, avec une protection de la zone jusqu'à 6 jours après le traitement (Madden, 1946). Depuis, de nombreux moyens ont été utilisés pour lutter contre les *Culicoides* et sont exposés ci-après.

### 1.4.1 La lutte écologique

La lutte écologique comprend toutes les mesures menées sur l'environnement pour réduire le développement des populations de *Culicoides*. Les habitats larvaires peuvent être réduits voire éliminés en drainant et asséchant les points d'eau ou en évitant que ces gîtes se forment avec une bonne gestion des pratiques agricoles (Mellor and Wittmann, 2002). Lorsque les habitats larvaires sont bien caractérisés, comme pour *C. sonorensis*, vecteur confirmé du virus de la FCO en Amérique du Nord, cette méthode permet une lutte efficace et pérenne. C'est ainsi qu'en réduisant les niveaux d'eau autour des élevages, une réduction du nombre de *Culicoides sonorensis* est constatée (Mullens, 1992). La gestion des déchets organiques issus des élevages (bouses et fumiers) devrait réduire le nombre d'individus des espèces de *Culicoides*, dont les gîtes larvaires sont très souvent associés aux sites riches en matières organiques en décomposition. Néanmoins, il a été démontré que couvrir les bouses de vaches dans un élevage bovin au Royaume-Uni avec un plastique reste inefficace (Harrup *et al.*, 2014). En Israël, l'épandage régulier à distance du fumier issu de l'élevage a permis de réduire le nombre de *C. imicola* capturés. Les conditions particulières de fortes températures

et de sécheresse peuvent expliquer l'efficacité dans ce contexte méditerranéen aride (Braverman, 1994). Les difficultés logistiques de ce type de pratique rendent laborieuses ces méthodes tout en n'étant pas certain de leur efficacité.

### 1.4.2 La lutte biologique

La lutte biologique utilise un ennemi naturel, prédateur ou pathogène, pour diminuer le nombre de *Culicoides* et ainsi réduire le risque de transmission. Deux espèces de coléoptères prédateurs ont été identifiées : une cicindèle (*Cicindela suturalis*) se nourrissant de nymphes de *Culicoides phlebotomus* Williston aux Antilles, et un carabe (*Elaphrus cupreus*) en France. Ce dernier peut dévorer jusqu'à 60 nymphes de *C. riethi* Kieffer en une demi-heure (Rieb et Delécolle, 1981).

Dans la lutte biologique, il est aussi possible d'utiliser des parasites, virus, bactéries et même des champignons entomophages. Si des parasites comme les vers du genre *Heleidomernis* (Mullens and Velten, 1994) et ou des virus du genre *Iridovirus* (Mullens *et al.*, 1999) ont été identifiés dans plusieurs espèces de *Culicoides*, leur effet pathogène et leur utilisation comme lutte biologique n'a pas été évaluée. L'infection avec des bactéries symbiotiques du genre *Wolbachia*, ayant la capacité de modifier la reproduction de leurs hôtes et réduire leur durée de vie, s'est montrée efficace dans la lutte contre *Aedes aegypti*, principal vecteur de la dengue et de la fièvre jaune en Australie (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011). Son utilisation contre les *Culicoides* n'a jamais été évaluée, mais, les premières étapes de caractérisation de leur faune bactérienne ont montré la présence de plusieurs genres de bactéries endosymbiotiques dans quelques espèces vectrices en Europe (Lewis *et al.*, 2014). L'utilisation de conidies du champignon entomophage *Metarhizium anisopliae* s'est montrée efficace contre les *Culicoides* au laboratoire (Ansari *et al.*, 2011).

Le potentiel de ces méthodes est jusqu'à présent peu étudié au vu de la complexité de sa mise en œuvre. En effet, elles demandent à être confirmées sur le terrain et de manière opérationnelle.

### 1.4.3 La lutte mécanique

La lutte mécanique consiste à placer des barrières physiques autour des animaux comme des moustiquaires ou des murs d'un bâtiment dans le but de réduire le contact hôte/vecteur. Une pratique très utilisée est la stabulation des animaux à l'intérieur des bâtiments pendant les périodes de forte activité de *Culicoides*. Cette méthode dépend de l'étanchéité des bâtiments par rapport aux *Culicoides* (combien d'entre eux peuvent entrer) et du comportement endophage (qui pique à l'intérieur des bâtiments) ou exophage (qui pique à l'extérieur des bâtiments) des espèces locales. En Afrique du sud, des chevaux ont été rentrés dans des écuries pendant la nuit, pour les protéger contre les piqûres de *C. imicola*, vecteur nocturne et exophage du virus de la peste équine. Il a été observé que les individus de cette espèce étaient capturés en moindre proportion à l'intérieur du bâtiment qu'à l'extérieur (Meiswinkel *et al.*, 2000). En Europe, il a été observé que *C. obsoletus* vecteur du virus de la

FCO, était capable de rentrer dans les bâtiments pour piquer (Baldet *et al.*, 2008), d'autant plus facilement que les ouvertures des bâtiments sont importantes (Baylis *et al.*, 2010). Ce comportement endophage peut varier selon les saisons, avec une endophagie plus marquée en fin de saison (automne) qu'en début (printemps).

#### 1.4.4 La lutte chimique

##### 1.4.4.1 Les différentes méthodes

La lutte chimique consiste à utiliser des produits synthétiques en tant que répulsifs, attractants ou insecticides pour réduire le contact hôte-vecteur ou les populations de *Culicoides*. Parmi les produits répulsifs disponibles sur le marché, aucun n'est utilisé pour protéger les ruminants domestiques contre les piqûres de *Culicoides*. Ils sont utilisés uniquement sur les chevaux et les hommes. Les substances répulsives considérées comme les plus performantes sont le DEET, la perméthrine, le p-menthane-3,8diol (PMD) et le KBR3023 ou picaridine. Leur efficacité reste très limitée dans le temps et des applications régulières sont nécessaires (Carpenter *et al.*, 2005). Avec le manque de cadre législatif concernant les répulsifs et le croissant engouement pour l'utilisation de produits organiques ou « verts » (Isman, 2006), la liste de produits disponibles dans le commerce dits naturels est longue. L'efficacité des huiles essentielles (produits très commercialisés) contre les *Culicoides* a été testée, et quelques-unes comme la citronnelle (Page *et al.*, 2009) et le neem (González *et al.*, 2014) n'ont pas eu l'effet attendu. Au contraire, les huiles essentielles d'eucalyptus citronné (Trigg, 1996), origan (Braverman *et al.* 1999), arbre à thé (Braverman and Chizov-Ginzburg, 1997 ; Braverman *et al.*, 1999), neem (Blackwell *et al.*, 2004), eucalyptus et lavende (González *et al.* 2014) ont montré un effet répulsif contre les *Culicoides*. Les différentes méthodes expérimentales utilisées pour évaluer l'efficacité de ces substances, rendent difficile la comparaison entre les résultats obtenus.

Divers produits attractifs couplés à des pièges ont été développés pour capturer les *Culicoides* afin de réduire leurs populations (Kline, 2006). Quelques études réalisées ont obtenu des résultats très variables. Par exemple, en piégeant les *Culicoides* avec un Mosquito Magnet ® associant le CO<sub>2</sub> avec le 1-octen-3-ol, le 3-n-propyl-phenol et le 4-methylphenol, entre 2 et 70% de plus d'individus ont été collectés par rapport à un piège témoin sans attractif (Cilek and Hallmon, 2005). Néanmoins, quelle que soit la méthode, seule une faible proportion de la population des *Culicoides* est capturée, limitant l'impact de ces méthodes sur la transmission.

Les traitements insecticides peuvent viser les phases larvaires ou adultes. Pour que des larvicides puissent être utilisés, les gîtes larvaires des populations cibles doivent être bien caractérisés. Pour les espèces de *Culicoides* d'intérêt en Europe, les habitats larvaires sont soit mal caractérisés, soit ubiquistes, soit inaccessibles, ne permettant pas l'utilisation de ce type de produits. Aux États-Unis, des produits insecticides de la famille des organochlorés ont été utilisés dans les zones marécageuses de la Floride contre l'espèce nuisante, *C. furens* Coquillet, dont le gîte larvaire est connu. Mais suite à l'émergence de résistances aux

organochlorés (Clements and Rogers, 1968) et à cause de leur impact sur la faune non-cible, l'utilisation de larvicides chimiques contre cette espèce et contre les *Culicoides* en général a été abandonnée. Avec l'avènement de nouveaux larvicides d'origine biologique comme *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti), vu que des résultats satisfaisants ont été obtenus aux États-Unis contre les *Culicoides* des zones marécageuses du Nord (Hershey 1998), il est recommandé d'évaluer leur efficacité contre les *Culicoides* (Carpenter *et al.*, 2008), sans oublier que les larves peuvent être présentes dans des milieux semi-solides riches en matière organique. Ce qui réduirait l'accessibilité des larves au produit. Une autre alternative serait l'utilisation d'IGR, efficaces en inhibant le développement d'*Aedes albopictus* Skuse (Fulcher *et al.*, 2014) et de *Stomoxys calcitrans* Linné (Liu *et al.*, 2012).

Les adulticides sont des moyens de contrôle très utilisés pour lutter contre les insectes nuisibles et vecteurs. Les produits visant à réduire le nombre d'individus pouvant piquer les animaux et ainsi transmettre les maladies, peuvent être appliqués à l'intérieur des bâtiments d'élevage, sur des moustiquaires, sur des supports comme bâches et murs, ou directement sur les animaux.

### 1.4.4.2 Connaissances actuelles sur l'évaluation des insecticides contre les *Culicoides*

Différentes phases sont nécessaires pour évaluer des produits insecticides. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) (WHO, 2013) définit les études de phase I comme celles menées, au laboratoire, en conditions contrôlées pour évaluer la sensibilité des vecteurs aux substances actives. Des valeurs indicatives indispensables comme les concentrations de produit entraînant la mort de 50% (CL<sub>50</sub>) et 90% (CL<sub>90</sub>) des individus après exposition à la substance active, sont ainsi établies. Les études de phase II sont celles menées au laboratoire et sur le terrain à petite échelle, en conditions semi- contrôlées et permettent d'évaluer l'efficacité des formulations, en termes de mortalité et d'inhibition du repas de sang. Les études de phase III sont celles menées sur le terrain à grande échelle et permettent d'évaluer, en conditions naturelles non contrôlées, l'efficacité des traitements.

#### *Essais de phase I sur la sensibilité des Culicoides aux substances actives*

Des tests au laboratoire ont permis de déterminer les concentrations létales CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub> de plusieurs substances actives pour différentes espèces de *Culicoides*. La première étude menée, en 1968 par Service, a déterminé la CL<sub>90</sub> pour le DDT (1,70%) et pour la dieldrine (0,51%) vis-à-vis de spécimens de *C. obsoletus* capturés sur le terrain et en utilisant la technique des applications topiques. Classiquement, les tunnels et les tubes OMS sont utilisés pour obtenir ces valeurs de référence (CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub>).

Le tunnel consiste en un tube cylindrique de 15,5 cm de diamètre et de 88 cm de longueur, dans lequel est placée une cage avec des *Culicoides*. La substance active à concentration connue est atomisée sur la cage. Les individus exposés sont placés dans une nouvelle cage, mis en observation avec température et humidité constantes, de l'eau sucrée est

mise à leur disposition sur un coton posé sur la cage et la mortalité est enregistrée 1h et 24 h après exposition. L'utilisation d'une gamme de plusieurs concentrations permet de calculer les CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub>. Les résultats synthétisés (Tableau 1.5) ont montré que *C. variipennis* Coquillet (actuellement *C. sonorensis*) et *C. mississippiensis* Hoffman (espèces nord-américaines) sont sensibles aux substances actives évaluées et que les deux espèces possèdent des sensibilités bien distinctes (Kline *et al.*, 1981 ; Floore 1985 ; Holbrook, 1986).

**Tableau 1.5** Sensibilité de différentes espèces de *Culicoides* à différentes substances actives évaluée en utilisant des tests en tunnel.

Famille	Produit	Espèce	Résultats	Auteur
Substance active				
<b>Pyréthroïde</b>				
Decaméthrine		<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0001 % (0,0001-0,0001) CL <sub>90</sub> : 0,0009 % (0,0006-0,0014)	Kline <i>et al.</i> , 1981
Fenvalérate		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0210 % (0,0170-0,0230) CL <sub>90</sub> : 0,0610 % (0,0520-0,0690)	Holbrook, 1986
Perméthrine		<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0003 % (0,0002-0,0005) CL <sub>90</sub> : 0,0049 % (0,0031-0,0098)	Kline <i>et al.</i> , 1981
		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0110 % (0,0060-0,0140) CL <sub>90</sub> : 0,0270 % (0,0170-0,0350)	Holbrook, 1986
	Pramex	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0006 % (0,0005-0,0006) CL <sub>90</sub> : 0,0025 % (0,0021-0,0030)	Floore, 1985
Phénothrine	Sumithrin	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0024 % (0,0022-0,0027) CL <sub>90</sub> : 0,0012 % (0,0096-0,0131)	Floore, 1985
Resméthrine		<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0012 % (0,0007-0,0016) CL <sub>90</sub> : 0,0113 % (0,0083-0,0178)	Kline <i>et al.</i> , 1981
		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0120 % (0,0090-0,0140) CL <sub>90</sub> : 0,0250 % (0,0200-0,0340)	Holbrook, 1986
	SBP 1382-40F	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0007 % (0,0004-0,0010) CL <sub>90</sub> : 0,0135 % (0,0090-0,0209)	Floore, 1985
rf-Phénothrine		<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0022 % (0,0002-0,0125) CL <sub>90</sub> : 0,0303 % (0,0116-0,0369)	Kline <i>et al.</i> , 1981
<b>Organophosphoré</b>				
Chlorfenvinphos		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,2830 % (0,1520-0,4720) CL <sub>90</sub> : 0,8760 % (0,5050-1,3840)	Holbrook, 1986
Chlorpyrifos		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0120 % (0,0110-0,0160) CL <sub>90</sub> : 0,0220 % (0,0190-0,0280)	Holbrook, 1986
	Dursban	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0098 % (0,0085-0,0012) CL <sub>90</sub> : 0,0274 % (0,0231-0,0324)	Floore, 1985
Crotoxyphos		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,6610 % (0,5730-0,7920) CL <sub>90</sub> : 2,0950 % (1,9400-2,3010)	Holbrook, 1986
Dichlorvos		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0680 % (0,0570-0,0820) CL <sub>90</sub> : 0,1690 % (0,0950-0,2570)	Holbrook, 1986
Dioxathion		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,4630 % (0,4280-0,5050) CL <sub>90</sub> : 1,2700 % (0,9620-1,5590)	Holbrook, 1986
Fénitrothion	Sumithion	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0325 % (0,0304-0,0348) CL <sub>90</sub> : 0,0881 % (0,0817-0,0953)	Floore, 1985
Fenthion		<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0290 % (0,0244-0,0346) CL <sub>90</sub> : 0,3590 % (0,2534-0,5617)	Kline <i>et al.</i> , 1981
		<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,1530 % (0,1040-0,2030) CL <sub>90</sub> : 0,3860 % (0,3290-0,4930)	Holbrook, 1986
	Baytex	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0110 % (0,0099-0,0124) CL <sub>90</sub> : 0,0231 % (0,0207-0,0258)	Floore, 1985
Malathion		<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0240 % (0,0147-0,0334) CL <sub>90</sub> : 0,2121 % (0,1320-0,4990)	Kline <i>et al.</i> , 1981
	Cythion	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0232 % (0,0219-0,0247) CL <sub>90</sub> : 0,0667 % (0,0603-0,0736)	Floore, 1985
Naled		<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0114 % (0,0082-0,0149) CL <sub>90</sub> : 0,0738 % (0,0512-0,1288)	Kline <i>et al.</i> , 1981



	<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0640 % (0,0540-0,0800) CL <sub>90</sub> : 0,1110 % (0,0900-0,1290)	Holbrook, 1986
Dibrom	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0586 % (0,0530-0,0649) CL <sub>90</sub> : 0,1530 % (0,1420-0,1640)	Floore, 1985
Temephos	<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,6020 % (0,5380-0,6560) CL <sub>90</sub> : 1,3510 % (1,2300-1,5103)	Holbrook, 1986
<b>Carbamate</b>			
Bendiocarb	<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0190 % (0,0190-0,0250) CL <sub>90</sub> : 0,1100 % (0,0620-0,1440)	Holbrook, 1986
Propoxur	<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0430 % (0,0340-0,0530) CL <sub>90</sub> : 0,0750 % (0,0530-0,1040)	Holbrook, 1986
<b>Mélange</b>			
Malathion/ Resméthrine	<i>C. mississippiensis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0067 % (0,0061-0,0074) CL <sub>90</sub> : 0,0335 % (0,0285-0,0393)	Floore, 1985
<b>Organochloré</b>			
Methoxychlor	<i>C. variipennis</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0570 % (0,0490-0,0670) CL <sub>90</sub> : 0,1440 % (0,1120-0,1680)	Holbrook, 1986

*C. variipennis* Coquillet (actuellement *C. sonorensis* With & Jones)

Les tubes OMS consistent en un tube cylindrique d'environ 3,5 cm de diamètre et de 12 cm de longueur, dans lequel est placé un papier imprégné d'une substance active avec une concentration connue. Des *Culicoides* sont placés à l'intérieur du tube et pendant 1 h ils sont exposés au papier imprégné. Par la suite, ils sont placés dans un nouveau tube, mis en observation avec température et humidité constantes, de l'eau sucrée est mise à leur disposition sur un coton posé sur le tube et la mortalité est enregistrée 1 h et 24 h après exposition. L'utilisation d'une gamme de plusieurs concentrations permet de calculer les CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub>. Les résultats synthétisés (Tableau 1.6) ont montré que *C. imicola*, *C. obsoletus* et *C. nubeculosus* sont sensibles aux substances actives de la famille des pyréthriinoïdes et que les différentes espèces possèdent des sensibilités bien distinctes (Braverman *et al.*, 1995 ; Braverman *et al.*, 2004).

**Tableau 1.6** Sensibilité de différentes espèces de *Culicoides* à différentes substances actives évaluée en utilisant les tubes OMS.

Substance active	Espèce	Résultats	Auteur
Cyhalothrine*	<i>C. imicola</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0730 % (0,0460-0,1050) CL <sub>90</sub> : 0,4600 % (1,2610-1,4040)	Braverman <i>et al.</i> , 1995
Lambda-cyhalothrine*	<i>C. imicola</i>	CL <sub>50</sub> : 0,0098 % (0,0074-0,0125) CL <sub>90</sub> : 0,0564 % (0,0442-0,0767)	Braverman <i>et al.</i> , 2004

\*Pyréthriinoïde

### Essais de phase II sur l'efficacité des formulations insecticides contre les *Culicoides* en laboratoire en conditions contrôlées ou semi-contrôlées (terrain-laboratoire)

#### Effet léthal des formulations insecticides contre les *Culicoides*

En laboratoire, différentes études ont évalué l'effet léthal des formulations insecticides appliquées sur des supports (Tableau 1.7). Des mailles en aluminium ont été traitées avec différents insecticides et leur effet léthal a été observé en exposant des *Culicoides*. L'effet a été suivi dans le temps, les traitements avec le malathion (organochloré) et le propoxur (carbamate) sont très efficaces avec des mortalités supérieures à 97 % à 35 jours après le traitement (Jamnback, 1961 ; Jamnback and Watthews, 1963 ; Kline et Roberts, 1981). Des vêtements noirs ont été traités avec deux organochlorés, Lindane et DDT (dichlorodiphényldichloroéthane), à des concentrations variant entre 135 et 2694 mg/m<sup>2</sup> de substance active. Des individus de l'espèce *C. obsoletus* ont été par la suite, exposés aux habits. L'efficacité du produit a été suivie dans le temps en observant la mortalité sur plusieurs jours après le traitement. Le traitement est efficace au début avec une mortalité de 95% puis l'effet décroît : à 12 jours après le traitement la mortalité est de 52-82 %. Aucun effet léthal n'est observé 26 jours après le traitement (Hill et Roberts, 1947). Dans une autre étude, l'Oxyfly (dont la substance active est la lambda-cyperméthrine, un pyréthrianoïde) a été appliqué sur des plaques de bois à une concentration de 250 mg de substance active par m<sup>2</sup>, puis les *Culicoides* ont été exposés à ce support de 5 à 30 secondes et la mortalité a été enregistrée. Le test a été répété toutes les semaines pour suivre l'efficacité du produit dans le temps. L'Oxyfly est resté très performant jusqu'à 9 semaines après le traitement (Schmahl *et al.*, 2008).

**Tableau 1.7** Efficacité létale de différentes formulations appliquées sur des supports contre les *Culicoides*.

Substance active	Produit	Espèce	Support et dosage	Résultats	Auteur
Lambda-cyperméthrine*	Oxyfly	<i>C. sp</i>	Plaques en bois 250 mg/m <sup>2</sup>	Mortalité à 9 s.a.t.	Schmahl <i>et al.</i> , 2008
Malathion <sup>o</sup>	s.a.	<i>C. sp</i>	Moustiquaire en aluminium à 6 et 7,7 % s.a.	À 6% : mort. 100 % à 27 j.a.t. À 7,7% : mort. 100 % à 21 j.a.t.	Jamnback and Watthews, 1963 Jamnback, 1961
Propoxur <sup>¶</sup>	s.a.	<i>C. sp</i>	Moustiquaire en aluminium à 5 % s.a.	Mort. 100 % à 27 j.a.t.	Jamnback and Watthews, 1963
		<i>C. mis</i>	Moustiquaire en aluminium à 8 % s.a.	Mort. > 97 % à 35 j.a.t.	Kline et Roberts, 1981
Lindane <sup>§</sup> + DDT <sup>§</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	Vêtements noirs 135-2694 mg/m <sup>2</sup>	Mort. initiale 95 % Mort. 52-82 % à 12 j.a.t. Pas de mortalité à 26 j.a.t.	Hill et Roberts, 1947

\*Pyréthrianoïde, <sup>o</sup>Organophosphoré, <sup>§</sup>Organochloré, <sup>¶</sup>Carbamate, s.a. : substance active, *C. obs* : *C. obsoletus*, *C. mis* : *C. mississippiensis*, s.a.t. : semaines après traitement, j.a.t. : jours après traitement, mort. : mortalité.

L'effet létal des formulations insecticides, applicables sur des animaux, contre les *Culicoides* est généralement évalué en laboratoire et sur le terrain en conditions semi-contrôlées en traitant sur le terrain les animaux, puis des poils de différentes parties du corps sont coupés, transportés en laboratoire et mis en contact direct avec les *Culicoides*. La mortalité est suivie dans le temps. Les résultats obtenus jusqu'à présent (Tableau 1.8) suggèrent que les différentes formulations évaluées, ont d'excellentes performances létales contre les *Culicoides*. En effet, des produits comme Flypor, Butox 7.5 Pour-on, Versatrine, Acadrex 60 ou Arkofly, ont 100 % d'efficacité jusqu'à 35 jours (5 semaines) après le traitement sur bovins et ovins (Schmahl *et al.*, 2009a, Schmahl *et al.*, 2009b). Le produit le moins efficace, Deosect spray sur cheval, ne produit qu'une mortalité de 60 % à 21 jours après le traitement avec les poils des pattes (Papadopoulos *et al.*, 2010). La différence entre l'efficacité des poils du dos et ceux des pattes, montre que le produit est plus disponible sur le dos que sur les pattes. Une mauvaise diffusion du produit (Carpenter *et al.*, 2008) et une absorption rapide des substances actives au travers de la peau des animaux traités (Taylor *et al.*, 1994) ont été suggérées comme explication.

**Tableau 1.8** Efficacité létale de différentes formulations insecticides appliquées sur les animaux contre les *Culicoides*, évaluée en les exposants aux poils coupés d'animaux traités.

Substance Active	Produit	Espèce	Animal traité et dosage	Résultats	Auteur
Alpha-cyperméthrine*	Dysect Cattle Pour-On	<i>C. nub</i>	Bovin: 10 ml (dos) (15 g s.a/l)	Mort. 80-100 % à 21 j.a.t. (poils de dos, ventre et pattes)	Papadopoulos <i>et al.</i> , 2009
	Dysect Sheep Pour-On	<i>C. nub</i>	Ovin: 20 ml (dos) + 20 ml (queue-côtés) (12.5 g s.a./l)	Mort. 60-80 % à 28 j.a.t. (poils de dos, ventre et pattes)	Papadopoulos <i>et al.</i> , 2009
Cyfluthrine*	Bayofly	<i>C. sp</i>	Bovin: 10 ml Ovin: 1, 2 et 5 ml (10 g s.a/l)	Mort. 100 % à 21 j.a.t. Mort. 100 % à 21 j.a.t. (1, 2 ml) et 35 j.a.t. (5 ml)	Melhorn <i>et al.</i> , 2008a
Cyperméthrine*	Deosect spray	<i>C. nub</i>	Cheval: 10 ml/500 ml d'eau (5.0%, w/v)	Mort. 60 % à 35 j.a.t. (dos en ventre) 60 % à 21 j.a.t (pattes)	Papadopoulos <i>et al.</i> , 2010
Deltaméthrine*	Butox 7.5 Pour-on	<i>C. obs</i>	Bovin: 30 ml (dos) Ovin: 10 ml (dos) (7.5 g s.a./L)	Mort. 100 % à 35 j.a.t.	Schmal <i>et al.</i> , 2009a
		<i>C. sp</i>	Bovin: 30 ml (dos) Ovin: 2 ml (tête) + 2 x 4 ml côtés et pattes	Bovins et ovins: Mort. 100 % à 28 j.a.t.	Melhorn <i>et al.</i> , 2008b
	Versatrine	<i>C. sp</i>	Bovin: 10 ml and 20 ml (dos) Ovin: 5 ml and 10 ml (dos) (1 g s.a/l)	Mort. 100 % à 35 j.a.t.	Schmahl <i>et al.</i> , 2009a
	Acadrex 60	<i>C. sp</i>	Bovin: 20 ml/L tout le corps Ovin: 20 ml/l tout le corps (6 g s.a./100 ml)	Mort. 100 % à 35 j.a.t.	Schmahl <i>et al.</i> , 2009b

	Arkofly	<i>C. sp</i>	Bovin et Ovin: 5 s doc, côtés et ventre (6 g s.a./100ml)	Mort. 100 % à 35 j.a.t.	Schmahl <i>et al.</i> , 2009b
Perméthrine*	Flypor	<i>C. sp</i>	Bovin: 40 ml (dos) Ovins: 10 ml (dos et côtés) (4% w/v /l)	Mort. 100 % à 35 j.a.t.	Schmahl <i>et al.</i> , 2009b

\*Pyréthroïde, *C. nub* : *C. nubeculosus*, *C. sp* : toutes les espèces, *C. obs* : *C. obsoletus*, s.a. : substance active, mort. : mortalité, j.a.t. : jours après traitement.

D'autres études ont été menées en utilisant une méthode différente. Les animaux ont été traités avec des produits insecticides ou antiparasitaires et les *Culicoides* ont été exposés directement sur une partie du corps de l'animal. Une étude menée en Australie, a évalué l'efficacité du traitement des bovins avec l'ivermectine (Avermectine), un antiparasitaire avec un effet insecticide, contre *C. brevistarsis*. Les animaux ont été traités à 200 µg/kg par injection sous-cutanée, puis les *Culicoides* ont été mis en contact pendant 30 minutes avec l'oreille de l'animal. Au bout du temps d'exposition, les *Culicoides* ont été placés dans des petites cages et la mortalité a été enregistrée à 24 h après exposition. Les contacts ont été répétés dans le temps. Les résultats (Tableau 1.9) obtenus ont montré que la première semaine, le produit était très efficace avec des mortalités entre 70 et 100 % (maximum atteint 4 jours après traitement). La mortalité était à 50 % à 10 jours, à moins de 20 % à 15 jours et inférieure à 10 % à 18 jours après le traitement (Standfast *et al.*, 1984). De plus, un effet larvicide des bouses de bovins traités avec de l'ivermectine a été démontré, avec une persistance de 28 jours après traitement (Webster *et al.*, 1992).

**Tableau 1.9** Efficacité létale d'une formulation antiparasitaire appliquée en injection sous-cutanée, évaluée en exposant les *Culicoides* directement aux animaux traités.

Substance Active	Produit	Espèce	Animal traité et dosage	Résultats	Auteurs
Ivermectine <sup>1</sup>		<i>C. bre</i>	Bovin : 200 µg/kg (i.s.c.) exposition à l'oreille	Mort. max 100 % à 4 j.a.t. Mort. 50 % à 10 j.a.t. Persistance 18 jours	Standfast <i>et al.</i> , 1984

<sup>1</sup> Avermectine, *C. bre* : *C. brevistarsis*, i.s.c. : injection sous-cutanée, j.a.t. : jours après traitement.

L'effet léthal des traitements en pulvérisation spatiale avec des formulations micro-encapsulées ou des formulations en ultra bas volume (UBV) à partir d'un avion ont été évaluées. Les résultats (Tableau 1.10) ont été obtenus en observant la quantité de *Culicoides* collectés à l'aide de pièges après le traitement. Les micro-capsules de Mycrocrip (cyperméthrine et esbiothrine) n'ont pas montré d'effet en comparaison avec la zone témoin (Satta *et al.*, 2004). Par contre, les formulations en UBV ont montré une diminution à plusieurs mètres de l'endroit traité en milieu ouvert et même en présence de végétation.

**Tableau 1.10** Efficacité létale de différentes formulations insecticides utilisées en pulvérisation spatiale contre les *Culicoides*.

Substance active	Espèce	Dosage	Résultats	Auteurs
Bifenthrine*	<i>C. sub</i>	0,1 %	>65 % ↓ captures jusqu'à 6 s.a.t. (périurbain)	Standfast <i>et al.</i> , 2003
Cyperméthrine* + esbiothrine *	<i>C. imi</i>	Mycrocrip <sup>1</sup> 1 %/ha	Pas d'effet	Satta <i>et al.</i> , 2004
Malathion <sup>o</sup>	<i>C. fur</i>	100,6 g/ha	Mort. 90 % à 40 m.d.t. (milieu ouvert) Mort. 40 % à 40 m.d.t. (avec végétation)	Linley <i>et al.</i> , 1992
Naled <sup>o</sup>	<i>C. fur</i>	27,6 g/ha	Mort. 90 % à 105 m.d.t. (milieu ouvert) Mort. 40 % à 177 m.d.t. (avec végétation)	Linley <i>et al.</i> , 1992
		36,5 g/ha	24% ↓ captures (milieu ouvert)	Haile <i>et al.</i> , 1984
		73 g/ha	> 99% ↓ captures à 3 j.a.t (milieu ouvert)	Haile <i>et al.</i> , 1984
		1 % à 19-23 L/h	Mort. 90 % à 20 m.d.t. (milieu ouvert)	Linley <i>et al.</i> , 1987
		9,9 g/ha	Mort. 70 % à 18 m.d.t. (milieu ouvert)	Linley <i>et al.</i> , 1987
Resméthrine*	<i>C. fur</i>	15,6 g/ha	Mort. 90 % à 25 m.d.t. (milieu ouvert) Mort. 40 % à 94 m.d.t. (avec végétation)	Linley <i>et al.</i> , 1992

\*Pyréthrianoïde, <sup>o</sup>Organophosphoré, <sup>1</sup>Mycrocrip est une formulation granulée, *C. sub* : *C. subimmaculatus*, *C. fur* : *C. furens*, *C. imi* : *C. imicola*, s.a.t : semaines après traitement, j.a.t : jours après traitement, m.d.t. : mètres du traitement.

### *Effet sur les taux de gorgement et d'attaque des Culicoides*

L'effet sur les taux de gorgement et d'attaque des *Culicoides* est souvent associé à l'effet répulsif des produits, qui repousse les *Culicoides* de l'hôte et qui les empêche de piquer. Parmi les études publiées, deux méthodologies ont été utilisées : i) exposer directement les *Culicoides* aux produits et ii) tester un effet répulsif par un système de piégeage.

#### *i) Exposition directe des Culicoides à des produits*

Des *Culicoides* ont pu ainsi être exposés, en laboratoire, aux poils d'animaux traités posés sur des systèmes de gorgement artificiel, au sang d'animaux traités ou aux substances actives dans un olfactomètre en Y. L'effet répulsif des substances actives est très variable (Tableau 1.11). Quelques produits ont montré un effet répulsif plus important que d'autres. La perméthrine appliquée à une concentration de 65 % sur des caprins a permis de réduire le taux de gorgement de *Culicoides* quand ils ont été exposés à des poils issus des animaux traités et placés sur système de gorgement artificiel. Par contre, il a été constaté que l'effet varie en fonction de la zone du corps de l'animal d'où les poils ont été prélevés. En effet, les poils prélevés sur le dos protégeaient 3 fois plus que les poils prélevés sur le ventre (Mullens, 1993). L'huile essentielle de neem à une concentration de 1 %, testé dans un olfactomètre en Y, a réussi à repousser des individus de *C. impunctatus* Goetghebuer, et aucun gorgement n'a été observé pour des concentrations de 1 % ou 10 % sur des membranes d'un système de gorgement artificiel (Blackwell *et al.* 2004).

**Tableau 1.11** Efficacité répulsive de différentes formulations contre les *Culicoides* évaluée en les exposant directement aux produits.

Substance active	Produit	Espèce	Animal traité et dosage	Résultats	Auteur
<b>Méthode : <i>Culicoides</i> exposés à des poils d'animal traité sur système de gorgement artificiel</b>					
Perméthrine*	s.a.	<i>C. son</i>	Caprin 3-4 ml/animal 65 % s.a.	Réduction du taux de gorgement Dos: 65.6% à 67-69 j.a.t. Tête: 58.4% à 39-41 j.a.t. Ventre: 62.7% à 18-20 j.a.t.	Mullens <i>et al.</i> , 1993
	Boss	<i>C. son</i>	Bovin 3 ml/45 kg 5% s.a.	Pas de réduction du taux de gorgement quelques intoxications à 14-28 j.a.t.	Mullens <i>et al.</i> , 2000
Pirimiphos-méthyl <sup>o</sup>	s.a.	<i>C. son</i>	Bovin 10 ml/45 kg 27 % s.a.	Pas de réduction du taux de gorgement quelques intoxications à 14-28 j.a.t.	Mullens <i>et al.</i> , 2000
<b>Méthode : <i>Culicoides</i> exposés à du sang d'animal traité avec des antiparasitaires en sous cutanée sur système de gorgement artificiel</b>					
Ivermectine <sup>7</sup>		<i>C. son</i>	Poney: 200 µg/kg Ovin: 400 µg/kg	Pas d'effet répulsif	Reeves <i>et al.</i> , 2010
Ivermectine <sup>7</sup> + Clorsulon	Ivomec Plus	<i>C. son</i>	Poney: 200 µg/kg Ovin: 2000 µg/kg	Pas d'effet répulsif	Reeves <i>et al.</i> , 2010
<b>Méthode : Nombre d'atterrissage sur support imprégné</b>					
DEET <sup>x</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 75 % à 2 s et 65 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Eucalytus citroné <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 100 % à 2 s et 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Jasmin <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 90 % à 2 s et 100 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Lavende <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 95 % à 2 s et 100 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Mélisse officinale <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 85 % à 2 s et 100 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
4-propylphenol <sup>o</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 85 % à 2 s et 100 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Jasmin+ Lavende+ Romarin	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 75 % à 2 s et 80 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Acétate de géranyle+ 6-méthyl-5-hepten2 one	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 85 % à 2 s et 80 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Decanal+ nonanal+ octanal	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 65 % à 2 et 80 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
Melisse+ citron+ citronelle+ eucalyptus citroné	s.a.	<i>C. obs</i>	1 µg/µl	Diminution : 95 % à 2 et 100 % à 5 s	González <i>et al.</i> , 2014
<b>Méthode : <i>Culicoides</i> exposés à la substance active dans un olfactomètre en Y</b>					
Acétate de géranyle <sup>x</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 78, 76, 85 %	González <i>et al.</i> , 2014
Citron <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 53, 63, 73 %	González <i>et al.</i> , 2014
Citronelle <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 68, 86, 86 %	González <i>et al.</i> , 2014
Citronello <sup>o</sup>	s.a.	<i>C. imp</i>	NA	Pas d'effet répulsif	Evans <i>et al.</i> , 1996
		<i>C. nub</i>	NA	Concentration minimale d'effet : 10 %	Evans <i>et al.</i> , 1996
Cyperméthrine*	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 69, 50, 67 %	González <i>et al.</i> , 2014

Decanal <sup>a</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 57, 67, 83 %	González <i>et al.</i> , 2014
DEET <sup>x</sup>	s.a.	<i>C. imp</i>	NA	Pas d'effet répulsif	Evans <i>et al.</i> , 1996
	s.a.	<i>C. nub</i>	NA	Pas d'effet répulsif	Evans <i>et al.</i> , 1996
	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 66, 86, 97.8 %	González <i>et al.</i> , 2014
Eucalytus citroné <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 66, 48, 91 %	González <i>et al.</i> , 2014
IR3535 <sup>x</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 53, 58, 81 %	González <i>et al.</i> , 2014
Jasmin <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 86, 86,94 %	González <i>et al.</i> , 2014
Lavende <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 61, 74, 94 %	González <i>et al.</i> , 2014
Limonène <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 48, 56, 58 %	González <i>et al.</i> , 2014
Mélisse officinale <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 66, 80, 88 %	González <i>et al.</i> , 2014
Neem <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. imp</i>	1 et 10 %	Effet répulsif	Blackwell <i>et al.</i> , 2004
	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 50, 53, 45 %	González <i>et al.</i> , 2014
Nonanal <sup>a</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 54, 46, 82 %	González <i>et al.</i> , 2014
Octanal <sup>a</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 53, 55, 82 %	González <i>et al.</i> , 2014
Picaridine <sup>x</sup> (KBR3023)	Bayrepele	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 54, 37, 71 %	González <i>et al.</i> , 2014
Piment royal <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. imp</i>		Concentration minimale d'effet: 0,1%	Evans <i>et al.</i> , 1996
Romarin <sup>†</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 46,54, 70 %	González <i>et al.</i> , 2014
4-propylphenol <sup>o</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 57, 91, 91 %	González <i>et al.</i> , 2014
6-methyl-5-hepten2 one <sup>a</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 52, 61, 66 %	González <i>et al.</i> , 2014
Jasmin+	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 71, 78, 94 %	González <i>et al.</i> , 2014
Lavende+					
Romarin					
Acetate de géranyle+	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 72, 76, 88 %	González <i>et al.</i> , 2014
6-methyl-5-hepten2 one					
Decanal+ nonanal+ octanal	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 55, 73, 90 %	González <i>et al.</i> , 2014
Melisse+ citron+ citronelle+ eucalyptus citroné	s.a.	<i>C. obs</i>	0,01 ; 0,1 et 1 µg/µl	Répulsion : 66, 80,85 %	González <i>et al.</i> , 2014
<b>Méthode : non décrite</b>					
Cyhalothrine*	Sylotox 4	<i>C. imi</i>	4 % s.a.	Pas d'effet répulsif	Braverman <i>et al.</i> , 2004
	Sylotox20		24 % s.a.		

\*Pyréthroïde, <sup>o</sup>Organophosphoré, <sup>†</sup>Avermectine, <sup>†</sup>Dérivé de plantes, <sup>x</sup>Synthétique, <sup>a</sup>Aldéhyde, <sup>†</sup>Terpène, <sup>o</sup>Origine naturelle, <sup>o</sup>Organique, *C. son* : *C. sonorensis*, *C. bre* : *C. brevitarsis*, *C. imp* : *C. impuctatus*, *C. nub* : *C. nubeculosus*, *C. obs* : *C. obsoletus*, *C. imi* : *C. imicola*, s.a. : substance active, NA : donné absente, j.a.t. : jours après traitement, s : semaines

D'autres études (Tableau 1.12) ont été menées en exposant les *Culicoides*, sur le terrain, directement sur une partie du corps de l'animal traité. Des individus appartenant à l'espèce *C. brevitarsis* ont été exposés aux oreilles des bovins traités avec un antiparasite en sous-cutanée, l'ivermectine (Avermectine) à 200 µg/kg par injection. Les résultats obtenus ont montré une réduction du taux de gorgement de 80 % à 5 jours après le traitement (Standfast *et al.*, 1984). En forçant le contact de *C. sonorensis* sur la partie intérieure de la cuisse d'animaux traités avec deux formulations insecticides, le Ready-to-use sheep (perméthrine et butoxyde de piperonyl ou PBO) à 12 ml par ovin et la boucle Python (zeta-cyperméthrine et PBO), il a été observé un faible effet de la part de ces produits (Reeves *et al.*, 2010).



**Tableau 1.12** Efficacité répulsive de différentes formulations contre les *Culicoides* évaluée en les exposant directement aux animaux traités

Substance Active	Produit	Espèce	Dosage Zone exposée	Résultats	Auteurs
Perméthrine* + PBO	Ready-to-use sheep	<i>C. son</i>	Ovins : 12 ml Partie intérieure de la cuisse	Inhibition du repas > 90 % jusqu'à 5 s.a.t. < 80 % à 6 s.a.t.	Reeves <i>et al.</i> , 2010
Zeta-cyperméthrine* + PBO	Boucle PYthon	<i>C. son</i>	Ovins : 9,8 g s.a./ boucle Partie intérieure de la cuisse	Inhibition du repas > 90 % jusqu'à 3 s.a.t. < 75 % à 4 et 5 s.a.t.	Reeves <i>et al.</i> , 2010
Ivermectine <sup>†</sup>		<i>C. bre</i>	Bovin : 200 µg/kg Oreille	↓ taux de gorgement 80 % à 5 j.a.t	Standfast <i>et al.</i> , 1984

\*Pyrethroïde, †Avermectine, PBO : butoxyde de piperonyl, *C. son* : *C. sonorensis*, *C. bre* : *C. brevitarsis*, s.a. : substance active, j.a.t. : jours après traitement, s.a.t. : semaines heures après traitement.

ii) Effet répulsif d'un produit par un système de capture

En comparant le nombre de *Culicoides* capturés avec des pièges dont les filets moustiquaires ont été traités au moyen de différents produits et avec des pièges témoins (sans traitement), l'efficacité répulsive de ces produits a pu être évaluée (Tableau 1.13). L'utilisation de cette méthode a permis de confirmer que le DEET, sans doute le répulsif plus utilisé contre les insectes hématophages, est très efficace en repoussant les *Culicoides* (Page 2009). Seuls quelques produits ont aussi présenté d'excellentes performances comme l'AG1000 (*Melaleuca sp.*), l'Herbipet (extraits de plantes) (Braverman *et al.* 1997 et Braverman *et al.*, 1999), ou quelques acides gras organiques ayant un effet répulsif comme l'acide octanoïque ou le nonanoïque (Venter *et al.*, 2011). Les autres produits, moins performants, n'ont pas réussi à diminuer significativement le nombre d'individus collectés. Au contraire, le piège traité avec un répulsif efficace contre les moustiques, le Citriodiol (substance dérivée de plantes), a capturé environ 4 fois plus de *C. imicola* que le piège témoin pendant la première heure de capture, de 2 à 3 fois plus pendant la deuxième et troisième heure (Braverman *et al.*, 1999)

**Tableau 1.13** Efficacité répulsive de différents produits contre les *Culicoides* évaluée par un système de capture

Substance active	Produit	Espèce	Dosage	Résultats	Auteurs
alpha-cyano 3-phenoxyezyl*	Pyrethroid-T	<i>C. imi</i>	NA	Pyrethroid-T > DEET à 9 h.a.t	Braverman <i>et al.</i> , 1997 et 1999
Cyperméthrine*	s.a.	<i>C. imi</i>	NA	Pas d'effet	Page <i>et al.</i> 2009
	s.a.	<i>C. sp</i>	1 % s.a.	Pas d'effet	del Rio <i>et al.</i> , 2014

Lambda-cyhalothrin*	s.a.	<i>C. imi</i>	5 % s.a.	Effet faible à <1 h.a.t.	Braverman <i>et al.</i> , 2004
Perméthrine*	s.a.	<i>C. chi</i>	NA	Taux de gorgement traités 31 %	Griffioen <i>et al.</i> , 2011
		<i>C. obs</i>		Non traités 40 %	
	Stomoxin	<i>C. imi</i>	NA	Stomoxin < DEET à 1 h.a.t.	Braverman <i>et al.</i> , 1997 et 1999
Citriodiol <sup>+</sup>	Mosi-Guard	<i>C. imi</i>	40 % s.a.	Mosi-Guard (répulsif de moustique) attire <i>C. imicola</i>	Braverman <i>et al.</i> , 1999
Citronnelle <sup>+</sup>		<i>C. imi</i>	NA	Pas d'effet	Page <i>et al.</i> , 2009
Eucalytus citroné <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	10 et 25 % (w/w)	Effet significatif	González <i>et al.</i> , 2014
Arbre à thè <sup>+</sup>	AG1000	<i>C. imi</i>	0,004 g/m <sup>2</sup>	AG1000 = DEET à 3 h.a.t.	Braverman <i>et al.</i> , 1997 et 1999
			4,5 % s.a.	et AG1000 > DEET à 4 h.a.t.	
Origan <sup>+</sup>		<i>C. imi</i>	15 % s.a.	Origan < DEET à 2 h.a.t.	Braverman <i>et al.</i> , 1997 et 1999
Lavende <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	10 et 25 % (w/w)	Effet significatif à 10 % Pas d'effet à 25 %	González <i>et al.</i> , 2014
Extraits de plantes DEET <sup>x</sup>	Herbipet	<i>C. imi</i>	NA	Herbipet +/- DEET	Braverman <i>et al.</i> , 1997 et 1999
			NA	Herbipet < DEET à 1 h.a.t	
			10 et 25% (w/w)	Effet répulsif important	
Acides gras		<i>C. imi</i>	15% (w/w)	Effet significatif	Page <i>et al.</i> , 2009 González <i>et al.</i> , 2014
			10 et 25 % (w/w)	Effet significatif	
Acetate de géranyle <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	10 et 25 % (w/w)	Pas d'effet	Venter <i>et al.</i> , 2011
6-méthyl-5-hepten-2-one					González <i>et al.</i> , 2014
Decanal <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. obs</i>	10 et 25 % (w/w)	Effet significatif	González <i>et al.</i> , 2014
nonanal <sup>+</sup>					
octanal					

\*Pyréthroïde, <sup>+</sup>Dérivé de plantes, <sup>x</sup>Synthétique, s.a. : substance active, *C. imi* : *C. imicola*, *C. chi* : *C. chiopterus*, *C. obs* : *C. obsoletus*, NA : donné absente, h.a.t. : heures après traitement.

Les *Culicoides* ont aussi pu être collectés avec des pièges posés à proximité ou directement prélevés sur les animaux traités et en comparant avec les collectes autour d'animaux non traités (Tableau 1.14). Cette méthode de piégeage autour des animaux traités a permis de constater que le traitement avec certains produits comme la boucle Flectron (cyperméthrine) (Liebisch and Liebisch, 2008), le Tectonik (perméthrine) (de Raat *et al.*, 2008) et le Tri-Tec 14 (cyperméthrine, perméthrine et PBO) (Braverman *et al.* 1997 et Braverman *et al.*, 1999) diminuait le nombre d'individus à proximité des animaux. Le traitement simultané avec une boucle Auriplak (perméthrine), du pour-on Butox 7.5 (deltaméthrine) et une moustiquaire imprégnée Fence (deltaméthrine) placée autour de l'enclos des animaux, ont également réduit le nombre d'individus collectés par rapport au témoin (Bauer *et al.*, 2009). En capturant les *Culicoides* directement sur le corps d'animaux traités, il a été possible de déterminer que certains produits comme le Butox 7.5 (deltaméthrine) (Mullens *et al.*, 2010), le Coopafly (deltaméthrine), le Sumifly (fenvalerate), la Permaxin (perméthrine) (Melville *et al.*, 2004), et le Flyaway (perméthrine, PBO et DEET) (doherty 2004), inhibaient le gorgement des *Culicoides* (Tableau 1.16).

**Tableau 1.14** Efficacité répulsive de différentes formulations contre les *Culicoides* évaluée en les collectant à proximité d'animaux traités.

Substance active	Produit	Espèce	Animal traité et dosage	Résultats	Auteurs
Cyperméthrine*	s.a.	<i>C. sp</i>	Ovin : 0,5 g/l	Effet répulsif	Calvete <i>et al.</i> , 2010
	Boucle Flectron	<i>C. obs</i> <i>C. pul</i> <i>C. dew</i>	Bovin : 1 g s.a./boucle	Effet répulsif 14 j.a.t. avec 1 boucle et 21 j.a.t. avec 2 boucles	Liebisch <i>et al.</i> , 2008
Deltaméthrine*	Butox 7.5	<i>C. obs</i> <i>C. par</i>	Ovin: 10 ml étalés sur tout le corps 7,5 g s.a./l	Traités: pas de gorgement 0-4 j.a.t.	Mullens <i>et al.</i> , 2010
	Coopafly	<i>C. sp</i>	Bovin : 2 ml/100 kg 25 g s.a./l	Inhibition du gorgement 76 % à 60 h.a.t	Melville <i>et al.</i> , 2004
Fenvalérate*	s.a.	<i>C. bre</i>  <i>C. wad</i>	Bovin : 200 ml/animal à 1 % s.a.	0,7 gorgés /16,8 piégés vs. 17,5/172,4 (témoin)	Doherty <i>et al.</i> , 2004
				0,1 gorgés / 1,1 piégés vs. 17,5/172,4 (témoin)	
	Sumifly	<i>C. sp</i>	Bovin : 200 ml/animal	Inhibition du gorgement 22 % à 60 h.a.t	Melville <i>et al.</i> , 2004
Perméthrine*	s.a.	<i>C. chi</i> <i>C. obs</i>	Ovin	50 % ↓ individus collectés traité vs non traité	Griffioen <i>et al.</i> , 2011
	Permaxin	<i>C. sp</i>	Bovin : 10 ml/400 ml	Inhibition du gorgement 56 % à 60 h.a.t.	Melville <i>et al.</i> , 2004
	Tectonik	<i>C. obs</i>	Cheval : 20 ml (dos) 3,6 g/l s.a	82 % ↓ individus collectés à 2 j.a.t.	de Raat <i>et al.</i> , 2008
Perméthrine* + Deltaméthrine*	Auriplak	<i>C. obs</i>	Bovin	↓ individus collectés	Bauer <i>et al.</i> , 2009
	Butox 7.5	<i>C. pul</i>	boucle 1,2 g s.a.		
	Fence		Butox 7,5 30 ml Fence: 100 mg/m <sup>2</sup> of deltaméthrine		
Cyperméthrine* + pyréthrine* + PBO	Tri-Tec 14	<i>C. imi</i>	0,175 % cyper + 1,03 % pyr + 1,65% PBO	Effet répulsif Tri-Tec 14 > DEET (2h) et (4h)	Braverman <i>et al.</i> , 1997 et 1999
Perméthrine* + PBO + DEET <sup>x</sup>	Flyaway	<i>C. bre</i>	Bovin 20 ml-25 ml/animal	1.71 gorgés / 30.82 piégés vs. 17.48/172.4 (témoin)	Doherty <i>et al.</i> , 2004
		<i>C. wa</i>		0.16 gorgés / 1.87 piégés vs. 17.48/172.4 (témoin)	

\*Pyréthrianoïde, <sup>x</sup>Synthétique, s.a : substance active, *C. obs* : *C. obsoletus*, *C. pul* : *C. pulicaris*, *C. dew* : *C. dewulfi*, *C. par* : *C. parroti*, *C. bre* : *C. brevitarsis*, *C. wad* : *C. wadai*, *C. chi* : *C. chiopterus*, *C. imi* : *C. imicola*, j.a.t. : jours après traitement, h.a.t. : heures après traitement.

Quelques études se sont intéressées à l'efficacité de produits répulsifs en application topique sur l'homme vis-à-vis de certaines espèces de *Culicoides* connues pour leur anthropophilie (Tableau 1.15). Des produits ont été appliqués sur les bras ou les jambes de sujets volontaires, puis le nombre d'atterrissages de *Culicoides* a été enregistré. En comparant les résultats obtenus entre le bras ou la jambe traitée et le bras ou la jambe non traitée, il a été observé que le DEET était performant en réduisant les taux de piqûres de 97 % pendant 3 h contre les piqûres de *C. impuctatus*, *C. ornatus* Taylor (Greive *et al.*, 2010) et de 8-10 h contre celles de *C. immaculatus* Lee & Reye (Trigg, 1996). Les produits dérivés de plantes

comme le p-menthane-3,8 diol (PMD) (Trigg, 1996) et l'huile essentielle de *Melaleuca ericifolia* (Greive *et al.* 2010) ont montré des effets similaires à ceux observés avec du DEET ont apportant entre 80 et 95 % de réduction des taux de piqûres pendant 3 h après traitement. Le KBR 3023 (picaridine d'origine synthétique) a présenté un taux de protection de 86 % immédiatement après l'application du produit puis de 60 % 8 h après le traitement (Carpenter *et al.* 2005). Les résultats obtenus ont montré une efficacité protectrice variable selon le produit testé avec une protection plus de 90 % entre 3 h et 10 h suivant l'application, l'effet diminuant rapidement par la suite.

**Tableau 1.15** Efficacité répulsive de différentes formulations contre les *Culicoides* évaluée sur homme.

Substance Active	Produit	Espèce	Zones traitée et dosage	Résultats	Auteurs
DEET <sup>x</sup>	Autan	<i>C. imp</i>	Avant-bras 20 % s.a.	Protection à 8 h-10 h.a.t : 97 %	Trigg, 1996
	Off! Skintastic	<i>C. orn</i> <i>C. imm</i>	Jambe 3,6 g/ jambe	Effet répulsif 97 % à 3 h.a.t.	Greive <i>et al.</i> , 2010
<i>Melaleuca ericifolia</i> <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. orn</i>	Jambe	Effet répulsif 80-95 % à 3 h.a.t	Greive <i>et al.</i> , 2010
		<i>C. imm</i>	1,8 g s.a./ jambe		
Picaridine <sup>x</sup> KBR3023	BayRepel	<i>C. imp</i>	Bras 0,5 ml	Protection à 0h : 86 % et à 8h : 60 %	Carpenter <i>et al.</i> , 2005
PMD <sup>+</sup>	s.a.	<i>C. imp</i>	Avant-bras 50 % s.a.	Protection à 8 h: 98 %	Trigg, 1996

<sup>+</sup>Dérivés de plantes, <sup>x</sup>Synthétique, PMD : p-menthane-3, 8 diol, s.a : substance active, *C. orn* : *C. ornatus*, *C. imm* : *C. immaculatus*, *C. imp* : *C. impuctatus*, h.a.t : heures après traitement

Seules deux études, réalisées à petite échelle, se sont intéressé à évaluer l'impact de traitements insecticide sur l'incidence de la transmission du virus de la FCO (Tableau 1.16). Des bovins ont été traités avec des pulvérisations de 250 ml d'Atroban 11 % EC (0,2 % de perméthrine) par animal toutes les deux semaines et à la fin de l'étude, 59 animaux avaient séroconvertis sur les 106 traités (56 %) contre 56 sur les 117 non traités (48 %). Ces résultats n'ont pas montré de différence significative entre traités et témoins (Mullens *et al.*, 2001). Dans une autre étude, différents groupes de bovins ont reçu des traitements hebdomadaires distincts, du Coopafly en *pour-on* (25 g de deltaméthrine/l) à 2 ml/100 kg, du Bayticol en *pour-on* (75 g de fluméthrine/l) à 10 ml/animal, ou du Sumifly en pulvérisation (200 g de fenvalérate/l) à 200 ml/animal et un autre groupe une boucle auriculaire Spike (diazinon 20 % w/w). Les résultats obtenus ont montré que seul le traitement *pour-on* à la deltaméthrine diminue significativement le taux de séroconversion du virus de la FCO parmi les groupes de bovins testés, passant de 9 positifs sur 20 animaux témoins testés (45 % de séroconversion) à 3 positifs sur 20 animaux traités testés (15 % de séroconversion) (Melville *et al.*, 2004).

**Tableau 1.16** Efficacité des différentes formulations insecticides contre la transmission du virus de la FCO.

Substance active	Produit	Animal traité et dosage	Résultats	Auteurs
Perméthrine*	Atroban 11 % EC	Bovin: 250 ml/ animal 0,2 % s.a. toutes les 2 semaines	Séroconversion Traités : 59/106 (56 %) Témoins : 56/117 (48 %)	Mullens <i>et al.</i> , 2001
Deltaméthrine*	Coopafly	Bovin (hebdomadaire) 2 ml/100 kg, 25 g s.a./l	Séroconversion 3/20 (15 %)	Melville <i>et al.</i> , 2004
Fluméthrine *	Bayticol	10 ml/ animal, 10 mg s.a./l	7/19 (37 %)	
Fenvalérate*	Sumifly	200 ml/animal, 200 g/l	8/20 (40 %)	
Diazinon°	Boucle Spike	1 unité de 20 % w/w	6/20 (30 %) Témoins : 9/20 (45 %)	

\*Pyréthroïde, °Organophosphoré, s.a. : substance active

## **Chapitre 2 :**

### **Comment évaluer la sensibilité des *Culicoides* aux substances actives insecticides ?**





## Introduction au chapitre 2

Déterminer la sensibilité des vecteurs aux substances actives à partir de procédure standardisée est une étape indispensable afin de pouvoir établir le degré de sensibilité des populations sauvages, comparer ces niveaux de référence entre populations ou entre espèces et suivre dans le temps le maintien d'un niveau de sensibilité ou l'apparition de phénomènes de résistance.

Ces valeurs de références inexistantes chez les *Culicoides* compliquent la mise en œuvre de mesure de LAV. Ainsi, ce chapitre présente sous la forme de 4 articles scientifiques les travaux menés en laboratoire et sur le terrain sur différentes populations de *Culicoides* en Europe et en Afrique, afin de **déterminer la sensibilité des espèces de *Culicoides* d'importance vétérinaire aux substances actives des principaux insecticides.**

Le développement d'une méthodologie adaptée pour ces tests et la mise au point des gammes de concentrations pour les différentes substances actives ont d'abord été réalisés sur des individus *C. nubeculosus* issus d'une colonie d'élevage. Une fois la méthodologie validée (*Manuscrit #2*), un criblage de 6 substances actives a été réalisée sur deux populations sauvages de *C. obsoletus* et *C. imicola* collectées en France permettant d'établir pour la première fois des valeurs de référence de sensibilité pour les deux espèces principales d'intérêt vétérinaire en Europe (*Manuscrit #3*). Afin de confirmer sur d'autres populations à l'échelle européenne ces niveaux de sensibilité aux molécules les plus utilisées dans des formulations insecticides en santé vétérinaire, la méthodologie a été transférée à des laboratoires partenaires du projet EDENext (<http://www.edenext.eu/>) et du réseau MedReoNet (<http://medreonet.cirad.fr/>) (EID-Med, France ; CRESA et UIB, Espagne ; ISRA, Sénégal et ARC-OVI, Afrique du Sud). Ainsi, plusieurs populations sauvages de *C. obsoletus* et *C. imicola* issues de la zone de distribution de ces deux espèces ont été testées. Ces essais menés en collaboration avec les partenaires ont permis de tester plus de 30000 femelles *Culicoides* (*Manuscrit #4, 5 et 6*) et former les acteurs de recherche à une méthodologie standardisée.



**Figure 2.1** Tubes OMS d'exposition contenant les papiers imprégnés d'insecticide et placés en position verticale

Les résultats sont présentés à la suite de ce manuscrit sous la forme de cinq articles :

- **Venail R**, Mathieu B, Setier-Rio ML, Borba C, Alexandre M, Viudes G, Garros C, Allène X, Carpenter S, Baldet T and Balenghien T. 2011. Laboratory and field-based test of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. Journal of Medical Entomology. *Manuscrit #2* page 75.
- **Venail R**, Lhoir J, Rakotoarivony I, Allène X, Setier-Rio ML, Scheid B, Gardes L, Gosset A, Lancelot R, Gimonneau G, Garros C, Balenghien T, Carpenter S and Baldet T. Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in France. Soumis à PlosOne. *Manuscrit #3* page 83.
- del Río R, **Venail R**, Calvete C, Barceló C, Baldet T, Lucientes J and Miranda M., 2013. Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test. Parasitology. *Manuscrit #4* page 103.
- del Río R, Barceló C, **Venail R**, Lucientes J and Miranda M. Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) to cypermethrin in laboratory conditions. Soumis à Pest Science Management. *Manuscrit #5* page 109.
- **Venail R**, Fall M, del Río R, Talavera S, Labuschagne K, Balenghien T, Garros C, Miranda M, Pagès N, Venter G, Carpenter S and Baldet T. Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): a multicentric study using a modified WHO standard assay. Soumis à Parasites & Vectors. *Manuscrit #6* page 119.

## 2.1 Sensibilité des *Culicoides* aux substances actives insecticides en France

---

Le *Manuscrit #2* (Journal of Medical Entomology 2011) présente les travaux préliminaires sur la sensibilité des *Culicoides* aux substances actives menés en 2010-2011. Ce manuscrit étant en parfaite cohérence avec les objectifs de ce travail de thèse, est considéré comme un article à part entière de ce mémoire.



## Laboratory and Field-Based Tests of Deltamethrin Insecticides Against Adult *Culicoides* Biting Midges

R. VENAIL,<sup>1,2</sup> B. MATHIEU,<sup>1</sup> M.-L. SETIER-RIO,<sup>1</sup> C. BORBA,<sup>1</sup> M. ALEXANDRE,<sup>3</sup> G. VIUDES,<sup>4</sup> C. GARROS,<sup>5</sup> X. ALLENE,<sup>1,5</sup> S. CARPENTER,<sup>6</sup> T. BALDET,<sup>5</sup> AND T. BALENGHIEN<sup>5</sup>

J. Med. Entomol. 48(2): 351–357 (2011); DOI: 10.1603/MEI10178

**ABSTRACT** Bluetongue virus (BTV) is an economically important arbovirus of ruminants transmitted by *Culicoides* biting midges. Vector control using residual spraying or application to livestock is recommended by many authorities to reduce BTV transmission; however, the impact of these measures in terms of both inflicting mortality on *Culicoides* and subsequently upon BTV transmission is unclear. This study consisted of a standardized World Health Organization laboratory assay to determine the susceptibility of European *Culicoides* species to deltamethrin and a field trial based upon allowing individuals of a laboratory strain of *Culicoides nubeculosus* Meigen to feed upon sheep treated with Butox 7.5 pour-on (a deltamethrin-based topical formulation). Susceptibility in the laboratory trial was higher in colony *C. nubeculosus* (24-h LC<sub>90</sub> = 0.00106%), than in field populations of *Culicoides obsoletus* Meigen (24-h LC<sub>90</sub> = 0.00203%) or *Culicoides imicola* Kieffer (24-h LC<sub>90</sub> = 0.00773%). In the field, the pour-on formulation was tested with a total of 816 *C. nubeculosus* specimens fed upon on the thigh of treated sheep. The study revealed a maximum mortality rate of 49% at 4 d postapplication, and duration of lethal effect was predicted to be as short as 10 d, despite testing being carried out with a highly susceptible strain. The reasons for this low efficacy are discussed with reference both to the potential for lack of spread of the active ingredient on the host and feeding patterns of the major potential vector species on the sheep host. Practical implications for vector control strategies during BTV incursions are also detailed.

**KEY WORDS** *Culicoides*, bluetongue, deltamethrin, Butox 7.5 pour-on, vector control

*Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are responsible for the transmission of several livestock arboviruses of international importance, including bluetongue virus (BTV) and African horse sickness virus. In recent years, BTV has inflicted huge economic losses upon Europe (Callistri et al. 2004, Velthuis et al. 2010) because of clinical disease in infected ruminants and animal movement restrictions imposed during attempts to limit the spread and impact of outbreaks. By far the most spectacular example has been the recent epizootic caused by a BTV serotype 8 strain in Northern Europe. This unprecedented event led to transmission occurring across a large number of countries that had no prior history of BTV

incursions and demonstrated the previously held theory that northern European *Culicoides* were capable of transmitting BTV (see Carpenter et al. 2009 for review). The primary vectors involved in transmission in this region are thought to belong to the subgenus *Ataritia*, although the vector status of these species remains unclear.

During the period before vaccination (which has recently restricted the spread of BTV-8 and subsequently eradicated it from several countries; Zientara et al. 2010), the only method to limit virus transmission lay in restricting animal movements (economically damaging in itself) and in employing vector control. As a result of the scant data at that time concerning larval breeding sites and resting and endophagic behavior of adult BTV-8 vectors, little information was available on which to base a rational strategy for controlling midges (Carpenter et al. 2008). In this context, the use of insecticides in stables, in trucks for animal transportation, or directly on animals was suggested (EFSA 2008), and was employed on a compulsory basis by some countries (e.g., France). The susceptibility of *Culicoides* populations to pyrethroids, the primary class of insecticides authorized active for residual spraying and products applied directly to livestock (EFSA 2008), has rarely been assessed in a standardized fashion (with Braverman et al. 1995, 2004

<sup>1</sup>Entente Interdépartementale pour la Démoustication dulittoral méditerranéenne (EID Méditerranée), 165 avenue Paul-Rimbaud, 34184 Montpellier Cedex 4, France.

<sup>2</sup>Corresponding author, e-mail: rvenail@eid-med.org.

<sup>3</sup>Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire Languedoc-Roussillon, 34875 Lattes, France.

<sup>4</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche Élevage des ruminants en régions chaudes domaine de Fréjorgues, 34130 Mauguio, France.

<sup>5</sup>Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Unité Mixte de Recherche Contrôle des maladies, F-34398 Montpellier, France.

<sup>6</sup>Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Surrey GU24 0BN, United Kingdom.



being notable exceptions). The most common way currently used to protect cattle and sheep against *Culicoides* is the application of pour-on formulations along the backline, but the spread of these products is known to be limited on the host (Stendel et al. 1992), and active ingredient may not reach the commonly used biting sites on belly, legs, and face (Nielsen et al. 1988). Whereas studies have examined the impact of exposure of *Culicoides* to deltamethrin-treated hair, sampled from treated ruminants at known times post-application (e.g., Mehlhorn et al. 2008; Schmahl et al. 2008, 2009; Papadopoulos et al. 2009), these have tended to involve a passive laboratory exposure to the agent, rather than one caused by a true feeding response. Perhaps even more worrisome, products that have been shown to reduce *Culicoides* biting activity may still fail to protect animals from BTV infection (Mullens et al. 2001, Melville et al. 2004).

Given the clear lack of information about *Culicoides* species susceptibility to insecticides, this study aimed to do the following: 1) provide a standardized test of the susceptibility of *Culicoides* to deltamethrin (the most used pyrethroid) using a World Health Organization (WHO) test kit against three different species of interest, *Culicoides nubeculosus* Meigen (IAH reference strain), *Culicoides obsoletus sensu stricto* Meigen, and *Culicoides imicola* Kieffer field-collected populations (France); and 2) assess the efficiency of Butox 7.5 pour-on (a commonly used deltamethrin-based topical formulation) against the reference strain of *C. nubeculosus* via direct feeding on sheep.

#### Materials and Methods

**Intrinsic Susceptibility of *Culicoides* to Deltamethrin (Phase I).** Susceptibility to deltamethrin exposure was assessed in three different species of veterinary importance, as follows: *C. nubeculosus*, *C. obsoletus s.s.*, and *C. imicola*, using a standardized WHO assay test. *C. nubeculosus* specimens were provided from the colony maintained by the Institute of Animal Health (Pirbright, United Kingdom). *C. obsoletus s.s.* and *C. imicola* specimens were collected from the field in Saint-Martin-de-Londres (Mediterranean region, France, April 2008) and in Figari (Corsica, France, August 2008) using an ultraviolet light trap (Agricultural Research Council - Onderstepoort Veterinary Institute [ARC-OVI] model, South Africa) and replacing the collection jar with a fine mesh cage. To prevent desiccation, cages were covered with wet papers and an outer layer of aluminum foil and retrieved at dawn.

As sensitivity to insecticides can be age specific (Chareonviriyaphap et al. 2006), 2- to 3-d-old nulliparous females of colony *C. nubeculosus* and field-collected, nulliparous individuals of *C. obsoletus* and *C. imicola* were used with parity determined using abdominal pigmentation (Dyce 1969). For each species, trials were conducted using a standardized assay for assessing insecticide resistance (WHO 1981). For *C. nubeculosus*, in each replicate,  $\approx 15$  nulliparous *Culicoides* were exposed in the essay system to eight del-

tamethrin-impregnated papers (0.0035, 0.0025, 0.0015, 0.001, 0.00075, 0.0005, and 0.0003%) and one control paper for 1 h using WHO test kit tubes (WHO/VBC/81.805). Test papers (Whatman n°1 filter paper, 90 g/m<sup>2</sup>, 12 × 15 cm) were impregnated in a WHO collaborative center (Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles/Institut de recherche pour le développement [LIN]/(IRD)], France) using an acetone-silicon mix as solvent (2 ml per paper, 67% acetone, and 33% silicone). Control papers were impregnated with 2 ml of acetone-silicone mix only (WHO 1981). After exposure, live midges were transferred using an aspirator to observation cages. The record of dead midges gave an assessment of the 1-h mortality, evaluating immediate effects. Then dead and live midges were counted at 24 h after exposure to assess the delayed mortality. For field-collected strains,  $\approx 100$  unsorted individuals were used in each tube to be certain of obtaining at least 15 nulliparous females of the target species. As a result of the difficulty in manipulating field-collected *Culicoides*, only four concentrations were tested (0.005, 0.001, 0.0005, and 0.0001%), and mortality was recorded solely at 24 h after exposure, even if midges were transferred to observation cages after 1-h exposure. During the 24-h observation period, tubes were kept horizontally in an isolated room (24°C) with a 10% sugar solution provided on cotton wool pads.

After exposure during the insecticide trials, field-collected individuals were morphologically identified to species for *C. imicola* or to complex for specimens of the *Obsoletus* complex (Delécolle 1985, Delécolle and La Rocque 2002), with specimens of the *Obsoletus* complex further identified to species level using a diagnostic multiplex polymerase chain reaction (modified from Nolan et al. 2007). Thus, specimens from the *Obsoletus* complex were initially dissected under a binocular microscope using sterile forceps, and the head and thorax were individually separated into 1.5-ml Eppendorf tubes. Head and thorax were then ground in 100  $\mu$ l of 5% chelex solution (Biorad, Marne-La-Coquette, France), and the tubes were maintained at 56°C for 1 h, followed by 30-min incubation at 95°C. Tubes were then centrifuged at 13,000 × g for 3 min and then held at -20°C until amplification. Amplifications were performed in a 25  $\mu$ l reaction volume following the procedure of Nolan et al. (2007) using only the reverse primers for *C. obsoletus s.s.* and *Culicoides scoticus*. Products were visualized after electrophoresis on an ethidium bromide-stained 2% agarose gel. Two positive controls, one *C. obsoletus s.s.* and one *C. scoticus* females, were identified by an expert and confirmed with different molecular tools (Mathieu et al. 2007, Nolan et al. 2007).

As recommended by the WHO, only those replicates in which control mortality was <20% were considered during analyses, and if control mortality was >5%, mortality data were corrected using Abbott's method, as follows: corrected mortality =  $100 \times (\text{observed mortality} - \text{control mortality}) / (100 - \text{control mortality})$  (WHO 1981). Mortality data were then analyzed by probit regression using CalcuSyn version

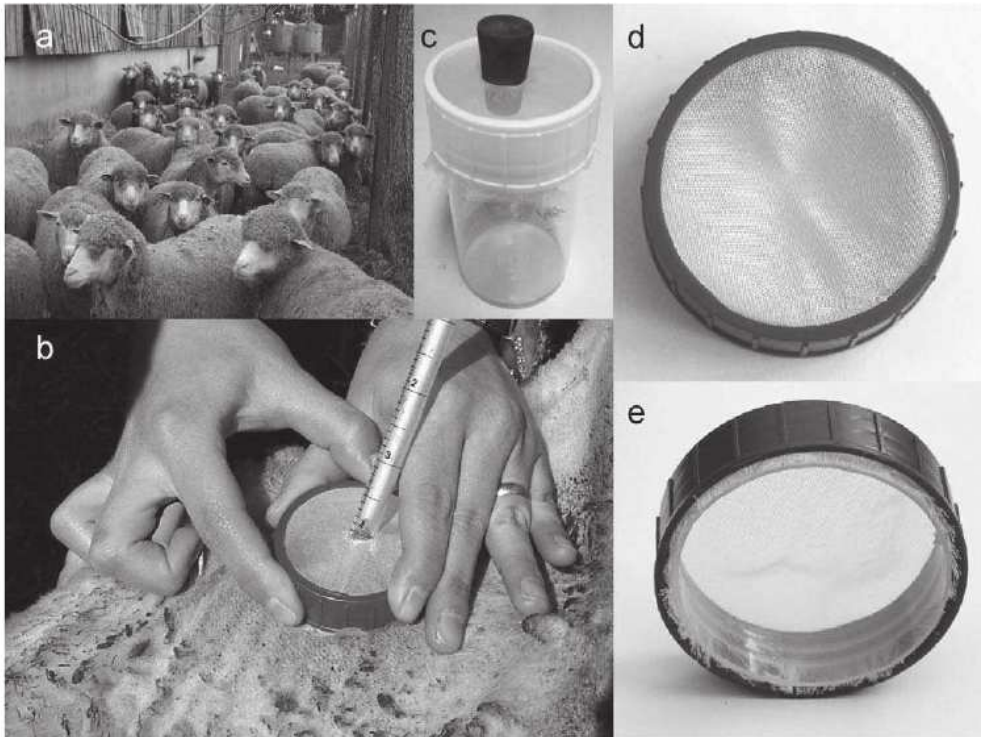


Fig. 1. (a) Arles Merino sheep; (b) contact between biting midges and the thigh of the sheep; (c) observation cages; (d) exposure cage top view; and (e) exposure cage bottom view (mesh only on the top of the lid).

2.1 (Biosoft Copyright 1997–2010) to obtain a  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  value for each population.

**Efficiency of a Topical Formulation of Deltamethrin: Butox 7.5 Pour-On.** Fifteen Arles Merino sheep (Fig. 1a) of  $\approx 25$  mo old and 40 kg weight were separated into five batches of three animals. All animals had access to identical food during trials, were checked for parasitic infections by a veterinary worker before the experiment, and were sheared 15 d before the trial. In four batches of three treated animals, 10 ml of a deltamethrin pour-on formulation (Butox 7.5; 0.75 g of deltamethrin/100 ml) was applied along the backline of 12 individuals from the head to the tail, as recommended by the manufacturer. Insecticide application was staggered between batches of animals to allow different times posttreatment to be assessed on each experimental day. One batch remained entirely untreated as a negative control. During the study, sheep were kept inside the sheepfold and were not exposed to rainfall (which can wash away insecticide) or to direct sunlight (avoiding photo-degradation of insecticide). Each batch was restricted to a dedicated pen so that contact with other groups was not possible. The impact of treatment was assessed at 1, 4, 6, and 13 d posttreatment by allowing 2- to 3-d-old nulliparous unfed females of *C. nubeculosus* to feed on the thighs of treated sheep. An exposure cage (Fig. 1, d and e) was placed on the sheep thigh, and 10 nulliparous females were transferred with a mouth aspirator into this cage, allowing direct contact between *Culicoides* and the sheep skin (Fig. 1b). During this exposure

period, midges were able to feed, and the number of engorged females was recorded immediately posttrial. Three batches of *C. nubeculosus* were exposed to each sheep and, after an exposure period of 3 min, midges were transferred to observation cages using an aspirator (Fig. 1c). A cotton wool soaked with 10% sucrose solution was placed on top of the cages, which were then placed in an insecticide-free environment under regulated conditions ( $\approx 21^\circ\text{C}$ ). Finally, mortalities were recorded 1 and 24 h after exposure. If control mortality was  $>5\%$ , mortality data were corrected using the Abbott's method described above. After correction, mortality data were modeled using a generalized linear model with a  $\beta$ -binomial distribution to account for observed overdispersion of data (Bouyer et al. 2007). Then upper and lower confidence intervals of prediction were computed for  $\alpha = 0.05$ . Effects of mortality were considered statistically different from 0 as long as the lower value of the confidence interval was  $>0$ . The R software (version 2.9.1, R foundation for statistical computing) was used for statistical computing and graphs, and the package "aod" for R (Lesnoff and Lancelot 2006) was used to fit  $\beta$ -binomial models.

## Results

**Intrinsic Susceptibility of *Culicoides* to Deltamethrin (Phase I).** The susceptibility of *Culicoides* to deltamethrin was assessed using 348 nulliparous *C. nubeculosus* in three replicates, 176 nulliparous *C. ob-*



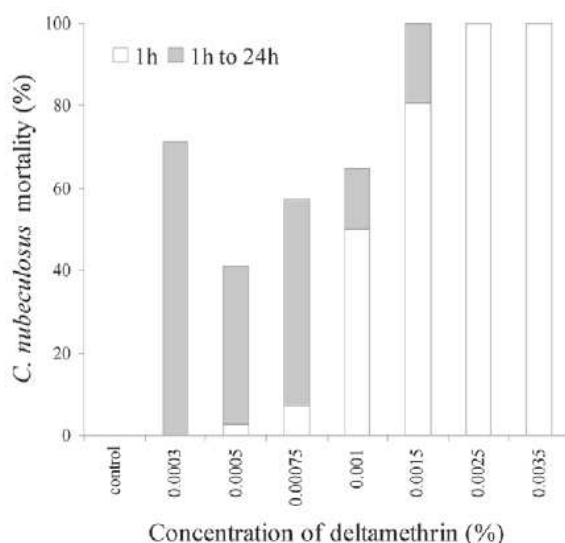
**Table 1.** Susceptibility of field populations of *Culicoides imicola* (Corsica, France) and *Culicoides obsoletus s.s.* (Mediterranean region, France) and of a laboratory strain of *Culicoides nubeculosus* (IAH colony) to deltamethrin: delayed mortality 24 h after 1-h exposure to different concentrations

Species	Origin	No. tests (n)	LC <sub>50</sub> ± SD (95% CI)	LC <sub>90</sub> ± SD (95% CI)
<i>Culicoides nubeculosus</i>	IAH colony (U.K.)	3 (348)	0.00039 ± 0.00007 (0.00022; 0.00057)	0.00106 ± 0.00009 (0.00085; 0.00127)
<i>Culicoides obsoletus s.s.</i>	Mediterranean region (France)	1 (176)	0.00077 (0.00046; 0.00128)	0.00203 (0.00107; 0.00387)
<i>Culicoides imicola</i>	Corsica (France)	3 (442)	0.00183 ± 0.00194 (0.00000; 0.00665)	0.00773 ± 0.00905 (0.00000; 0.03021)

n, number of individuals; LC, lethal concentration; CI, confidence interval; SD, standard deviance.

*soletus s.s.* in one replicate, and 442 *C. imicola* in three replicates. Among the 182 individuals of the *Obsoletus* complex, 176 were molecularly identified as *C. obsoletus s.s.*, five as *C. scoticus*, and one specimen did not give any polymerase chain reaction amplification and was not able to be identified; hence, the analysis was only performed with the 176 *C. obsoletus s.s.* At 24 h postexposure, the laboratory strain of *C. nubeculosus* was more susceptible to deltamethrin (LC<sub>50</sub> = 0.00039% = 0.14 mg/m<sup>2</sup>, and LC<sub>90</sub> = 0.00106% = 0.39 mg/m<sup>2</sup>) than field populations of *C. imicola* (LC<sub>50</sub> = 0.00183% = 0.67 mg/m<sup>2</sup>, and LC<sub>90</sub> = 0.00773% = 2.83 mg/m<sup>2</sup>) and *C. obsoletus s.s.* (LC<sub>50</sub> = 0.00077% = 0.28 mg/m<sup>2</sup>, and LC<sub>90</sub> = 0.00203% = 0.74 mg/m<sup>2</sup>) (Table 1). Differences were marked between the laboratory strain of *C. nubeculosus* and field populations, but not between *C. imicola* and *C. obsoletus s.s.*

Complete mortality was observed at 24 h postexposure for *C. nubeculosus* at deltamethrin concentrations from 0.0010 to 0.0035% (from 0.37 mg/m<sup>2</sup> to 1.28 mg/m<sup>2</sup>) (Fig. 2). Mortality at the end of the 1-h exposure was observed in *C. nubeculosus* for concentrations >0.0005% (0.18 mg/m<sup>2</sup>), and 100% lethal effect at the end of the 1-h exposure period was observed at concentrations >0.0025% (0.92 mg/m<sup>2</sup>).

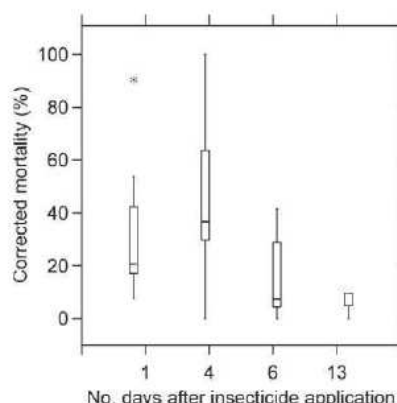


**Fig. 2.** Mortality of *C. nubeculosus* (mean ± SD, three replicates, n = 348) at the end of 1-h exposure to deltamethrin concentrations (%) and after 24 h postexposure.

**Efficiency of a Topical Formulation of Deltamethrin: Butox 7.5 Pour-On.** In 54 exposures, 816 nulloparous *C. nubeculosus* were exposed to the thighs of untreated and treated sheep. The maximum corrected mortality in treated sheep (45%) was observed on day 4 postexposure (Fig. 3), although mortality rates were highly variable throughout the trial. On day 4 postexposure, the engorgement rate was similar or lower for the treated compared with the untreated sheep; however, this effect was dependent upon the batch of animals considered (e.g., 41 versus 40% for one batch [ $P = 0.99$ ,  $\chi^2$  test], and 11 versus 28% for another batch [ $P < 0.001$ ,  $\chi^2$  test]). As the maximum mortality was observed on day 4, data from day 1 were not used for regression, which was used to model the mortality decrease and to estimate the insecticide persistence. The persistence of the lethal effect for this pour-on formulation is estimated to be shorter than 10 d (when the lower value of the predicted confidence interval reached 0).

**Discussion**

All *Culicoides* populations tested were highly susceptible to deltamethrin when exposed in a standardized WHO laboratory assay; however, field trials to assess a formulation based upon this active ingredient led to only limited increases in mortality rates after feeding on treated hosts. Of the species investigated,



**Fig. 3.** Boxplot of the 24 h postexposure corrected mortality of *C. nubeculosus* (54 contacts, n = 816) after 1, 4, 6, and 13 d after the application of deltamethrin pour-on formulation (Butox 7.5 pour-on).



the most susceptible was *C. nubeculosus*, whereas field populations of *C. imicola* and *C. obsoletus s.s.* exhibited a higher tolerance (in part because of the limited testing carried out upon the latter). This could be because of a variety of factors, including the inbred colony origin, lack of prior exposure to insecticides, and significantly greater size of *C. nubeculosus*. The use of this assay, however, provides a baseline upon which to base further studies of both efficacy of active ingredients for use against *Culicoides* and the potential development of resistance. The LC<sub>90</sub> values produced for *C. imicola* during this study were substantially lower than those produced previously using the same species and standardized assay in Israel with cyhalothrin (0.46%) and λ-cyhalothrin (0.0564%) (Braverman et al. 1995, 2004) (Table 2), indicating deltamethrin's superiority as an active ingredient for use against *Culicoides*, for example.

In the field trials, Butox 7.5 pour-on was selected for use, as it was widely used during the BTV-8 epizootic in Europe, and particularly in Northern France in part because of its ease of application. Application according to the manufacturer's recommendations should have theoretically resulted in a concentration of 71 mg/m<sup>2</sup> active ingredient if spread evenly over the individual [estimation of the skin surface of a 42-kg sheep from Fischer et al. (1999)]. Although this theoretical concentration is ≈180, 25, and 100 times greater than the estimated LC<sub>90</sub> for the laboratory strain of *C. nubeculosus*, and the field strains of *C. imicola* and *C. obsoletus s.s.*, respectively, only limited and short-term effects on mortality were observed in all species and a variable reduction in engorgement noted only in *C. nubeculosus* placed on the thigh of treated sheep. In other studies carried out in the European Union, high mortalities were observed by exposing field-collected *Culicoides* sp. to hair clipped from sheep and cattle on which Butox 7.5 pour-on was applied in Germany (Mehlhorn et al. 2008; Schmahl et al. 2008, 2009). Additionally, high and persistent mortality of *C. nubeculosus* exposed to belly hair was observed when α-cypermethrin was applied as a pour-on to sheep at the concentration of 600 mg/m<sup>2</sup> (almost 100% mortality after 3 exposure min up to 28 d and 50% at 42 d) and on cattle at 64 mg/m<sup>2</sup> (almost 100% up to 21 d) (Papadopoulos et al. 2009). The differences between these studies and the current study could be the result of a number of factors, including the use of a different exposure method (mixing adult *Culicoides* with hair taken from hosts in bags, in the majority of cases), and, additionally, the breeds selected for trials are in some cases not listed and the areas of the body sampled also vary significantly.

Given the application along the backline in the current study, it is unlikely that the active ingredient diffused entirely to the thigh of the sheep when applied in this current formulation, despite using recently shorn individuals. This effect has been demonstrated for a flumethrin-based product used on cattle that was found to vary from 0.2 to 126 mg/m<sup>2</sup> at day 1 and from 0.1 to 8 mg/m<sup>2</sup> at day 10 after pour-on application, depending on distance from the site of

Table 2. Susceptibility of different populations of *Culicoides* midges to pyrethroid insecticides in laboratory trials

Species	Method	LC <sub>90</sub> of active ingredient (95% CI)				
		Permethrin	Resmethrin	Cyhalothrin	λ-Cyhalothrin	Deltamethrin
<i>Culicoides mississippiensis</i>	Wind tunnel	0.00487% (0.00310; 0.00983) <sup>a</sup> 0.0025% (0.0021; 0.0030) <sup>b</sup> 0.027% (0.017; 0.035) <sup>c</sup>	0.01134% (0.00832; 0.01781) <sup>a</sup> 0.0135% (0.0090; 0.0209) <sup>b</sup> 0.025% (0.020; 0.034) <sup>c</sup>	0.03027% (0.01156; 0.03688) <sup>a</sup> 0.0012% (0.0096; 0.0131) <sup>b</sup>	0.46% (1.261; 1.404) <sup>d</sup>	0.00773% (0.00000; 0.03021) <sup>e</sup> 0.00203% (0.00107; 0.00387) <sup>f</sup> 0.00106% (0.00085; 0.00127) <sup>f</sup>
<i>Culicoides sonorensis</i>	WHO tube					
<i>Culicoides imicola</i>						
<i>Culicoides obsoletus s.s.</i>						
<i>Culicoides nubeculosus</i>						

Midges were exposed in a wind tunnel to solutions of insecticide in acetone, sprayed using an atomizer (wind tunnel method) or exposed to an impregnated filter paper (WHO tube method).

<sup>a</sup> Kline et al. (1981).

<sup>b</sup> Floore (1985).

<sup>c</sup> Holbrook (1986).

<sup>d</sup> Braverman et al. (1995).

<sup>e</sup> Braverman et al. (2004).

<sup>f</sup> The present study.

application (Stendel et al. 1992). This effect has also been documented for the United States BTV vector, *Culicoides sonorensis* Wirth and Jones, feeding on a membrane system through hair of both goats (Mullens 1993) and calves (Mullens et al. 2000), which had been treated with permethrin. In this study, mortality effects were recorded across several body regions, and it was notable that these were greatest at the point of application. The poor diffusion of active ingredient when applied as pour-on on sheep was also suggested by Carpenter et al. (2008) to explain the absence of toxicity to *C. nubeculosus* of belly and leg hair from sheep treated with 1.25% cypermethrin (at 450 mg/m<sup>2</sup>) or 1% deltamethrin (at 60 mg/m<sup>2</sup>) pour-on in the United Kingdom.

A recent study by Mullens et al. (2010) demonstrated that application of 10 ml of 7.5% deltamethrin (Butox 7.5) to shorn sheep eliminated engorgement by *Culicoides*. However, these authors applied the insecticide to the entire animal body rather than as a pour-on applied to the backline. Hence, whereas dipping of sheep in insecticidal products is currently in decline in most European countries because of user safety concerns and the risk of groundwater contamination, the use of spray races that reduce runoff may prove to be more effective in treating large flocks. It would be desirable, however, that this effect is quantified by chemical analyses of insecticide residues on host hair, which would allow a better understanding of spread of active ingredient and *Culicoides* mortality in the field.

Although it is likely that ruminants with hair that allows more rapid and active dispersion of product formulations will inflict higher mortality rates on feeding *Culicoides*, it is still unclear how and whether this ultimately translates to reduction in BTV transmission. To date, small-scale studies of protection provided in areas of endemic BTV transmission have produced equivocal results. In Australia, weekly application of deltamethrin pour-on on cattle (48 mg/m<sup>2</sup>) reduced incidence of BTV transmission, whereas flumethrin (216 mg/m<sup>2</sup>) and fenvalerate (59 mg/m<sup>2</sup>) pour-on applications had no discernible effect. Neither of these trials, however, eliminated BTV transmission despite the use of relatively high concentration of insecticide (Melville et al. 2004). Similarly, Mullens et al. (2001) found that applying 0.2% wt:vol permethrin to the bellies of a herd of 200 cattle had no significant effect on BTV transmission. In the case of both these studies, it is unclear whether the absence of any effect reflected the poor performance of the insecticide and/or whether the intervention itself was applied on too small a scale to have any significant impact on the local midge population in term of reduction of density and longevity. Larger scale studies, using a standardized approach across several countries and examining different primary vector species, would enable pour-on products to be both compared and optimized in formulation and application as a primary tool in control of arboviral outbreaks during the period before implementing vaccination campaigns.

### Acknowledgments

We thank the *Direction générale de l'alimentation* from the French Agricultural Ministry, which partially funded this study; Stéphane Duchon from LIN/IRD for his help in treating the OMS paper; Laëtitia Gardès from Cirad and Sandie Bellec from EID-Med for technical help; Renaud Lancelot from Cirad for the statistical analyses; Eric Denison and James Barber from Institute of Animal Health for their valuable help; and Glenn Bellis from the Northern Australia Quarantine Strategy and Lorna Melville from the OIC Berri-mah Veterinary Laboratories for their information.

### References Cited

- Bouyer, J., F. Stachurski, I. Kaboré, B. Bauer, and R. Lancelot. 2007. Tsetse control in cattle from pyrethroid footbaths. *Prev. Vet. Med.* 78: 223–238.
- Braverman, Y., A. Wilamowsky, and A. Chizov-Ginzburg. 1995. Susceptibility of *Culicoides imicola* to cyhalothrin. *Med. Vet. Entomol.* 9: 443–444.
- Braverman, Y., A. Chizov-Ginzburg, H. Pener, and A. Wilamowsky. 2004. Susceptibility and repellency of *Culicoides imicola* and *Culex pipiens* to lambda-cyhalothrin. *Vet. Ital.* 40: 336–339.
- Callistri, P., A. Giovannini, A. Conte, D. Nannini, U. Santucci, C. Patta, S. Rolesu, and V. Caporale. 2004. Bluetongue in Italy: Part I. Proceedings Third International Symposium, Taormina, 26–29 October 2003. *Vet. Ital.* 40: 243–251.
- Carpenter, S., P. Mellor, and J. Torr. 2008. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the UK and northwestern Palaearctic. *Med. Vet. Entomol.* 22: 175–187.
- Carpenter, S., A. Wilson, and P. S. Mellor. 2009. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol.* 17: 172–178.
- Chareonviriyaphap, T., M. Kongmee, M. Bangs, S. Sathantiriphot, V. Meunworn, A. Parbaripai, W. Suwonkerd, and P. Akkratanakul. 2006. Influence of nutritional and physiological status on behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to deltamethrin and cypermethrin. *J. Vector Ecol.* 31: 89–101.
- 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. Thesis, UER Sciences, Vie et Terre, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.
- Delécolle, J. C., and S. La Rocque. 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). *Bull. Soc. Entomol. Fr.* 107: 371–379.
- Dyce, A. 1969. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Aust. J. Entomol.* 8: 11–15.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2008. Scientific opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission (DG SANCO) on Bluetongue. *EFSA J.* 735: 1–70.
- Fischer, S. R., M. Burnet, D. L. Traber, D. S. Prough, and G. C. Kramer. 1999. Plasma volume expansion with solutions of hemoglobin, albumin, and Ringer lactate in sheep. *Am. J. Physiol.* 276: 2194–2203.
- Floore, T. 1985. Laboratory wind tunnel tests of nine insecticides against adult *Culicoides* species. *Fla. Entomol.* 68: 678–682.

- Holbrook, F. R. 1986. Wind tunnel evaluations of insecticides applied to colonized *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Fla. Anti-Mosq. Assoc.* 57: 1-3.
- Kline, D., D. Haile, and K. Baldwin. 1981. Wind tunnel tests with seven insecticides against adult *Culicoides mississippiensis* Hoffman. *Mosq. News* 41: 745-747.
- Lesnoff, M., and R. Lancelot. 2006. AOD: analysis of overdispersed data: R package version 1.1-10. (<http://cran.r-project.org/>).
- Mathieu, B., A. Perrin, T. Baldet, J. C. Delecolle, E. Albina, and C. Cetre-Sossah. 2007. Molecular identification of Western European species of *Obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J. Med. Entomol.* 44: 1019-1025.
- Mehlhorn, H., G. Schmahl, J. D'Haese, and B. Schumacher. 2008. Butox® 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitol. Res.* 102: 515-518.
- Melville, L. F., N. T. Hunt, G. Bellis, and D. Pinch. 2004. An assessment of insecticides to minimize the transmission of arbovirus in cattle. *Arbovirus Res. Aust.* 8: 249-255.
- Mullens, B. A. 1993. In vitro assay for permethrin persistence and interference with bloodfeeding of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) on animals. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9: 256-259.
- Mullens, B. A., R. K. Velten, A. C. Gerry, Y. Braverman, and R. G. Endris. 2000. Feeding and survival of *Culicoides sonorensis* on cattle treated with permethrin or pirimiphos-methyl. *Med. Vet. Entomol.* 14: 313-320.
- Mullens, B. A., A. C. Gerry, and R. K. Velten. 2001. Failure of a permethrin treatment regime to protect cattle against bluetongue virus. *J. Med. Entomol.* 38: 760-762.
- Mullens, B. A., A. C. Gerry, V. Sarto, I. Monteys, M. Pinna, and A. Gonzalez. 2010. Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. *J. Med. Entomol.* 47: 106-110.
- Nielsen, B. O., S. A. Nielsen, and J. B. Jespersen. 1988. The fauna of Diptera visiting tethered heifers in Danish pastures. *Entomol. Meddr.* 56: 79-88.
- Nolan, D. V., S. Carpenter, J. Barber, P. S. Mellor, J. F. Dallas, A. J. Mordue Luntz, and S. B. Piertney. 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.
- Papadopoulos, E., D. Bartram, S. Carpenter, P. Mellor, and R. Wall. 2009. Efficacy of alphacypermethrin applied to cattle and sheep against the biting midge *Culicoides nubeculosus*. *Vet. Parasitol.* 163: 110-114.
- Schmahl, G., S. Klimpel, V. Walldorf, S. Al-Quraishy, B. Schumacher, A. Jatzlau, and H. Mehlhorn. 2008. Pilot study on deltamethrin treatment (Butox® 7.5, Versatrine®) of cattle and sheep against midges (*Culicoides* species, Ceratopogonidae). *Parasitol. Res.* 104: 809-813.
- Schmahl, G., H. Mehlhorn, F. Abdel-Ghaffar, K. Khaled Al-Rasheid, B. Schumacher, A. Jatzlau, and H. Pohle. 2009. Does rain reduce the efficacy of Butox 7.5 pour on (deltamethrin) against biting midges (*Culicoides* specimens)? *Parasitol. Res.* 105: 1763-1765.
- Stendel, W., H. D. Hamel, H. U. Sieveking, and D. Brühne. 1992. Analytical determination of the distribution of flumethrin on the body surface of cattle following topical pour-on application. *Vet. Parasitol.* 42: 137-143.
- Velthuis, A., H. W. Saatkamp, M. C. M. Mourits, A. A. Koeijer, and A. R. W. Elbers. 2010. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev. Vet. Med.* 93: 294-304.
- [WHO] World Health Organization. 1981. WHO (1981) instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: mimeographed document (WHO/VBC/81.810). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zientara, S., N. G. MacLachlan, P. Calistri, J. M. Sanchez-Vizcaino, and G. Savini. 2010. Bluetongue vaccination in Europe. *Expert Rev. Vaccines* 9: 989-991.

Received 15 July 2010; accepted 20 October 2010.





*Manuscrit #3* (soumis à PlosOne) :

## **Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in France**

**Roger Venail**<sup>1\*</sup>, Jonathan Lhoir<sup>2</sup>, Ignace Rakotoarivony<sup>2</sup>, Xavier Allène<sup>2</sup>, Marie-Laure Setier-Rio<sup>1</sup>, Bethsabée Scheid<sup>1</sup>, Laëtitia Gardès<sup>2</sup>, Alexandre Gosset<sup>2</sup>, Renaud Lancelot<sup>2</sup>, Geoffrey Gimonneau<sup>2</sup>, Claire Garros<sup>2</sup>, Thomas Balenghien<sup>2</sup>, Simon Carpenter<sup>3</sup> and Thierry Baldet<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>EID Méditerranée, Montpellier, France

<sup>2</sup>Cirad, UMR15 CMAEE; INRA, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France

<sup>3</sup>The Pirbright Institute, Vector-borne Viral Disease Programme, Woking, United Kingdom

\*e-mail: [rvenail@yahoo.com](mailto:rvenail@yahoo.com)

### **Abstract**

*Culicoides* biting midges are vectors of arboviruses, including bluetongue virus and Schmallenberg virus, that cause considerable economic losses to the global livestock industry. The use of insecticides to inflict mortality on *Culicoides* and hence reduce host-vector contact forms part of an integrated vector control program which aims to decrease arbovirus transmission. Despite being recommended by many authorities there is a lack of quantitative data demonstrating the efficacy of insecticides in this role. The objective of this study is therefore to determine the baseline susceptibility status of *Culicoides* vectors against six insecticide active ingredients: three based on synthetic pyrethroids (alpha-cypermethrin, deltamethrin and permethrin), and three based on organophosphate active ingredients (phoxim, diazinon and chlorpyrifos-methyl). Susceptibility tests were conducted on field-collected *Culicoides obsoletus*, *Culicoides imicola* and laboratory-reared *Culicoides nubeculosus* using a modified World Health Organization (WHO) standard assay. The study revealed that the three *Culicoides* species were highly susceptible to the six active ingredients tested and that synthetic pyrethroid insecticides inflicted greater mortality than organophosphate-based ones. Deltamethrin was found to be the most toxic active ingredient. Data presented will be used as a baseline reference to monitor the susceptibility status of *Culicoides* to current insecticides and also to new active ingredients with practical implications for vector control strategies.

## Introduction

*Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are small, hematophagous, dipteran insects involved worldwide in the biological transmission of livestock arboviruses. These arboviruses inflict economically important diseases such as bluetongue (BT), African horse sickness (AHS), epizootic haemorrhagic disease (EHD) (all being notifiable to the Office International des Epizooties: OIE – World Organisation for Animal Health), and more recently Schmallenberg disease [1]. These diseases cause severe economic impacts through the imposition of animal movement restrictions to reduce spread (which also reducing animal trade), the cost of monitoring and surveillance when the diseases are notifiable to OIE and morbidity and mortality that arises in susceptible animals [2].

In the absence of safe and efficacious vaccines, control measures against *Culicoides* populations have been recommended by the European Food Safety Authority (EFSA) to mitigate against transmission of BTV [3] and would be likely to be employed in the initial stages of an outbreak of AHS. Measures suggested include insecticide applications and larval development habitat modification or destruction. The use of insecticide residual spraying has been suggested only in protecting particularly valuable animals within stables and during transport when livestock is moved outside a restriction zone. Physical methods as habitat modifications include removal or reduction of larval breeding sites on farm holding and housing livestock in closed buildings at times of high levels of *Culicoides* activity.

At present, no insecticidal products are authorised specifically against *Culicoides* in the EU, although a wide range of untested products are available, licensed and in use against other arthropods species of veterinary interest [3]. The most commonly used method employed in attempts to control *Culicoides* vectors of arboviral animal diseases is the application of pour-on pyrethroid insecticides on ruminants (usually poured or sprayed along the back-line of the animal). Pour-on products are most commonly based on synthetic pyrethroids but some certain organophosphate-based formulations are still available and licensed for use in Europe. Insecticidal pour-ons exert their effect in two ways: primarily they are highly toxic to insects landing on the treated animal, often killing within minutes of their landing; secondarily they exert a contact irritation that may reduce the probability of the insect successfully initiating or completing a blood meal from the host. While toxicity of different active ingredients is usually relatively easy to define, the latter effect of pour-on products is not usually so well defined and results vary greatly between studies [4].

Among a relatively short list of authorised veterinary medicinal products in Europe provided by EFSA (2008) [3] some active ingredients have been studied in their effect on *Culicoides*. These include alpha-cypermethrin [5,6], cypermethrin [7,8], deltamethrin [9-12], fenvalerate [13], lambda-cyhalothrin [14] and permethrin [13,15,16]. Other trials have been conducted with organophosphates [17,18], DEET [5], plant derived insecticides [19], fungi [20] and with a mixture of active ingredients [21-23]. The assessment of the insecticide efficiency have been made using different experimental designs including the exposure of *Culicoides* to hair cut from pyrethroid-treated animals [6,14,24] or directly to treated animal [12] or nets treated

with a variety of insecticides with mesh-treated light traps close to animals [21,23,25]. Comparison between studies is extremely difficult and results produced are highly variable. This variation in susceptibility to insecticides across trials was reported previously and partly attributed to variations in experimental protocol [4] highlighting the importance of standardized methods to obtain comparable data.

Recent studies have been performed using a modified WHO standardized technique to compare susceptibility of *Culicoides* to insecticides [12,26] following earlier studies [27,28]. This baseline information on the susceptibility of *Culicoides* populations to authorised insecticides is important in recommending the most effective insecticides and in detecting the potential for development of resistance. While insecticide resistance has not been documented in European *Culicoides* to date, there is a risk of development due to the limited classes of products that are registered and available for use in the Member States. In addition, the same products have been used on a wide scale for many years on livestock to control other arthropods of veterinary interest like ticks and biting Dipteran (horn fly, stable fly). Such an important use could result in the selection of resistant insects that take blood on treated animals or living in farms such as *Culicoides*. As an example, the horn fly, *Haematobia irritans irritans*, is becoming resistant to many of the insecticides in several countries [29].

Due to the lack of information about the susceptibility of *Culicoides* species to insecticides, this study screens the active ingredients of five of the more frequently used veterinary products in Europe (pyrethroid: alpha-cypermethrin, deltamethrin and permethrin, organophosphate: diazinon/dimpylate and phoxim) and one used in Africa and Latin America (chlorpyrifos-methyl). Assessments were conducted against three different *Culicoides* species of veterinary interest: laboratory-reared *Culicoides nubeculosus* Meigen and field-collected populations (France) of *C. obsoletus* Meigen, one of the main vector of BTV and SBV in Europe [30] and *C. imicola* Kieffer due to its widespread distribution throughout Africa, Europe and Asia and its important role in BTV transmission in the Mediterranean Basin [7]. The main objective of this study is to obtain reference baseline and comparable data with the perspective of testing the efficiency of insecticide products in laboratory and field conditions. The integration of insecticidal treatments into control programs against *Culicoides*-borne diseases is then discussed.

## Material and Methods

### ***Culicoides* collections and identification**

Three different species were used for insecticide susceptibility tests: one laboratory reared species and two field-collected species. *Culicoides nubeculosus* specimens were provided from laboratory colony maintained under insectary conditions (temperature 24°C ±1°C, 70 ±10% relative humidity and 12:12 hours light:dark cycle) at Cirad (Montpellier, France). The *C. nubeculosus* colony was established in 2012 from eggs and larvae provided by The Pirbright Institute. *Culicoides obsoletus* and *C. imicola* specimens were collected from the

field in privately owned farms in Peret-Bel-Air (41°30'05"N; 9°02'50"E, Corrèze department, France, May-June 2012 and 2013) and in Pianottoli-Caldarelo (45°28'43"N; 2°02'40"E, Corsica, France, August 2012 and September 2013) respectively. *Culicoides* were collected using a modified suction UV-light trap (OVI model, South Africa) with the collection jar replaced by a fine mesh cage to enable live collections. To prevent desiccation of *Culicoides* during the collection period, wet paper was placed on aluminium foil and rolled around the mesh cages. Due to different activity periods, *C. obsoletus* collections were conducted from 1h before sunset to midnight, while *C. imicola* were collected from 1h before sunset until dawn. *Culicoides obsoletus* collection cages were stored in an insulated box in expanded polystyrene covered with a soaked tissue paper overnight and *C. imicola* collection cages were transported directly to the test room.

Following insecticide trials, field-collected individuals were morphologically identified to species level for *C. imicola* or to *Obsoletus* complex [31] using a binocular microscope; the *Obsoletus* complex were further identified to species level using a diagnostic multiplex PCR following the method outlined previously [32].

### **Insecticide active ingredients and impregnated papers**

Insecticide active ingredients were selected on the basis of the most commonly pour-on formulations used by European farmers to control livestock ectoparasites (Table 1). There were acquired from Sigma-Aldrich® from the same manufacturer PESTANAL® trademark and presented a purity degree > 98% (Sigma-Aldrich HPLC batch analysis). Test papers were impregnated after training provided by a WHO collaborative centre (LIN-IRD, France). Insecticide active ingredients were stabilized using an acetone-silicon mix as solvent (2 ml per paper, 67% acetone, and 33% silicone). Control papers were impregnated with 2 ml of acetone-silicone mix only. Impregnations were realized by the same person to ensure consistency. Papers were impregnated few days before the testing period and conserved at 4°C wrapped in aluminium foil. Each paper was used only three times.

### **Insecticide susceptibility tests**

Insecticide susceptibility tests were performed following the standardised WHO protocol for mosquito bioassay using tubes test (WHO/VBC/81.805) [33,34] adapted for *Culicoides* [12]. Because insecticide susceptibility could not only be age specific [35], but also related to physiological status and gender [34,36], bioassays were standardized according to *Culicoides* physiological states. Bioassays were performed with 2-3 days old females of laboratory-reared *C. nubeculosus* that had not been blood-fed and field-collected individuals of *C. obsoletus* and *C. imicola* from the night before the day of the trial. For field collected *Culicoides*, data analysis only considered nulliparous females; parity was determined using abdominal pigmentation following completion of trials [37].

*Culicoides* were exposed for 1h to insecticide-impregnated papers impregnated with serial dilutions of insecticides and one control paper with the carrier compound only, in WHO insecticide exposure tubes. For each replicate carried out on field collected *Culicoides*, approximately 100 unsorted individuals were placed in each tube to obtain at least 25



nulliparous females of the target species. Following the exposure period, dead and live *Culicoides* were transferred using a motorised aspirator to recovery tubes held vertically for 24h, supplied with a 10% sugar solution provided on cotton wool pads. After the observation period, live *Culicoides* were collected with a mouth aspirator and placed in 96% ethanol. The number of dead and live *Culicoides* was then recorded to assess the 24h rate of mortality. All susceptibility tests were performed in rooms with temperatures of  $21\pm 3^{\circ}\text{C}$  and relative humidity of  $70\pm 10\%$ . One complete series of serial dilutions and one negative control (untreated paper) was considered a single replicate and four replicates were performed for each active ingredient and targeted species.

### Statistical analysis

Classical dose-response analysis was performed following WHO recommendations [34]: mortality was calculated by pooling the number of all dead *Culicoides* across all replicates and expressed as a percentage of the total number of exposed individuals. The control mortality was used to validate the replicates, when control mortality was above 20% the replicate was discarded. When control mortality was between 5% and 20%, mortality was corrected using Abbott's method:

"Corrected mortality =  $100 \times \frac{(\% \text{ observed mortality} - \% \text{ control mortality})}{(100 - \% \text{ control mortality})}$ " [38]. When control mortality was below 5%, no correction was performed. Data were analysed with a probit regression analysis [39] using PriProbit ver. 1.63 to obtain susceptibility values ( $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{90}$ ) and sigmoidal curves of dose-response estimations of each insecticide active ingredient for each species.

A second insecticide susceptibility analysis was performed to determine the effect of species, doses and their interactions on the probability of death after insecticide exposure. The two families of active ingredients were analysed separately as the concentrations tested were different. Initially, a generalised linear model with a binomial distribution was fitted leading to an over dispersion of our data (goodness of fit,  $p < 0.05$ ). Therefore, to account for this, a beta-binomial logistic regression model was used (goodness of fit:  $p > 0.05$ ). The first model was fitted with both explanatory variables (i.e. mortality~dose\*species); a second model was fitted without species and then the effect of the variable was tested using the Pearson correlation coefficient. R freeware (R Development Core Team 2012) and additional packages (aods3, lattice) were used for data analysis and graphics.

### Ethics statement

Field *Culicoides* specimens were collected in privately owned farms; no specific permissions were required for these locations. This study did not involve endangered or protected species. Insect collections did not cause any pain or stress to animals in vicinity. Thus, according to the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes in Europe, it was not necessary to submit this protocol to an ethics committee. The collection protocol was presented to all animal owners who gave their permission to their involvement.

## Results

A total of 25,972 nulliparous females were used in bioassays (4,007 *Culicoides obsoletus*, 10,204 *Culicoides imicola* and 11,761 *Culicoides nubeculosus*). Among the 4,165 *Obsoletus* complex individuals collected, 4,007 (96.2%) were molecularly identified as *C. obsoletus*, 146 (3.5%) as *C. scoticus* and 12 (0.3%) specimens were not identified by the assay and not included in analysis.

Mortality recorded 24h after 1h exposure to insecticides active ingredient indicated that *C. nubeculosus*, *C. imicola* and *C. obsoletus* were all susceptible to the six active ingredients tested (Fig. 1, Table 2 and 3). The susceptibility values (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>) calculated by probit analysis are presented in percentage of active ingredient/surface (Table 2) and in its equivalent in mg/m<sup>2</sup> (Table 3) as baseline values for further studies. For pyrethroids, permethrin produced the highest LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values, whereas deltamethrin gave the lowest for the three species studied. Among the organophosphate active ingredients tested, chlorpyrifos-methyl produced the highest LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values, whereas diazinon gave the lowest ones. The gaps between lower and upper 95% confidence intervals (95% CI) in figure 1 represent the variability of the response within each species against each active ingredient. The gaps between LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> within each species represent the slope of the dose-response curves against each active ingredient (Fig. 1, Table 2 and 3). The smaller the gap between LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, the steeper the slope was, which means that a small increase of the dose can provide a higher mortality. Results from deltamethrin against *C. imicola* pass from 50% to 90% by increasing the quantity of active ingredient by eight times. Alpha-cypermethrin against *C. nubeculosus* required a quantity of 35 times the amount of active ingredient to achieve the same increase in mortality.

Sigmoidal curves of dose-response obtained after data analysis indicated that synthetic pyrethroid active ingredients were 1-3 log-fold more effective/unit weight than organophosphates (Fig. 2). Deltamethrin was the most toxic insecticide ingredient while diazinon was the least toxic. The apparent grouped sigmoidal curves from the same active ingredient represented that the dose-response of the three tested species is similar. The species effect was not significant in the case of deltamethrin (p=0.14), alpha-cypermethrin (p=0.26) or permethrin (p=0.65) active ingredients. In contrast, organophosphate active ingredients presented significant species effects in chlorpyrifos-methyl (p<0.001), phoxim (p<0.001) and diazinon (p<0.001). In chlorpyrifos-methyl and diazinon, the LC<sub>50</sub> of *C. nubeculosus* was respectively 2.6-3.8 times and 1.8-2.2 higher than the other two species, whereas with phoxim the LC<sub>50</sub> of *C. obsoletus* was 5.0-5.6 times lower than the other two species (Fig 2). Diagnostic concentrations for the six insecticides tested are presented in Table 4.

## Discussion

The results of this study present the first insecticide susceptibility assessment across *Culicoides* species in Europe. More than 25,000 *Culicoides* were tested to obtain a robust and reliable dataset demonstrating that species within the genus varied significantly in intrinsic susceptibility to pyrethroid and organophosphate active ingredients. The use of the standardized method enabled the assessment of the *Culicoides* susceptibility to current insecticides, providing important baseline information including reference values for a laboratory reared-species, *C. nubeculosus*. Pyrethroid insecticides were demonstrated to be more toxic to the three *Culicoides* species tested than were organophosphate insecticides. This confirms previous studies conducted in wind tunnel trials carried out in USA with other *Culicoides* vector species [40-42]. This differential toxicity between the two insecticide active ingredient families has been also previously highlighted in other insect species such as mosquitoes [43-45] and termites [46]. The most toxic insecticides were deltamethrin and alpha-cypermethrin, both of which are synthetic 2nd generation type II  $\alpha$ -cyano pyrethroid insecticides.

WHO recommendations for insect susceptibility tests advise the use of standardised ages for analysis. This restricts material in use to either adult females derived from larval collections (the preferred option) or, if larval collections are not possible, the F1 progeny of field collected females. These solutions were not used in this study however, as colonization of *C. imicola* and *C. obsoletus* has not been achieved [47]. As a more logistically feasible alternative to circumvent this issue, field-collected unpigmented females were assumed to be of a similar age [37].

Diagnostic concentrations proposed in this study are in accordance with strains of the mosquito *Anopheles gambiae* [34] (Table 4). The statistical modelling approach used in this study highlighted no species effect for the three synthetic pyrethroid active ingredients, indicating that the three *Culicoides* species showed similar susceptibility. Although the absence of insecticide resistance needs to be confirmed by further bioassays and additional biochemical or molecular studies, diagnostic concentrations for routine monitoring purpose of insecticide resistance in *Culicoides* are proposed for the three pyrethroids AI studied (Table 4). Additional studies need to be conducted for organophosphate insecticides in order to confirm diagnostic concentration, as some species effects were highlighted, suggesting natural species-specific susceptibility as previously reported for mosquitoes [48,49]. This could also, however, represent potential resistance mechanisms, although diagnostic concentrations are again similar to those of the mosquito susceptible strain *Anopheles gambiae* [34].

Resistance to many insecticides has been widely reported in the New World for an important veterinary insect pest, *Haematobia irritans irritans*, which has been specifically targeted by insecticide treatment on farms or ruminants using pour-on applications. This resistance has been demonstrated to occur through several known mechanisms, including target site insensitivity [50,51] and metabolic detoxification [52]. In order to detect the development of

resistance mechanism in *Culicoides*, as in mosquitoes, it is recommended to test by bioassay the vector susceptibility over time throughout the year to assess temporal trends in resistance, and also compared multiple sites to provide information about geographical distribution of resistance. Surveys of broadly distributed species such as *C. imicola* and *C. obsoletus* could provide helpful information about resistance according to the different insecticide pressure and environmental context across countries. Indeed, pyrethroids are mainly used in agriculture such as for crop protection against pests [53] or other animal diseases vector such as ticks [54], which could select or increase resistance development in *Culicoides*. As *Culicoides*-borne diseases remains a major animal health risk in Europe, the monitoring of insecticide resistance in *Culicoides* vectors should be increased in periodicity, geographical coverage, and range of insecticides to assist control programs to anticipate and respond accordingly to *Culicoides* insecticide resistance status [34].

In conclusion, this study has defined the baseline susceptibility status of *Culicoides* vectors against six insecticide active ingredients, three based on synthetic pyrethroid active ingredients (alpha-cypermethrin, deltamethrin and permethrin), and three on organophosphates (phoxim, diazinon and chlorpyrifos-methyl). A laboratory colony and field collected species of *Culicoides* were all susceptible to these insecticides but deltamethrin was most effective as an active ingredient. Diagnostic concentrations are proposed for three pyrethroids active ingredients, which are commonly used insecticides across Europe. These diagnostic concentrations will be used in further studies aiming to test the efficiency of insecticidal formulations applied directly on animals (e.g. pour-on and baths/dips), or insecticide impregnated materials (e.g. nets and paints) against *Culicoides* but also to monitor the potential emergence of resistance

## **Acknowledgments**

This study was funded by EU grant FP7-261504 and is catalogued by the EDENext steering committee as EDENext manuscriptXXX (<http://www.edenext.eu>).

The authors are grateful to Jacques Virolles and family, farmers from Corrèze and Albert Jungen and family, farmers from Corsica, who permit us to enter in their farms and making there stables available for collection.

## **References**

1. Carpenter S, Groschup MH, Garros C, Felipe-Bauer ML, Purse BV (2013) *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Research* 100: 102-113.
2. Hoogendam K (2007) International study on the economic consequences of outbreaks of bluetongue serotype 8 in north-western Europe. Leeuwarden, Netherlands: University of Van Hall-Larenstein.

3. EFSA (2008) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission (DG SANCO) on Bluetongue. The EFSA Journal 735: 1-69.
4. Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ (2008) Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. Medical and Veterinary Entomology 22: 175-187.
5. Page PC, Labuschagne K, Nurton JP, Venter GJ, Guthrie AJ (2009) Duration of repellency of N,N-diethyl-3-methylbenzamide, citronella oil and cypermethrin against *Culicoides* species when applied to polyester mesh. Veterinary Parasitology 163: 105-109.
6. Papadopoulos E, Bartram D, Carpenter S, Mellor PS, Wall R (2009) Efficacy of alphacypermethrin applied to cattle and sheep against the biting midge *Culicoides nubeculosus*. Veterinary Parasitology 163: 110-114.
7. Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Del Rio R, Borrás D, *et al.* (2010) Protection of livestock against bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. Medical and Veterinary Entomology 24: 169-175.
8. Papadopoulos E, Rowlinson M, Bartram D, Carpenter S, Mellor PS, *et al.* (2010) Treatment of horses with cypermethrin against the biting flies *Culicoides nubeculosus*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Veterinary Parasitology 169: 165-171.
9. Schmahl G, Klimpel S, Walldorf V, Al-Quraishy S, Schumacher B, *et al.* (2009) Pilot study on deltamethrin treatment (Butox 7.5, Versatrine) of cattle and sheep against midges (*Culicoides* species, Ceratopogonidae). Parasitology Research 104: 809-813.
10. Mullens B, Gerry A, Sarto I, Monteys V, Pinna M, González A (2010) Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. Journal of Medical Entomology 47: 106-110.
11. Gerrike N (2011) Effectiveness of insecticide-treated mosquito fences protecting calves confined to igloos against biting midges and other nuisance insects. Berlin: Freien Universität Berlin.
12. Venail R, Mathieu B, Setier-Rio ML, Borba C, Alexandre M, *et al.* (2011) Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. Journal of Medical Entomology 48: 351-357.
13. Schmahl G, Klimpel S, Walldorf V, Schumacher B, Jatzlau A, *et al.* (2009) Effects of permethrin (Flypor) and fenvalerate (Acadrex60, Arkofly) on *Culicoides* species-the vector of Bluetongue virus. Parasitology Research 104: 815-820.
14. Schmahl G, Walldorf V, Klimpel S, Al-Quraishy S, Mehlhorn H (2008) Efficiency of Oxyfly on *Culicoides* species -the vectors of Bluetongue virus- and other insects. Parasitology Research 103: 1101-1103.

15. de Raat IJ, van den Boom R, van Poppel M, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MMS (2008) The effect of a topical insecticide containing permethrin on the number of *Culicoides* midges caught near horses with and without insect bite hypersensitivity in the Netherlands. Tijdschrift voor diergeneeskunde 133: 838-842.
16. Griffioen K, van Gemst DBJ, Pieterse MC, Jacobs F, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MMS (2011) *Culicoides* species associated with sheep in the Netherlands and the effect of a permethrin insecticide. Veterinary Journal 190: 230-235.
17. Breidenbaugh M, Haagsma K, Wojcik G, de Szalay F (2009) Efficacy of aerial spray applications using fuselage booms on Air Force C-130H aircraft against mosquitoes and biting midges. Journal of the American Mosquito Control Association 25: 467-473.
18. Breidenbaugh MS, de Szalay FA (2010) Effects of aerial applications of naled on nontarget insects at Parris Island, South Carolina. Environmental Entomology 39: 591-599.
19. Greive K, Staton JA, Miller PF, Peters BA, Oppenheim VMJ (2010) Development of Melaleuca oils as effective natural-based personal insect repellents. Australian Journal of Entomology 49: 40-48.
20. Ansari MA, Carpenter S, Butt TM (2010) Susceptibility of *Culicoides* biting midge larvae to the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*: prospects for bluetongue vector control. Acta Tropica 113: 1-6.
21. Bauer B, Jandowsky A, Schein E, Mehlitz D, Clausen PH (2009) An appraisal of current and new techniques intended to protect bulls against *Culicoides* and other haematophagous nematocera: the case of Schmergow, Brandenburg, Germany. Parasitology Research 105: 359-365.
22. Reeves WK, Peiris KHS, Scholte EJ, Wirtz RA, Dowell FE (2010) Age-grading the biting midge *Culicoides sonorensis* using near-infrared spectroscopy. Medical and Veterinary Entomology 24: 32-37.
23. Venter GJ, Labuschagne K, Boikanyo SNB, Morey L, Snyman MG (2011) The repellent effect of organic fatty acids on *Culicoides* midges as determined with suction light traps in South Africa. Veterinary Parasitology 181: 365-369.
24. Mehlhorn H, Schmahl G, D'Haese J, Schumacher B (2008) Butox ® 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). Parasitology Research 102: 515-518.
25. Del Rio R, Barceló C, Lucientes J, Miranda MA (2014) Detrimental effect of cypermethrin treated nets on *Culicoides* populations (Diptera; Ceratopogonidae) and non-targeted fauna in livestock farms. Veterinary Parasitology 199: 230-234.
26. Del Rio R, Venail R, Calvete C, Barceló C, Baldet T, *et al.* (2014) Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test. Parasitology 141: 542-546.

27. Braverman Y, Wilamowsky A, Chizov-Ginzburg A (1995) Susceptibility of *Culicoides imicola* to cyhalothrin. *Medical and Veterinary Entomology* 9: 443-444.
28. Braverman Y, Chizov-Ginzburg A, Pender H, Wilamowski A (2004) Susceptibility and repellency of *Culicoides imicola* and *Culex pipiens* to lambda-cyhalothrin. *Veterinaria italiana* 40: 336-339.
29. Oyarzún MP, Quiroz A, Birkett MA (2008) Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Medical and Veterinary Entomology* 22: 188-202.
30. Elbers ARW, Meiswinkel R, van Weezep E, Kooi EA, van der Poel WHM (2013) Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges in the Netherlands in 2012. *Transboundary and emerging diseases*.
31. Delécolle JC, De La Rocque 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: 371-379.
32. Nolan DV, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas JF, *et al.* (2007) Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary microbiology* 124: 82-94.
33. WHO (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. Establishment of the base-line. WHO/VBC/81.805.
34. WHO (2013) Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva, Switzerland: World Health Organization
35. Rajatileka S, Burhani J, Ranson H (2011) Mosquito age and susceptibility to insecticides. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 247-253.
36. Chareonviriyaphap T, Kongmee M, Bangs MJ, Sathantriphop S, Meunworn V, *et al.* (2006) Influence of nutritional and physiological status on behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to deltamethrin and cypermethrin. *Journal of Vector Ecology* 31: 89-101.
37. Dyce A (1969) The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Journal of the Australian Entomological Society* 8: 11-15.
38. Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
39. Finney D (1947) Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Oxford, England: Macmillan.



40. Kline D, Haile D, Baldwin, K. (1981) Wind tunnel tests with seven insecticides against adult *Culicoides mississippiensis* Hoffman. *Mosquito News* 41: 745-747.
41. Floore T (1985) Laboratory wind tunnel tests of nine insecticides against adult *Culicoides* species. *The Florida Entomologist* 68: 678-682.
42. Holbrook FR (1986) Wind tunnel evaluations of insecticides applied to colonized *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the Florida Anti-Mosquito Association* 57: 1-3.
43. Bansal SK, Singh KV (2004) Efficacy of different organophosphate and synthetic pyrethroid insecticides to the larvae of malaria vector *Anopheles stephensi*, Liston. *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India* 25: 485-488.
44. Mosha F, Lyimo I, Oxborough R, Matowo J, Malima R, *et al.* (2008) Comparative efficacies of permethrin-, deltamethrin- and alpha-cypermethrin-treated nets, against *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in northern Tanzania. *Annals of tropical medicine and parasitology* 102: 367-376.
45. Juntarajumnong W, Pimnon S, Bangs MJ, Thanispong K, Chareonviriyaphap T (2012) Discriminating lethal concentrations and efficacy of six pyrethroids for control of *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association* 28: 30-37.
46. Su N-Y, Scheffrahn RH, Ban PM (1993) Barrier efficacy of pyrethroid and organophosphate formulations against subterranean termites (Isoptera : Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology* 86: 772-776.
47. Nayduch D, Cohnstaedt LW, Sasaki C, Lawson D, Kersey P, *et al.* (2014) Studying *Culicoides* vectors of BTV in the post-genomic era: Resources, bottlenecks to progress and future directions. *Virus Research* 182: 43-49.
48. Somboon P, Prapanthadara L-a, Suwonkerd W (2003) Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus* s.l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 34: 87-93.
49. Pridgeon JW, Pereira RM, Becnel JJ, Allan SA, Clark GG, *et al.* (2008) Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 pesticides with different modes of action. *Journal of Medical Entomology* 45: 82-87.
50. Foil LD, Guerrero F, Alison MW, Kimball MD (2005) Association of the kdr and superkdr sodium channel mutations with resistance to pyrethroids in Louisiana populations of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). *Veterinary Parasitology* 129: 149-158.
51. Oyarzún MP, Li AY, Figueroa CC (2011) High levels of insecticide resistance in introduced horn fly (Diptera: Muscidae) populations and implications for management. *Journal of Economic Entomology* 104: 258-265.

52. Szalanski AL, Black WC, Broce AB (1991) Esterase staining activity in pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*: 303-312.
53. Oerke EC (2006) Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144: 31-43.
54. Walker AR (2014) Ticks and associated diseases: a retrospective review. *Medical and Veterinary Entomology*.

## Tables

**Table 1.** List of the most commonly authorised veterinary medicinal products used for the treatment of livestock to control ectoparasites in Europe

Active ingredient	Characteristics	Routes of administration	Targeted livestock	Common trade names
<b>Pyrethroids</b>				
Deltamethrin	2nd generation type II $\alpha$ -cyano	pour-on, dip and spray	cattle and sheep	Butox ®
Alpha-cypermethrin	2nd generation type II $\alpha$ -cyano	pour-on and dip	cattle and sheep	Ectotrine ®, Renegade ® and Dysect ®
Permethrin	1st generation type I non cyano	pour-on and ear tags	cattle, sheep and horses	Flypor ® and Tectonik ®
<b>Organophosphates</b>				
Chlorpyrifos-methyl*		pour-on	Cattle	Vectoclor ® in Africa or Cyperchlor ® in Latin America
Phoxim		pour-on, dip and spray	cattle, sheep, goats and horses	Sebacil ® 50%
Diazinon		spray and dip	Sheep	Dimpygal ®**

\*Active ingredient with no authorization in Europe, \*\*The only organophosphate insecticide currently authorized in UK.

**Table 2.** Susceptibility values (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, expressed in % of active ingredient) of field-collected adult female *Culicoides obsoletus* (Corrèze, France) and *Culicoides imicola* (Corsica, France) and laboratory-reared *Culicoides nubeculosus* (CIRAD colony) to different active ingredients: mortality recorded 24 h after 1h exposure to different concentrations.

Active ingredient	Species								
	<i>Culicoides obsoletus</i>			<i>Culicoides imicola</i>			<i>Culicoides nubeculosus</i>		
	No. test	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>	No. test	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>	No. test	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
(n)	(95%CI)	(95%CI)	(n)	(95%CI)	(95%CI)	(n)	(95%CI)	(95%CI)	
<b>Pyrethroids</b>									
Deltamethrin	3	0.0001	0.0008	3	0.0002	0.0008	4	0.0003	0.0019
	(1,491)	(0.0000-0.0002)	(0.0005-0.0018)	(2,525)	(0.0001-0.0002)	(0.0005-0.0014)	(2,528)	(0.0001-0.0004)	(0.0012-0.0043)
Alpha-cypermethrin	3	0.0012	0.0102	4	0.0008	0.0034	3	0.0016	0.0199
	(502)	NA	NA	(2,084)	NA	NA	(1,883)	NA	NA
Permethrin	2	0.0207	0.0668	4	0.0194	0.0812	3	0.0102	0.1045
	(527)	(0.0188-0.0229)	(0.0565-0.0822)	(1,562)	(0.0171-0.0219)	(0.0695-0.0975)	(2,055)	(0.0080-0.0117)	(0.0849-0.1337)
<b>Organophosphates</b>									
Chlorpyrifos-methyl	5	0.0182	0.0769	1	0.0274	0.1273	4	0.0725	0.1661
	(615)	(0.0142-0.0222)	(0.0632-0.0980)	(122)	(0.0176-0.0388)	(0.0784-0.3535)	(1,803)	NA	NA
Phoxim	6	0.0273	0.1177	2	0.1053	0.2441	3	0.1532	0.2759
	(763)	(0.0238-0.0312)	(0.0944-0.1564)	(2,207)	NA	NA	(1,965)	(0.1143-0.2091)	(0.2036-0.5761)
Diazinon	2	0.0848	0.2944	2	0.1031	0.3424	4	0.1839	0.3317
	(917)	NA	NA	(1,704)	NA	NA	(1,527)	(0.0800-0.2747)	(0.2347-0.4333)

No. test = number of test performed, *n* = number of individuals tested, 95% CI = 95% confidence interval

**Table 3.** Susceptibility values (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, expressed in mg/m<sup>2</sup> of active ingredient) of field-collected adult female *Culicoides obsoletus* (Corrèze, France) and *Culicoides imicola* (Corsica, France) and laboratory-reared *Culicoides nubeculosus* (CIRAD colony) to different active ingredients: delayed mortality 24 h after 1h exposure to different concentrations.

Active ingredient	Species								
	<i>Culicoides obsoletus</i>			<i>Culicoides imicola</i>			<i>Culicoides nubeculosus</i>		
	No. test	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>	No. test	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>	No. test	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
(n)	(95%CI)	(95%CI)	(n)	(95%CI)	(95%CI)	(n)	(95%CI)	(95%CI)	
<b>Pyrethroids</b>									
Deltamethrin	3	0.04	0.30	3	0.06	0.28	4	0.10	0.69
	(1,491)	(0.01-0.07)	(0.19-0.368)	(2,525)	(0.04-0.09)	(0.19-0.49)	(2,528)	(0.05-0.15)	(0.45-1.59)
Alpha-cypermethrin	3	0.43	3.73	4	0.28	1.25	3	0.59	7.31
	(502)	NA	NA	(2,084)	NA	NA	(1,883)	NA	NA
Permethrin	2	7.62	24.53	4	7.14	29.84	3	3.75	38.39
	(527)	(6.91-8.42)	(20.75-30.21)	(1,562)	(6.29-8.04)	(25.54-35.81)	(2,055)	(3.23-4.28)	(31.19-49.11)
<b>Organophosphates</b>									
Chlorpyrifos-methyl	5	6.67	28.23	1	10.06	46.75	4	26.64	61.02
	(615)	(5.20-8.15)	(23.20-35.98)	(122)	(6.47-14.24)	(28.81-129.84)	(1,803)	NA	NA
Phoxim	6	10.01	37.58	2	38.68	89.68	3	56.26	101.35
	(763)	(8.74-11.45)	(29.57-47.75)	(2,207)	NA	NA	(1,965)	(41.98-76.81)	(74.78-211.62)
Diazinon	2	31.16	108.13	2	37.89	125.78	4	67.55	121.85
	(917)	NA	NA	(1,704)	NA	NA	(1,527)	(29.38-100.91)	(86.22-159.17)

No. test = number of test performed, *n* = number of midges tested, 95% CI = 95% confidence interval

**Table 4.** Insecticide diagnostic doses (twice the LC<sub>99</sub>) for field-collected adult female *Culicoides obsoletus* (Corrèze, France) and *Culicoides imicola* (Corsica, France) and laboratory-reared *Culicoides nubeculosus* (CIRAD colony)

Active ingredient	Species					
	<i>C. obsoletus</i>		<i>C. imicola</i>		<i>C. nubeculosus</i>	
	DD %	DD mg/m <sup>2</sup>	DD %	DD mg/m <sup>2</sup>	DD %	DD mg/m <sup>2</sup>
<b>Pyrethroids</b>						
Deltamethrin	0.01	5.30	0.007	2.75	0.03	11.13
Alpha-cypermethrin	0.21	77.99	0.03	12.64	0.61	222.61
Permethrin	0.48	175.82	0.77	284.41	2.65	973.45
<b>Organophosphates</b>						
Chlorpyrifos-methyl	0.74	272.47	1.36	500.15	0.82	301.56
Phoxim	1.16	426.55	1.22	449.00	1.05	385.28
Diazinon	2.29	840.84	2.54	931.77	1.26	464.00

Figures

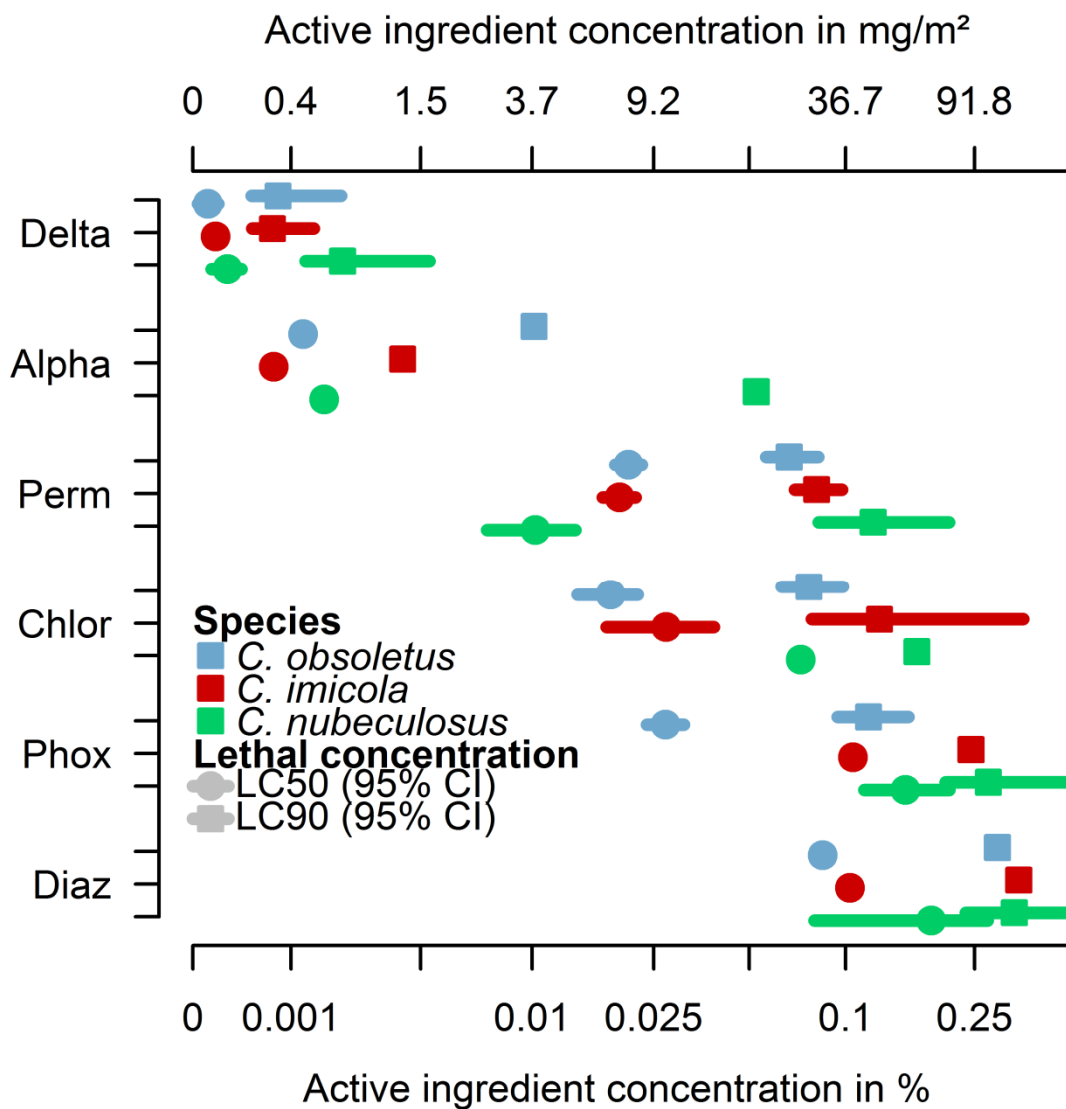
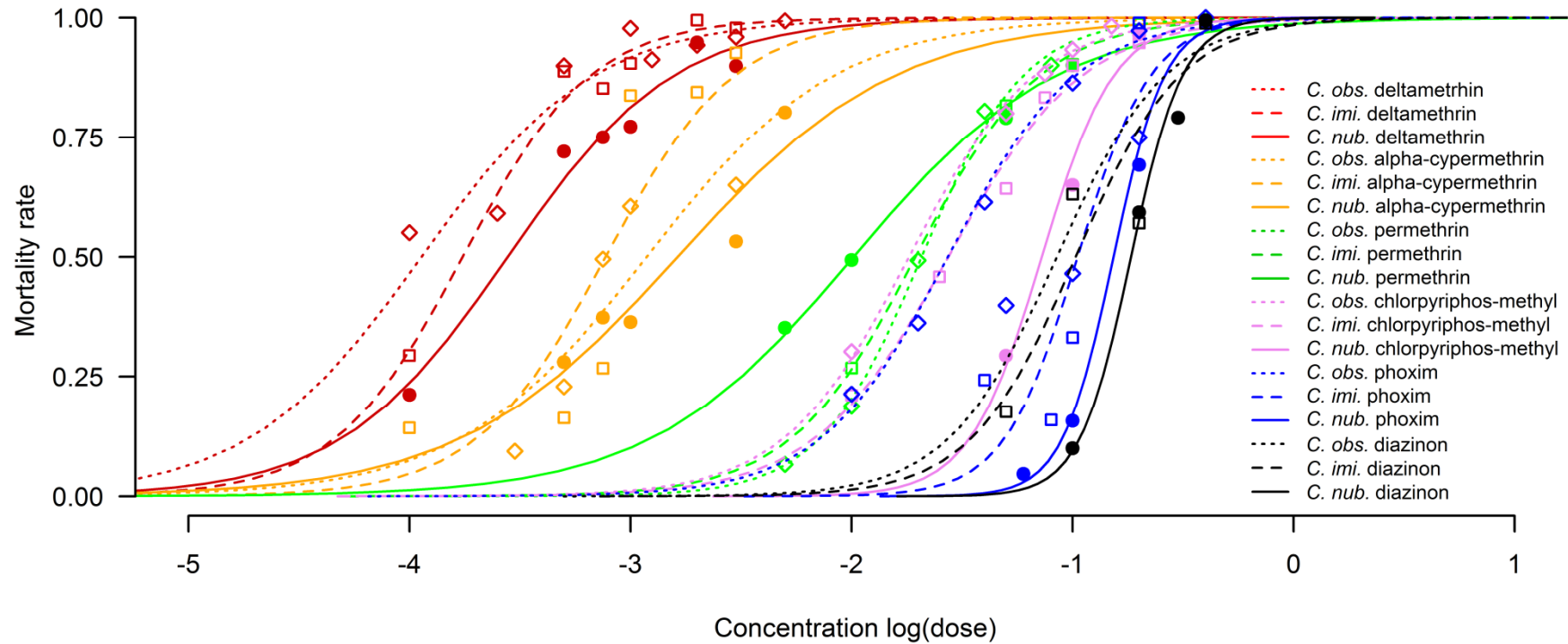


Figure 1. Lethal concentrations  $LC_{50}$ ,  $LC_{90}$  and 95% confidence intervals for *C. obsoletus*, *C. imicola* and *C. nubeculosus* exposed to six active ingredients: Delta: deltamethrin; Alpha: alpha-cypermethrin, Perm: permethrin, Chlor: Chlorpyriphos-methyl; Phox: phoxim and Diaz: diazinon. Lethal concentrations were calculated with PriProbit ver. 1.63, based on the mortality recorded at 24 h after 1h exposure to different concentrations.





**Figure 2.** Sigmoidal curves of dose-response estimations of 3 species of *Culicoides* exposed to different insecticides active ingredient. Dots represent pooled data obtained for each tested concentration (square: *C. obsoletus*; diamond: *C. imicola*; filled circle: *C. nubeculosus*) and lines represent the logistic regression line of each population for each active ingredient, calculated with PriProbit ver. 1.63, based on the mortality recorded at 24 h after 1h exposure to different concentrations.



## 2.2 Sensibilité des *Culicoides* aux substances actives insecticides en Europe et Afrique

Manuscrit #4 (Parasitology, Vol 141, 2014)

1

### Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test

R. DEL RÍO<sup>1\*</sup>, R. VENAIL<sup>2</sup>, C. CALVETE<sup>3</sup>, C. BARCELÓ<sup>1</sup>, T. BALDET<sup>4</sup>, J. LUCIENTES<sup>5</sup> and M. A. MIRANDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Zoology, University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Spain

<sup>2</sup> Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen (EID Méditerranée), Montpellier, France

<sup>3</sup> Unit of Animal Health and Production, Centre for Agricultural Food Technology and Research (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA)), Zaragoza, Spain

<sup>4</sup> Centre International de Recherche de l'Agriculture et du Développement (CIRAD), Montpellier, France

<sup>5</sup> Department of Animal Pathology, University of Zaragoza (UZ). Faculty of Veterinary Science, Zaragoza, Spain

(Received 4 April 2013; revised 14 July, 27 August and 8 October 2013; accepted 14 October 2013)

#### SUMMARY

Bluetongue is a disease of major economic concern in Europe. Its causative agent, bluetongue virus (BTV), is transmitted by several *Culicoides* species (mainly *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* in Europe). The application of insecticides on animals may reduce transmission of BTV, however, no formulation is currently licensed specifically against *Culicoides* midges. The present study assesses the susceptibility of *C. obsoletus* to deltamethrin using an adapted World Health Organization (WHO) susceptibility test. Midges were exposed to different dosages of deltamethrin for 1 h, and mortality after 1 h and 24 h was recorded. Results indicated that deltamethrin is highly toxic to *C. obsoletus* since a dose of  $1.33 \times 10^{-6}\%$  was enough to kill 50% of the population (LD<sub>50</sub>) in 24 h. The deltamethrin concentration needed to kill 90% of the population (LD<sub>90</sub>) was  $5.55 \times 10^{-6}\%$ . The results obtained in the present work could help to create a system that can be used to assess insecticide resistance and susceptibility of *Culicoides* biting midges.

Key words: *Culicoides obsoletus*, bluetongue, insecticide bioassay, LD<sub>50</sub>, LD<sub>90</sub>, vector control.

#### INTRODUCTION

Bluetongue (BT) is a widespread viral disease of ruminants, inflicting mortality rates of up to 13% and 41% in cattle and sheep, respectively (Conraths *et al.* 2009). The pathogen agent is an *Orbivirus* that is transmitted by competent vector species of *Culicoides* Latreille biting midges. A number of species can transmit the bluetongue virus (BTV) but *Culicoides imicola* Kieffer is considered the main vector of BTV in Africa and southern Europe (Boorman *et al.* 1985; Mellor *et al.* 1985) while *Culicoides pulicaris* Linnaeus, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, *Culicoides obsoletus* (Meigen) and *Culicoides chiopterus* (Meigen) are considered vectors in northern Europe (Purse *et al.* 2004; Conte *et al.* 2007; Balenghien, 2008; Meiswinkel *et al.* 2008; Stephan *et al.* 2009). Of these species, *C. obsoletus* is the most abundant in Europe (EFSA, 2008) and is considered as the main vector species in Europe (Jennings and Mellor, 1988; Carpenter *et al.* 2006; Hoffmann *et al.* 2009). This species, as well as *C. chiopterus* and *Culicoides scoticus* Downes & Kettle, has also been implicated in the

transmission of Schmallenberg virus, which emerged recently in northern Europe (Elbers *et al.* 2013).

The insecticide susceptibility of European species of *Culicoides* to deltamethrin is poorly documented. The responses of several species of *Culicoides* to a range of organochlorines, organophosphates, carbamates and pyrethroids has been documented (Hill and Roberts, 1947; Kline and Roberts, 1981; Floore, 1985; Holbrook, 1994; Braverman *et al.* 2004; Schmahl *et al.* 2008, 2009; Venail *et al.* 2011) and the results obtained with insecticides based on pyrethroids – such as deltamethrin – show promise for the control of *Culicoides* midges (Mehlhorn *et al.* 2008a,b; Schmahl *et al.* 2008, 2009; Venail *et al.* 2011).

In an attempt to standardize the technique of assessing the response of insects to chemical treatments, the World Health Organization (WHO, 1981) developed an *in vitro* method that proved successful for mosquitoes and was subsequently adapted to work on biting midges (Venail *et al.* 2011). The present work could aid to standardize a protocol to assess the sensitivity of *Culicoides* to insecticides and the results obtained could be used to develop commercial products with the correct doses of deltamethrin, thus avoiding the misuse of active components in the field that may be toxic to non-target insects or

\* Corresponding author: Laboratory of Zoology, University of the Balearic Islands, Cra/Valldemossa Km 7.5, Palma de Mallorca, Spain. E-mail: ricardo.delrio@uib.es

that might lead to the rapid development of resistance in *Culicoides* populations.

This study evaluates the sensitivity to deltamethrin of a field population of *C. obsoletus* using the standardized World Health Organization (WHO) test.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Insect collection*

Adult *Culicoides* midges were collected at a dairy farm named *Ca's Boter* (39°30'N; 3°7'S,) located in Felanitx on the Balearic Island of Majorca, Spain. Insects were collected using either Onderstepoort (Agricultural Research Council-OVI, South Africa) or Mini-CDC (John Hock Company, USA) light traps, which were operated from dusk to dawn (19:30 to 7:00) between April and June 2010. A piece of roughly folded paper towel was placed inside the collection container of the trap to shelter trapped insects from the air flow of the fan. Early in the morning captured midges were taken to the insectary inside a thermally insulated container. At the insectary, midges were transferred to WHO chambers (WHO, 1981) in batches of  $\approx 100$  individuals and maintained in a dim light environment at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  and 75–85% relative humidity (RH) with 5% sucrose solution for 24 h. After this time, any dead *Culicoides* were discarded and live ones were used to assess the insecticide.

##### *Insecticide susceptibility test*

The standard WHO test procedure (WHO, 1981) was modified to assess the lethal effects of differing doses of deltamethrin on *C. obsoletus*. Filter papers (Whatman # 1,  $90\text{ g m}^{-2}$ ,  $12 \times 25\text{ cm}$ ) impregnated with different doses of deltamethrin (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 and 0.01%) in acetone-silicone solution – 2 mL per paper; 67% acetone, 33% silicone – were supplied by a WHO collaborative centre (Vector Control Research Unit, Universiti Sains Malaysia). Nets supplied along with the WHO test kit were replaced by fine gauze to avoid escape of midges and their transfer from the maintenance to the test chambers (and vice versa) was easily conducted after cold anaesthetizing the insects for 3 min at  $-4^\circ\text{C}$ .

Papers without insecticide and impregnated only with 2 mL of acetone-silicone mixture were supplied by the same institution and used as a control.

WHO treated chambers with batches of  $\approx 100$  unsorted *Culicoides* were held horizontally for 1 h at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 75–85% RH. At least three replicates per concentration were conducted although more replicates were performed when some of the insects survived the treatment (Table 1). After exposure, insects killed by the immediate action of the insecticide were counted and identified, while those still alive were transferred to clean chambers and maintained in

the insectary with 5% sucrose solution. After 24 h, alive and dead midges were again counted and identified. If the mortality of control groups was between 5 and 20%, the mortality rate of the treatment groups was corrected by applying the Abbot formula (Abbott, 1925). If mortality of control groups was  $>20\%$ , the results were discarded. Data of the tested samples were pooled if mortality  $<5\%$  was noted for the control. All midges were identified using the key of Rawlings (1996) although a subsample of 793 specimens belonging to the *Obsoletus* complex were sent to CIRAD (Centre International de Recherche de l'Agriculture et du Développement) for molecular analysis as females of this complex are difficult to identify morphologically.

##### *Data analysis*

Data obtained from the different assays were pooled and subjected to Probit analysis (Finney, 1971) with the program XLStat 2011 (Addinsoft) and the Lethal Dose 50 ( $\text{LD}_{50}$ ) and  $\text{LD}_{90}$  (Raymond, 1985) were obtained. Only the numbers collected of *C. obsoletus* were high enough to analyse statistically as individual species. Statistical differences were considered significant at  $P < 0.05$ . Cumulative per cent mortality was transformed into probit units and plotted against the logarithm of dose of toxicant with the analytic program Statplus 2009. The log-dose probit (Ld-P) mortality line obtained was used to measure the variability of the strain.

#### RESULTS

A total of 2737 *Culicoides* midges belonging to 11 different species were assayed, namely: *Obsoletus* complex (78.4%), *C. circumscriptus* Kieffer (15.1%), *C. newsteadi* Austen (3.6%), *C. maritimus* Kieffer (0.9%), *C. univittatus* Vimmer (0.8%), *C. cataneii* Clastrier (0.6%), *C. longipennis* Khalaf (0.3%), *C. pictipennis* Staeger (0.1%), *C. puncticollis* Becker (0.1%) and *C. imicola* (0.1%). 2145 specimens belonged to the *Obsoletus* complex. Molecular analyses on specimens belonging to the *Obsoletus* complex revealed that only five (0.63%) of the 793 tested belonged to *C. scoticus* Downes & Kettle, while the remaining (788 individuals; 99.37%) belonged to *C. obsoletus*.

The mean mortality observed for the *Obsoletus* complex was  $>50\%$  at a deltamethrin concentration of 0.0005% and  $>90\%$  at a deltamethrin concentration of 0.001%. Doses  $\geq 0.005\%$  led invariably to 100% mortality. At 24 h post-exposure the mortality observed ranged from 1.8 (delt. conc. = 0.0001%) to 1.01 (delt. conc. = 0.001%) times higher than the mortality observed at 1 h post-exposure (Table 1).

After 1 h exposure, and following correction using the Abbot formula, the deltamethrin  $\text{LD}_{50}$  observed for the *Obsoletus* complex was  $\text{LD}_{50} = 1.89 \times 10^{-4}\%$

Table 1. Effect of deltamethrin on the mortality of *Culicoides obsoletus* under laboratory conditions

Deltamethrin concentration (%)	Σ <i>Culicoides</i> assayed (range)	N	$\bar{X}$ % mort ± s.d. (1 h)	$\bar{X}$ % mort ± s.d. (24 h)
Control	171 (41–78)	3	2 ± 3.0a	9 ± 9.1a
0.0001	389 (38–165)	6	23 ± 17.7a	46 ± 22.0a
0.0005	621 (67–185)	6	81 ± 22.6a	83 ± 16.7a
0.001	409 (54–103)	5	98 ± 16.3a	99 ± 1.4a
0.005	187 (27–106)	3	100 ± 0.0a	100 ± 0.0a
0.01	179 (28–115)	3	100 ± 0.0a	100 ± 0.0a

Means in rows with the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

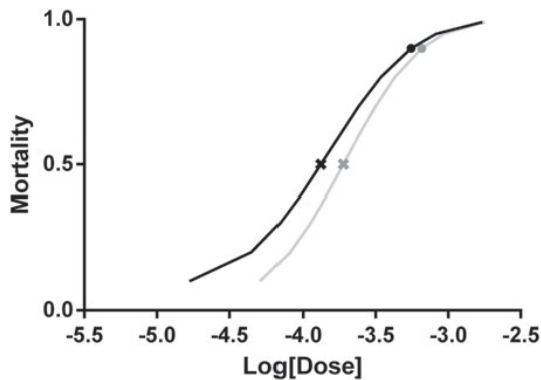


Fig. 1. Sensitivity of *C. obsoletus* when exposed to various concentrations of deltamethrin for 1 h (grey line) and after 24 h post exposure (black line) indicating LD<sub>50</sub> (crosses) and LD<sub>90</sub> (dots).

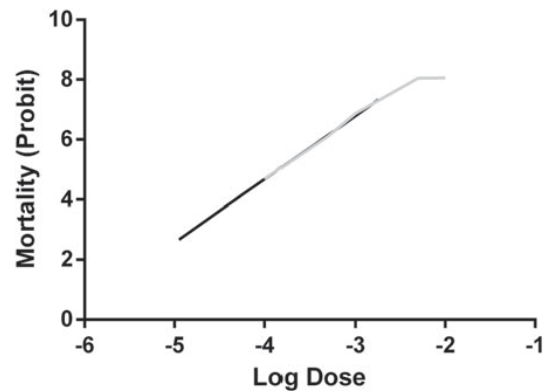


Fig. 2. Regression model showing the variability of response to deltamethrin of the *Culicoides* population assayed. Grey line represents the experimental points while black line represents the regression line (Ld-P).

and a LD<sub>90</sub> =  $6.57 \times 10^{-4}\%$  (Fig. 1). LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> were slightly lower at 24 h post-exposure (LD<sub>50</sub> =  $1.33 \times 10^{-4}\%$  and LD<sub>90</sub> =  $5.55 \times 10^{-4}\%$ ) than after 1 h exposure (Fig. 1).

The natural mortality observed was close to 2% at 1 h post-exposure and lower than 10% 24 h post-exposure (Table 1).

Slope values of the Log. Dose-Probit Line (Ldp) showed homogeneity in population response to the insecticide treatment (slope 2.11;  $R^2 = 0.96$ ). The straight line observed for the Ldp indicated a unimodal response of the population to the treatments (Fig. 2).

DISCUSSION

The population of *C. obsoletus* studied showed a high sensitivity to deltamethrin. The lowest concentration tested increased the mortality rate of the population by approximately 40% and concentrations  $\geq 0.005\%$  killed all midges assayed in less than 1 h, thus indicating the effectiveness of this insecticide in laboratory conditions. Deltamethrin affected the insects mainly during the first hour of contact and any residual effect was only evident when the lowest concentrations were applied.

The results obtained in the present work are consistent with other bioassays that demonstrate the highly potent effect of deltamethrin on *Culicoides*

populations (Bishop *et al.* 2001; Doherty *et al.* 2001; Melville *et al.* 2001; Mehlhorn *et al.* 2008a; Schmahl *et al.* 2008). Furthermore, the protocol used in the present bioassay offers a reproducible and standardized method to test *Culicoides* midges to insecticides. In a similar study, Venail *et al.* (2011) obtained a LD<sub>90</sub> =  $2.03 \times 10^{-3}\%$  24 h post-treatment, thus indicating that the population of *C. obsoletus* assayed in the present trial was 3.5 times more susceptible to deltamethrin than the population studied by Venail *et al.* (2011). This difference in tolerance observed between populations of the same species suggests that previous exposure to deltamethrin due to farm practices could have had an effect on the susceptibility of the *Culicoides* populations to this insecticide.

Standardized WHO tests are used to assess the susceptibility and possible resistances of certain insects – especially mosquitoes – to insecticides in laboratory conditions. However, field studies are essential to determine the real effect of the insecticide over the target population and associated fauna. The environmental temperature should also be considered since pyrethroids can exhibit lower toxicity at higher temperatures (Hodjati and Curtis, 1999). Knowledge of the temperature effects on deltamethrin toxicity could avoid the continuous use of sub-lethal doses of pyrethroids during the summer season in southern Europe that may lead to resistance development.



In the present work we have assessed the sensitivity of one of the main vector species – *C. obsoletus* – of BTV in Europe. However, assessment of the other important species in Europe – *C. imicola*, *C. pulicaris* or *C. chiopterus* – should be conducted in future works to contrast the results with previous studies (Venail *et al.* 2011) and establish its susceptibility to the insecticide. Furthermore, more field trials with discriminating doses of insecticide applied on animals should be conducted since the results obtained so far with permethrins have shown limited efficacy (Mullens *et al.* 2001; Venail *et al.* 2011). The repellent and insecticide effect of deltamethrin could, however, decrease the biting rate of the midges or reduce the size of the vector population thus affecting the infection rate and preventing the transmission of BTV.

The results obtained in the present trial showed that the population of *C. obsoletus* assayed is highly susceptible to deltamethrin treatments. Field trials with this insecticide would reveal its potential for the control of the *Culicoides* populations and determine if the reduction of the biting rate would be high enough to generate a significant impact on the transmission of BTV.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly initiated by the European Union as part of a project entitled 'Surveillance Network of Reoviruses, Bluetongue and African Horse Sickness in the Mediterranean basin and Europe' (MedReoNet) (contract no. 044285). The authors also thank Margalida Frontera for her constructive comments on earlier drafts of the manuscript, and Joan Huguet and family for their help, allowing us to collect the midges in their property.

#### FINANCIAL SUPPORT

We thank *Conselleria d'Innovació, Interior i Justícia* and the *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente* for financial support.

#### REFERENCES

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**, 265–267.

Balenghien, T. (2008). *Culicoides chiopterus*: Confirmation of its Status as Potential Vector of Bluetongue Virus in Europe. ProMed-mail. International Society for Infectious Diseases, Brookline, MA, USA.

Bishop, A.L., McKenzie, H.J., Spohr, L.J. and Barchia, I.M. (2001). *In vitro* testing of chemicals for repellency against *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *General and Applied Entomology* **30**, 35–40.

Boorman, J., Jennings, M., Mellor, P.S. and Wilkinson, P. (1985). Further data on the distribution of biting midges in southern Europe and the Mediterranean area, with special reference to *C. imicola*. In *Bluetongue and Related Orbiviruses* (ed. Barber, T.L. and Jochim, M.M.), pp. 187–190. Alan R. Liss, New York, USA.

Beaverman, Y., Chizov-Ginzburg, A. and Wilamowski, A. (2004). Susceptibility and repellency of *Culicoides imicola* and *Culex pipiens* to lambda-cyhalothrin. *Veterinaria Italiana* **40**, 337.

Carpenter, S., Lunt, H.L., Arav, D., Venter, G.J. and Mellor, P.S. (2006). Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera:

Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Journal of Medical Entomology* **43**, 73–78.

Conraths, F.J., Gethmann, J.M., Staubach, C., Mettenleiter, T.C., Beer, M. and Hoffmann, B. (2009). Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 433–435.

Conte, A., Goffredo, M., Ippoliti, C. and Meiswinkel, R. (2007). Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *Obsoletus* complex in Italy. *Veterinary Parasitology* **150**, 333–344.

Doherty, W.M., Johnson, S.J. and Reid, A.E. (2001). Suppression of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle in Queensland with deltamethrin and cypermethrin. *General and Applied Entomology* **30**, 45–47.

EFSA (2008). Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. Bluetongue vectors and insecticides. *EFSA Journal* **735**, 1–70.

Elbers, A.R., Meiswinkel, R., van Weezep, E., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. and Kooi, E.A. (2013). Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 106–109.

Finney, D. (1971). *Probit Analysis: A Statistical Analysis of the Sigmoid Response Curve*. Macmillan, Oxford, UK.

Floore, T.G. (1985). Laboratory wind tunnel tests of nine insecticides against adult *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae). *Florida Entomologist* **68**, 678–682.

Hill, M.A. and Roberts, E.W. (1947). An investigation into effects of gammexane on the larvae, pupae and adults of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer and on the adults of *Culicoides obsoletus* Meigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **41**, 143–163.

Hodjati, M.H. and Curtis, C.F. (1999). Effects of permethrin at different temperatures on pyrethroid resistant and susceptible strains of *Anopheles*. *Medical and Veterinary Entomology* **13**, 415–422.

Hoffmann, B., Bauer, B., Bauer, C., Bätz, 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. and Conraths, F.J. (2009). Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 1481–1484.

Holbrook, F.R. (1994). Survival, fecundity, and egg fertility of *Culicoides variipennis* (Diptera, Ceratopogonidae) fed on calves inoculated with ivermectin. *Journal of American Mosquito Control Association* **10**, 7–9.

Jennings, D.M. and Mellor, P.S. (1988). The vector potential of British *Culicoides* species for bluetongue virus. *Veterinary Microbiology* **17**, 1–10.

Kline, D.L. and Roberts, R.H. (1981). Effectiveness of chloropyrifos, fenitron, malation, and propoxur as screen treatments for control of *Culicoides mississippiensis*. *Journal of Economic Entomology* **74**, 331–333.

Mehlhorn, H., Schmahl, G., D'Haese, J. and Schumacher, B. (2008a). Butox® 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitology Research* **102**, 515–518.

Mehlhorn, H., Schmahl, G., Schumacher, B., D'Haese, J., Walldorf, V. and Klimpel, S. (2008b). Effects of Bayofly™ on specimens of *Culicoides* species when incubated in hair taken from the feet of previously treated cattle and sheep. *Parasitology Research* **102**, 519–522.

Meiswinkel, R., Goffredo, M., Leijts, P. and Conte, A. (2008). The *Culicoides* 'snapshot': a novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue (BT) in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* **87**, 98–118. doi:10.1016/j.prevetmed.2008.06.013.

Mellor, P.S., Jennings, D.M., Wilkinson, P.J. and Boorman, J. (1985). *Culicoides imicola*: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Veterinary Record* **116**, 589–590.

Melville, L.F., Hunt, N.T., Bellis, G.A. and Pinch, D. (2001). Evaluation of chemical treatments to prevent *Culicoides* spp. feeding on cattle in the Northern Territory. *General and Applied Entomology* **30**, 41–44.

Mullens, B.A., Gerry, A.C. and Velten, R.K. (2001). Failure of a permethrin treatment regime to protect cattle against bluetongue virus. *Journal of Medical Entomology* **38**, 760–762.

Purse, B.V., Caracappa, S., Marino, A.M.F., Tatem, A.J., Rogers, D.J., Mellor, P.S., Baylis, M. and Torina, A. (2004). Modelling the distribution of outbreaks and *Culicoides* vectors in Sicily: towards predictive risk maps for Italy. *Veterinaria Italiana* **40**, 303–310.

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.

Raymond, M. (1985). Présentation d'un programme basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cahiers ORSTOM Serie Entomology Medical Parasitology* **23**, 117–121.

- Schmahl, G., Sven, K., Walldorf, V., Al-Quraishi, S., Schumacher, B., Jatzlau, A. and Melhorn, H. (2008). Pilot study on deltamethrin treatment (Butox<sup>®</sup> 7.5, Versatrine<sup>®</sup>) of cattle and sheep against midges (*Culicoides* species, Ceratopogonidae). *Parasitology Research* **104**, 809–813. doi: 10.1007/s00436-008-1260-5.
- Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Schumacher, B., Jatzlau, A., Al-Quraishy, S. and Mehlhorn, H. (2009). Effects of permethrin (Flypor<sup>®</sup>) and fenvalerate (Acadrex<sup>®</sup> 60, Arkofly<sup>®</sup>) on *Culicoides* species – the vector of Bluetongue virus. *Parasitology Research* **104**, 815–820.
- Stephan, A., Clausen, P.H., Bauer, B. and Steuber, S. (2009). PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitology Research* **105**, 367–371.
- Strong, L. (1992). Avermectins: a review of their impact on insects of cattle dung. *Bulletin of Entomological Research* **82**, 265–274.
- Venail, R., Mathieu, B., Setier-Rio, M. L., Borba, C., Alexandre, M., Viudes, G., Garros, C., Allene, X., Carpenter, S. and Baldet, T. (2011). Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. *Journal of Medical Entomology* **48**, 351–357.
- WHO (1981). *Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Blackflies, Sandflies and Biting Midges to Insecticides: Mimeographed Document (WHO/VBC/81.810)*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.





*Manuscrit #5* (à soumettre à Pest Science Management) :

## Susceptibility of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) to cypermethrin in laboratory conditions

Ricardo del Río<sup>1\*</sup>, Carlos Barceló<sup>1</sup>, Roger Venail<sup>2</sup>, Javier Lucientes<sup>3</sup> and Miguel A Miranda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Zoology. University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Spain.

<sup>2</sup>Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen (EID Med), Montpellier, France.

<sup>3</sup>Department of Animal Pathology. Faculty of Veterinary Science. University of Zaragoza (UZ), Zaragoza, Spain.

\*e-mail: [ricardo.delrio@uib.es](mailto:ricardo.delrio@uib.es)

### Abstract

**Background:** Bluetongue (BT) is a viral disease of ruminants with remarkable economic importance in the affected countries mainly due to the restrictions imposed on animal movement and trading when an outbreak is detected. The vectors responsible for the transmission of the virus are insects of the genus *Culicoides* Latreille. In Europe, two species (*Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus*) are considered to play a major role in this transmission. The present work assesses the susceptibility of the BT vector *C. obsoletus* to cypermethrin in laboratory conditions. An adapted World Health Organization (WHO) test protocol was used for the bioassays. Field collected *Culicoides* midges were exposed for 1h to papers impregnated with six different concentrations of cypermethrin ranging from 0.0001% to 0.01% and then maintained for 24h to assess mortality.

**Results:** Results indicated that the concentration needed to kill 50% of the population was  $LC_{50} = 3.9e-003$  (1.1e-003, 7.2e-002) after 24h post-exposure. Accordingly, the concentration needed to kill 90% of the population was  $LC_{90} = 3.4e-002$  (8.8e-003, 7.2e+004). A knock-down effect was also observed and ranged from 0% to  $23.8 \pm 36.5\%$ .

**Conclusions:** Cypermethrin lethal concentrations have been determined for the BT vector *C. obsoletus* in laboratory conditions. Field studies based on the results obtained in the present work may provide valuable information for the control of BT epidemiological situations.

**Keywords:** Pyrethroid insecticide, cypermethrin, knock-down effect, WHO test.

## 1. Introduction

Bluetongue (BT) is a viral disease of worldwide distribution that affects wild and domestic ruminants and to some extent carnivores.<sup>1-3</sup> Its more severe clinical symptoms are displayed over certain breeds of sheep and occasionally on deer and cattle.<sup>4,5</sup> Up to 24 serotypes of BT virus (BTV) with different pathogenic traits are transmitted by vectors species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae).<sup>6</sup> *Culicoides imicola* Kieffer is considered to play a major role in the transmission of BTV in the south of Europe and throughout the African continent,<sup>7,8</sup> while a group of two isomorphic species (*Culicoides obsoletus* (Meigen) and *Culicoides scoticus* (Downes & Kettle)) identified as the *Obsoletus* complex<sup>9</sup> are considered the main vectors across Europe.<sup>10-12</sup> The different biological and ecological aspects of these vector species is of great importance for disease control when BTV or other *Culicoides*-borne arboviruses (such as the recently detected in Europe Schmallenberg virus<sup>13</sup>) emerges or re-emerges in regions with economical important susceptible ruminants.<sup>14</sup>

Broad spectrum insecticides based on organophosphates or organochlorines have been used for years to control nuisance and detrimental insects on farm habitats. The misuse of those insecticides may however lead to the accumulation of toxic compounds in soil and water or to the development of resistant populations of targeted insects.<sup>15</sup> The insecticide effect of different pyrethroids (synthetic compounds based on natural pyrethrins) on *Culicoides* populations is currently under study, and their environmental advantages over other organic insecticides encourage the use of these compounds in the farm industry. However, although some studies have determined the lethal concentrations of certain pyrethroids over particular populations of *Culicoides* vector species,<sup>16,17</sup> the insecticide or repellent effect of large part of pyrethroids on *Culicoides* populations remains to be studied.

The aim of the present study was to determine the insecticide effect of the pyrethroid cypermethrin on a *C. obsoletus* population in laboratory conditions with an adapted World Health Organization (WHO) test protocol initially developed to assess mosquito susceptibility to insecticides.<sup>18</sup> Knowledge of insecticide lethal concentrations on *Culicoides* vector species is essential to develop integrated strategies aimed to avoid or manage potential epidemiological risks associated to *Culicoides*-borne diseases.

## 2. Material and Methods

*Culicoides* midges were collected between sundown and sunset at a cattle farm located in Majorca (Ca's Boter: 39° 30' N, 3° 7' S) between May-June 2013 with Onderstepoort ultra violet (UV) light traps (Agricultural Research Council-Onderstepoort, South Africa). Collected insects were transported early in the morning to the laboratory in a thermic isolation container and live *Culicoides* were separated and maintained in WHO tubes<sup>17</sup> in batches of some 25 specimens for 24h with sucrose solution at 25°C, 75% RH in darkness. After the acclimation period, live *Culicoides* were transferred to test WHO tubes with insecticide impregnated papers for 1h as described by del Río *et al.* (2014).<sup>17</sup> Test papers were manually

impregnated with five different concentrations of cypermethrin (0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 0.0025%, 0.005% and 0.01%) and non-impregnated papers were used as controls. To avoid biased results due to a potential uneven distribution of the insecticide, two sets of papers (marked as A and B) were used alternatively. After 1h exposure to the insecticide, *Culicoides* from each concentration were separated in two different clean WHO tubes according to the following criteria; a) Midges apparently dead or exhibiting clear intoxication signs (e.g. crawling and flying difficulties) b) Midges apparently not affected by the insecticide. After 24h, alive and dead midges from each group were separated and morphologically identified according to Rawlings key.<sup>19</sup> The contribution of each species to the complex *Obsoletus* was determined previously with molecular tools (PCR). The gonotrophic status of females was identified according to Dyce criteria.<sup>20</sup> Insecticide tests were discarded if mortality in the control bioassay was higher than 20%, corrected after Abbot's formula when was between 5% and 20% and pooled when was lower than 5%.

## 2.1 Data analysis

Data obtained from the different assays were pooled and subjected to Probit analysis<sup>22</sup> with PriProbit and the Lethal Concentration 50 (LC<sub>50</sub>) and LC<sub>90</sub> was determined.<sup>23</sup> Only the numbers collected of the *Obsoletus* complex were high enough to analyze statistically. T-tests were used to compare the mortality rate between the two sets of papers (A and B) and statistical differences were considered significant at  $P < 0.05$ . Cumulative percent mortality was transformed into probit units and plotted against the logarithm of dose of toxicant with the analytic program Statplus 2009.

## 3. Results

A total of 1482 *Culicoides* midges belonging to at least seven species were assayed, namely: *Obsoletus* complex (1307; 88.2%), *C. newsteadi* Austen (147; 9.9%), *C. circumscriptus* Kieffer (22; 1.5%), *C. imicola* Kieffer (5; 0.3%), *C. cataneii* Clastrier (2; 0.1%), *C. maritimus* Kieffer (2; 0.1%) and *C. puncticollis* Becker (2; 0.1%). Regarding the gonotrophic condition of the *Obsoletus* complex, 941 specimens (72%) were nulliparous, 261 (20%) parous, 78 (6%) gravid, 22 (1.7%) blood fed and 5 (0.3%) specimens were males. A sample of 793 specimens of this *Obsoletus* complex population analysed with molecular tools indicated that more than 99% of the individuals belonged to the species *C. obsoletus*.

Nine replicates were conducted for each concentration, five with paper marked as A and four with paper marked as B, and not significant difference in the mortality rate between the two sets of impregnated papers were observed ( $P = 0.98$ ). After 1h exposure to the different concentrations of the insecticide, the mortality rate recorded for the nulliparous females of *C. obsoletus* ranged from  $5.0\% \pm 6.3$  for the lowest concentration assayed (0.0001%) to  $79.9\% \pm 21.8$  for the highest (0.01%). After 24h post exposure to the insecticide, the mortality rate of the remaining *C. obsoletus* ranged from  $2.7 \pm 5.3\%$  for the lowest concentration (0.0001%) to

16.7 ± 25.8% for the highest concentration assayed (0.01%) (Table 1). Some of the midges that exhibited clear signs of intoxication after 1h exposure to the insecticide were recovered when checked after 24h. This recovery rate (known as knock-down effect) ranged from 0% at lowest concentrations to 23.8 ± 36.5% at concentration of 0.005% (Table 1). The fitted dose/mortality curve obtained after correction with Abbot's formula indicated that the cypermethrin concentration needed to kill 50% of the population (LC<sub>50</sub>) of *C. obsoletus* after 24h was LC<sub>50</sub> = 3.9e-003 (1.1e-003, 7.2e-002). According to the same curve, the expected concentration that would kill 90% of the population was LC<sub>90</sub> = 3.4e-002 (8.8e-003, 7.2e+004) (Fig. 1).

## 4. Discussion

Results obtained in the present bioassay indicated that the population of *C. obsoletus* studied is highly sensitive to cypermethrin concentrations > 0.005%. At lower concentrations, survival of midges was > 50%. This pyrethroid active ingredient exerted its insecticide effect mainly during the 1h exposure to the population and no important residual effect was observed during the following 24h. The knock-down effect of a *Culicoides* population to an insecticide was not analysed before this work, and it was observed that a proportion of the cypermethrin affected population recovers during the next 24h at concentrations > 0.001% if they are no longer in contact with the insecticide, being able to continue a potential BTV transmission cycle. The Ldp line obtained indicated that the population assayed was homogeneous in its response to the treatment and no alterations that may lead to consider potential resistance to the insecticide were observed.

The toxicity of cypermethrin over *Culicoides* populations have been demonstrated in the past both in laboratory as well as in field conditions<sup>24,25</sup> and even if a repellent effect with compounds based on this pyrethroid have not been confirmed,<sup>25</sup> it has been observed that captures of the vector species *C. imicola* with UV light traps placed inside pens were reduced when physical barriers were treated with cypermethrin.<sup>27</sup> Toxicity bioassays have not been conducted previously with this insecticide over *Culicoides* midges, however, the susceptibility of the same vector species to other pyrethroid (deltamethrin) have been determined in the past and resulted to be around ten times more toxic than cypermethrin.<sup>16,17</sup> In contrast, cypermethrin seems to be more toxic than other pyrethroids when assayed on *Culicoides* populations, but this needs to be confirmed since those insecticides were assayed over different *Culicoides* species and methods (*C. imicola* and *C. sonorensis* Wirth & Jones).<sup>28-30</sup>

The species assayed in this trial belonged to the *Obsoletus* complex, comprising *C. obsoletus* and *C. scoticus* which are considered as sibling species due to their taxonomic similarity. *Culicoides scoticus* is not likely to have contributed to the results obtained in this work since a subsample composed by 793 individuals of the same *Obsoletus* complex population was molecularly identified in 2012 by the CIRAD institute and revealed that > 99% belonged to the species *Culicoides obsoletus*.<sup>17</sup> Hence, it is considered that results obtained in this work correspond to the species *Culicoides obsoletus*.

Further studies with this insecticide should be conducted on field conditions to assess its potential use for the control of vector populations. Liebsh & Liebsh<sup>23</sup> already confirmed the toxic effect of cypermethrin over *C. obsoletus* by applying impregnated ear tags on cattle and pyrethroid treated nets have been assayed in farms to determine the efficacy of those insecticide in controlling *Culicoides* populations.<sup>31</sup> However, the efficacy of pyrethroids for the control the other major vector species in Europe (*C. imicola*) both in laboratory as well as in field conditions remains to be confirmed.

Vector populations should be controlled avoiding misuse of toxic compounds in the field. Organisms treated with sub-lethal concentrations of insecticide may develop resistance responses while an over-use may result in excessive accumulation of toxic compounds in soil and organisms. Furthermore, other insects or even small vertebrates can be affected unnecessarily when too much insecticide is applied on field.<sup>31</sup> This work presents data of the cypermethrin concentration needed to exert an effect on a BTV vector population in laboratory conditions. The assessment of different concentrations of this pyrethroid in field conditions based on the results presented may offer valuable background information for the control of future BTV outbreaks or other *Culicoides* associated diseases.

## **5. Acknowledgments**

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 261504. The authors would like to thank Joan Capó and his family for their kindness and selfless help in the capture of the insects needed to conduct this study.

## 6. Bibliography

1. Alexander KA, MacLachlan JA, Kat PW, House C, O'Brien SJ, Lerche NJ, Sawyer M, Frank LG, Holekamp K, Smale L, McNutt JW, Laurenson MK, Mills MGL and Osburn BI, Evidence of natural bluetongue infection among African carnivores. *Am J Trop Med Hyg* 51:577–584 (1994).
2. Wilbur LA, Evermann JF, Levings RL, Stoll IR, Starling DE, Spillers CA, Gustafson GA and McKeirnan AJ, Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. *J Am Vet Med Assoc* 205:407–408 (1994).
3. Barnard BJH, Antibodies against some viruses of domestic animals in southern African wild animals. *Ond J Vet Res* 64:95-110 (1997).
4. Taylor WP, The epidemiology of bluetongue. *Rev Sci Tech* 5:351–356 (1986).
5. Maclachlan NJ, Drew CP, Darpel KE and Worwa G, The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *J Comp Path* 141:1-16 (2009).
6. Mellor PS, Boorman J and Baylis M, *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Ann Rev Entomol* 45:307-340 (2000).
7. Boorman J, Jennings M, Mellor PS, Wilkinson P, Barber TL and Jochim MM, Further data on the distribution of biting midges in southern Europe and the Mediterranean area, with special reference to *C. imicola*. In *Bluetongue and related orbiviruses*. Alan R Liss Inc, New York, pp 187-190 (1985).
8. Mellor PS, Jennings DM, Wilkinson PJ and Boorman J, *Culicoides imicola*: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Vet Rec* 116:589-590 (1985).
9. Garros C, Mathieu B, Balenghien T, Cêtre-Sossah C and Delécolle JC, 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 (2010).
10. Jennings DM and Mellor PS, The vector potential of British *Culicoides* species for bluetongue virus. *Vet Microbiol* 17:1-10 (1988).
11. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ and Mellor PS, Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom, *J Med Entomol* 43:73-78 (2006).
12. Hoffmann B, Bauer B, Bauer C, Bätza HJ, Beer M, Clausen PH, Geier M, Gethmann JM, Kiel E, Liebisch G, Liebisch A, Mehlhorn H, Schaub GA, Werner D and Conraths FJ, Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 15:1481–1484 (2009).



13. Dam Rasmussen L, Kristensen B, Kirkerby C, Brunn Rasmussen T, Belsham GJ, Bødker R and Bødner A, Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis* 18:1204-1206 (2012).
14. RASVE. Programa Nacional de Erradicación de Lengua Azul. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2010).
15. Georghiou GP, Management of resistance in arthropods. In *Pest resistance to pesticides*. Plenum Press, New York, pp 769-798 (1985).
16. Venail R, Mathieu B, Setier-Rio ML, Borba C, Alexandre M, Viudes G, Garros C, Allene X, Carpenter S and Baldet T, Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. *J Med Entomol* 48:351-357 (2011).
17. Del Río R, Venail R, Calvete C, Barceló C, Baldet T, Lucientes J and Miranda MA, Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test. *Parasit* 141:542-546 (2014).
18. WHO, Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: mimeographed document (WHO/VBC/ 81.810). World Health Organization Geneva, Switzerland (1981).
19. Rawlings P, 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 (1996).
20. Dyce AL, The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Aust J Entomol* 8:11-15 (1969).
21. Abbott WS, A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265-267 (1925).
22. Finney D, Probit analysis: a statistical analysis of the sigmoid response curve. McMillan, Oxford, London (1971).
23. Raymond M, Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol* 23:117-121 (1985).
24. Liebisch G and Liebisch A, Efficacy of flectron-eartags (cypermethrin) for control of midges (*Culicoides*) as the vectors of Bluetongue virus in cattle: Field studies and bioassays. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 115:220-230 (2008).
25. Papadopoulos E, Rowlinson M, Bartram D, Carpenter S, Mellor P and Wall R, Treatment of horses with cypermethrin against the biting flies *Culicoides nubeculosus*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Vet Par* 169:165-171 (2010).

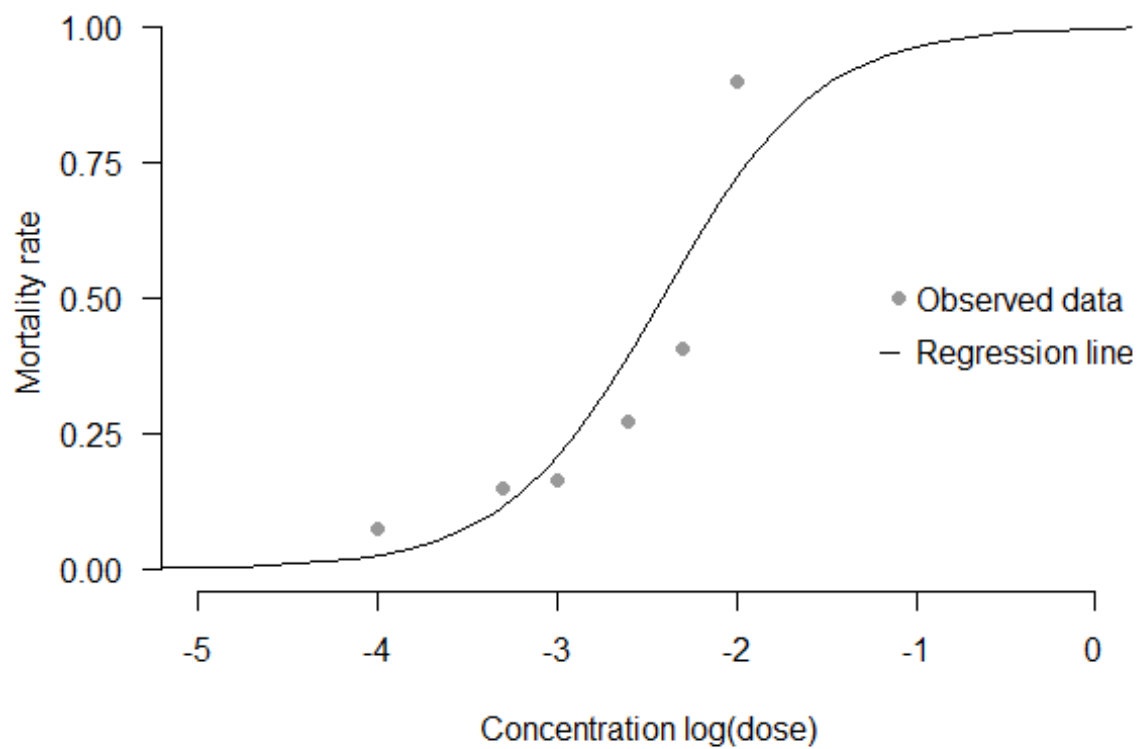
26. Page PC, Labuschagne K, Nurton JP, Venter GJ and Guthrie AJ, Duration of repellency of N,N-diethyl-3-methylbenzamide, citronella oil and cypermethrin against *Culicoides* species when applied to polyester mesh. *Vet Par* 163:105-109 (2009).
27. Calvete C, Estrada R, Miranda MA, del Río R, Borràs D, Beldron FJ, Martinez A, Calvo AJ and Lucientes J, Protection of livestock against Bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. *Med Vet Entomol* 24:169-175 (2010).
28. Holbrook FR, An overview of *Culicoides* control. *Progress in Clinical Biological Research* 178:607–609 (1985).
29. Mullens BA, In vitro assay for permethrin persistence and interference with blood-feeding of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) on animals. *J Am Mosq Control Assoc* 9:256–259 (1993).
30. Braverman Y, Wilamowsky A and Chizov-Ginzburg A, Susceptibility of *Culicoides imicola* to cyhalothrin. *Med Vet Entomol* 9:443–444 (1995).
31. Del Río R, Barceló C, Lucientes J and Miranda MA, Detrimental effect of cypermethrin treated nets on *Culicoides* populations (Diptera; Ceratopogonidae) and non-targeted fauna in livestock farms. *Vet Par DOI*: (2013).

## Tables

**Table 1.** Mortality rate (MR) and knock-down (KD) effect of different concentrations of cypermethrin assayed on nulliparous females of *C. obsoletus* under laboratory conditions.

Treatment (%)	N	MR (% +/- SD)		KD	MR
		1h	1-24h		
Control	155	0	1.8 ± 2.7	0	1.8 ± 2.7
0,0001	128	5.0 ± 6.3	2.7 ± 5.3	0	7.2 ± 5.5
0,0005	123	6.7 ± 9.5	9.3 ± 11.5	0	15.7 ± 12.1
0,001	114	11.5 ± 6.7	6.0 ± 7.4	0	16.9 ± 9.0
0,0025	109	19.0 ± 11.0	9.7 ± 11.2	8.1 ± 15.6	26.1 ± 15.6
0,005	116	34.7 ± 22.4	4.7 ± 5.9	23.8 ± 36.5	37.7 ± 20.8
0,01	149	79.9 ± 21.8	16.7 ± 25.8	8.0 ± 16.7	81.5 ± 21.1

## Figures



**Figure 1.** Sigmoidal dose-response curve of *Culicoides obsoletus* after 1h exposure to cypermethrin.

*Manuscrit #6* (soumis à Parasites & Vectors) :

## **Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): a multicentric study using a modified WHO standard assay**

Roger Venail<sup>1\*</sup>, Moussa Fall<sup>2</sup>, Ricardo del Río<sup>3</sup>, Sandra Talavera<sup>4</sup>, Karien Labuschagne<sup>5</sup>, Miguel Miranda<sup>3</sup>, Nonito Pagès<sup>4</sup>, Gert Venter<sup>5</sup>, Claire Garros<sup>6</sup>, Catherine Cêtre-Sossah<sup>6</sup>, Thomas Balenghien<sup>6</sup>, Simon Carpenter<sup>7</sup> and Thierry Baldet<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen (EID Med), Montpellier, France.

<sup>2</sup>Institut sénégalais de recherches agricoles (ISRA), Dakar, Senegal.

<sup>3</sup>Laboratory of Zoology, University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Spain.

<sup>4</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>5</sup>Agricultural Research Council – ARC- Onderstepoort Veterinary Institute, Onderstepoort, Republic of South Africa.

<sup>6</sup>Cirad, UMR15 CMAEE; INRA, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France.

<sup>7</sup>The Pirbright Institute, Vector-borne Viral Disease Programme, Woking, United Kingdom.

\* e-mail: [rvenail@yahoo.com](mailto:rvenail@yahoo.com)

### **Abstract**

**Background:** *Culicoides* biting midges are small dipterans involved in the transmission of various arboviruses that cause diseases of veterinary importance worldwide. Insecticides have been used against *Culicoides* although the scatter data available to demonstrate their efficiency. The assessment of the baseline intrinsic susceptibility of vector populations to insecticide remains a central phase in the insecticide resistance detection and monitoring which have been integrated in control programs. The objective of the present study was to work in a network using a standardized protocol to assess the susceptibility of different populations from two livestock associated *Culicoides* species to deltamethrin and permethrin (pyrethroids) active ingredients.

**Methods:** The insecticide susceptibility of *Culicoides obsoletus* from mainland France and Majorca (Balearic Island, Spain) and *Culicoides imicola* from France, Spain, Senegal and the Republic of South Africa were determined using a modified WHO (World Health Organisation) susceptibility assay adapted to *Culicoides*.

**Results/conclusions:** This multicentric study revealed that all the tested populations of *Culicoides* from Africa and Europe were very susceptible to the tested pyrethroid active ingredients. The gold standard insecticide, deltamethrin, was found to be more toxic than

permethrin. The data presented will be used as a reference in further studies of *Culicoides* control strategies and insecticide resistance detection and monitoring locally and/or across countries.

**Keywords** *Culicoides*, vector control, active ingredient efficiency

## **Background**

*Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) are small haematophagous insects implicated worldwide as primary biological vectors of arboviruses causing important diseases of livestock including bluetongue (BT), African horse sickness (AHS), epizootic haemorrhagic disease (EHD) and Schmallenberg disease (SB) [1]. These *Culicoides*-borne diseases have a severe economic impact through direct losses due to the morbidity and mortality that occurs in susceptible animals, but also because of the reduction in production of milk, wool and meat in affected animals. Additional losses also occur due to the imposition of animal movement restriction that affects animal trade [2, 3] and the cost of monitoring and surveillance. *Culicoides* are also extremely abundant in some areas inflicting nuisance on both humans and livestock, limiting tourism and producing allergic dermatitis in horses caused by their bites [4-6].

In the attempt to control *Culicoides*-borne diseases such as BT and AHS, several countries have implemented compulsory vaccination campaigns and livestock movement restrictions as first line of defence in affected regions [7]. Where safe and effective vaccines to *Culicoides*-borne viruses are either unavailable or absent, control measures against *Culicoides* populations have been recommended by veterinary authorities to reduce host-vector contact and thus decrease virus transmission.

The use of insecticide residual spraying within stables and during transport when livestock is moved outside a restriction area has been recommended only in protecting animals with high economic value (e.g. prize rams and racehorses). Additional physical measures have also been suggested to reduce *Culicoides* populations such as the mechanical removal and/or reduction of larval breeding sites on farms and housing livestock during high seasonal activity of *Culicoides* [8].

To date, no insecticidal products have been authorized specifically against *Culicoides*, although a wide range of products tested, licensed and in use against other arthropods of veterinary importance are available [8]. Worldwide, the most commonly method employed to protect livestock from *Culicoides* is the application of pour-on pyrethroid insecticides on ruminants [6]. While some effort has been made on assessing the efficiency of pour-on products, results vary greatly between studies [6] due to the different experimental designs. Methodologies used include the exposure of *Culicoides* to hair clippings from treated animals [9-11] or directly to treated animals [12] or even collecting *Culicoides* with insecticide mesh-

treated light traps close to animals [13-16]. The variability of results across studies highlights the importance of standardized methods to obtain comparable and reliable data.

Following EFSA's recommendations to assess susceptibility of *Culicoides* to insecticides using standardized procedures [8], recent studies have been performed using a modified World Health Organisation (WHO) standardized technique adapted to *Culicoides* [12, 17, 18]. This baseline information is essential in recommending the most effective insecticides and in detecting and monitoring the development of resistance. While insecticide resistance has not been documented in *Culicoides* to date, the risk of its development exists considering that the same products have been used on a wide scale for years on livestock to control other arthropods of veterinary interest as ticks, horn flies and stable flies, which could result in the selection of resistant insects as documented in the horn fly *Haematobia irritans irritans* [19].

As standardised information about the susceptibility of *Culicoides* to insecticides is lacking, this multicentric study aims to assess the susceptibility of *Culicoides* species of veterinary interest to deltamethrin and permethrin (two of the more frequently used insecticides in vector and pest control).

Bioassays were conducted against *Culicoides nubeculosus* Meigen, as the reference laboratory-reared species, and field-collected populations of two others *Culicoides* species of primary importance. Firstly, *Culicoides obsoletus* Meigen was tested as one of the most abundant livestock associated *Culicoides* species in Europe and because of its implication as main vector of BTV and SBV in this region [20]. Secondly, the major Afrotropical arbovirus vector *Culicoides imicola* Kieffer, were also tested due to its large distribution throughout Africa, Asia and Southern Europe and its important role in BTV transmission in the Mediterranean Basin [7].

The main objective of this study was to work in a network using a standardized protocol to determine baseline susceptibility of different *Culicoides* vector populations to the most commonly used pyrethroid insecticide active ingredients: deltamethrin and permethrin.

## Material and Methods

### ***Culicoides* collection and identification**

Susceptibility tests were performed on three *Culicoides* species: the laboratory reared species and two field collected species. The reference laboratory-reared *C. nubeculosus* specimens were provided from laboratory colony maintained in an insectary (temperature: 24°C ±1°C; relative humidity: 70 ±10%; light:dark: 12:12) at Cirad in Montpellier (France). This colony was established in 2012 from eggs and larvae provided by The Pirbright Institute in the framework of the FP7 EDENext European Project. Field populations of *C. obsoletus* and *C. imicola* were collected from several locations by different partners in two European countries (France, Spain) and two African countries (Senegal, South Africa) (Table 1). The site choice

was based on prior captures performed by partners. Collection sites are characterized by abundant populations of target species and the limited use of insecticides.

*Culicoides* were collected using a modified suction UV-light trap (OVI model, South Africa [21]). The collection beaker was replaced by a fine mesh netted cage to enable live collections. To prevent desiccation of insects during the collection period, wet absorbent paper was placed on aluminium foil and secured around the mesh cages. Traps were set before sunset and retrieved at dawn. *Culicoides* collection cages were stored in an isothermal container with an ice pack during transport to the test room.

Following insecticide trials, field-collected individuals were morphologically identified to species level [22] using a binocular microscope; the *Obsoletus* complex were further identified to species level using a diagnostic multiplex PCR [23].

### **Insecticide active ingredient and impregnated papers**

Deltamethrin and permethrin active ingredients were used at > 98% purity (Pestanal®, a registered trademark Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, London, UK). Test papers (Whatman n°1 filter paper, 90 g/m<sup>2</sup>, 12 x 15 cm) were impregnated following training provided by a WHO collaborative centre (LIN-IRD, France) to RV in order to ensure consistency and reduce possible bias. Papers were impregnated with insecticides active ingredients using an acetone-silicon mix as carrier agent (2 ml per paper, 67% acetone, and 33% silicone).

Control papers were impregnated with 2 ml of acetone-silicone mix only. As recommended by WHO [24], insecticide papers were impregnated few days before the test, wrapped in aluminium foil and kept at 4°C between uses and used no more than three times for any test.

### **Insecticide susceptibility tests**

Insecticide susceptibility tests were performed following the standardized WHO protocol for mosquito bioassay using test tubes [24] adapted for *Culicoides* [12, 17].

As insecticide susceptibility could be age specific [25, 26], and physiological status and gender dependant [27], to optimize the standardisation, bioassays were performed with 2-3 day old laboratory-reared *C. nubeculosus* unfed females. Due to the difficulties to obtain a F1 generation, adults collected from the field the night before the test were used for *C. obsoletus* and *C. imicola*. For field-collected *Culicoides*, only unfed females determined using abdominal pigmentation [28] were considered for data analysis.

*Culicoides* were exposed for 1h to insecticide-impregnated papers with different serial dilutions of insecticides (Table 2) and one control paper, in WHO insecticide exposure tubes. For each replicate carried out on field collected *Culicoides*, approximately 100 unsorted individuals were placed in each tube to obtain about at least 25 unfed females of the target population.

Following the one hour exposure period, all *Culicoides* were transferred with a motorised aspirator from exposure tubes to the observation tubes which were kept vertically for 24h, supplied with a 10 % sugar solution provided on cotton wool pads. The number of dead and live *Culicoides* was then recorded to assess the 24h mortality rate and the live individuals collected and conserved in ethanol 96%.



A complete series (replicate) was composed of serial dilutions and one negative control (untreated paper) and four replicates were performed for each active ingredient and target population. All tests were performed in rooms with temperatures of  $21\pm 3^{\circ}\text{C}$  and relative humidity of  $70\pm 10\%$ .

### Statistical analysis

Dose-response analysis for *Culicoides* mortality was performed following WHO recommendations [27]: mortality was calculated by pooling the total number of dead *Culicoides* across all replicates and expressed as a percentage of the total number of exposed individuals. The control mortality was used to validate the replicates and when control mortality was above 20% the replicate was discarded. When control mortality was between 5% and 20%, mortality was corrected using Abbott's method: corrected mortality =  $100 \times (\% \text{ observed mortality} - \% \text{ control mortality}) / (100 - \% \text{ control mortality})$  [29]. When control mortality was below 5%, no correction was performed. Data were analysed by a probit regression analysis [30] using PriProbit ver. 1.63 to obtain susceptibility values ( $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{90}$ ) and sigmoidal curves of dose-response estimations of each insecticide active ingredient for each target population.

A second insecticide susceptibility analysis was performed to determine the effect of species, origin (country and population), doses and their interactions, on the probability of *Culicoides* death following exposure. The two insecticide active ingredients were analysed separately as the tested doses were different. Initially, a generalised linear model with a binomial distribution was fitted leading to an over dispersion of data (goodness of fit,  $p < 0.05$ ). To assess the fixed effects (species and origin), the differences in deviation between the complete model (fixed effect: species, origin and doses without interaction) and the model without the fixed effect were calculated, taking into account the dispersion factor. R freeware (R Development Core Team 2012) and additional packages (aods3, lattice) were used for data analysis and graphics [31].

## Results

A total of 13,306 unfed females were used in bioassays, belonging to the reference laboratory-reared species and seven different field-collected populations: 3,994 *C. nubeculosus*, 5,423 *C. imicola* and 2,583 *C. obsoletus*. Among the 3,050 individuals collected belonging to the *Obsoletus* group: 2,583 (84.7%) were molecularly identified as *C. obsoletus*, 381 (12.5%) as *C. scoticus* Downes & Kettle and 86 specimens (2.8%) were not able to be identified and were discarded. Data analysis was performed with the molecularly confirmed *C. obsoletus*. Amongst the 1,803 individuals from *Obsoletus* group collected in Corrèze, France; 1,736 (96.3%) were identified as *C. obsoletus*, 64 (3.5%) as *C. scoticus* and 3 (0.2%) were unidentified; from the 543 individuals collected in Mallorca Island, Spain, 513 (94.5%) were identified as *C. obsoletus*, 3 (0.5%) as *C. scoticus* and 27 (5%) were unidentified, and from the 704 individuals collected in Catalonia, Spain, 334 (47.4%) were identified as *C. obsoletus*, 314 (44.6%) as *C. scoticus* and 56 (8%) unidentified. The proportion of *C. obsoletus* in the

bioassays performed in Catalonia was medium and variable depending on the concentrations and did not allow to conduct a proper analysis of the mortality specific to this species in contrast to the two other populations (mainland France, Mallorca) where *C. obsoletus* was predominant and constant. Thus, the population of *C. obsoletus* from Catalonia was discarded.

Mortality recorded 24h after 1h exposure to insecticide active ingredients indicated that all tested populations were susceptible to deltamethrin and permethrin. The lethal concentrations LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> (susceptibility values) calculated by probit analysis are presented in percentage of active ingredient/surface (Table 23) and in its equivalent in mg/m<sup>2</sup> (Table 4). Deltamethrin active ingredient was found to be more toxic to all the tested populations (left sided red sigmoidal curves in Figure 1) than permethrin (right sided green curves in Figure 1).

The sigmoidal curves from the same active ingredient (same colour in Figure 1) are grouped together which could be interpreted as the tested populations have similar responses to the same insecticide. In addition, the statistical analysis showed that the variable “species” have no significant effect neither in deltamethrin ( $p = 0.98$ ) nor permethrin ( $p = 0.16$ ) results, more clearly, it can be considered that the three tested species responded similarly to each of the two pyrethroid insecticides. In contrast, when the effect of the variable “origin” (country) was tested, it was found a significant effect in deltamethrin ( $p=7e-4$ ) and permethrin ( $p=5e-3$ ) results. In fact, the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values of field-collected *Culicoides* populations from France to deltamethrin were lower than those from other countries (Tables 3 and 4). When the effect of the variable origin (population) was tested, a significant effect was evidenced in deltamethrin ( $p=3e-5$ ) and permethrin ( $p=4e-3$ ) responses. Indeed, the French population of *C. obsoletus* and the Senegal population of *C. imicola* elicited the lower LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> to deltamethrin and permethrin respectively (Figure 2 and Figure 3).

The similar steeper slope of sigmoidal curves (Figure 1), and the equivalent small gap between LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> either for deltamethrin and permethrin (Figure 2 and Figure 3), evidenced the efficacy of pyrethroids to induce higher mortality by a slightly increase in the dose, demonstrating that results obtained were consistent. Despite the general robustness and low variability of the response within each population against each active ingredient, which can be traduced from the small size of gaps between lower and upper 95% confidence intervals (95% CI) (length of LC lines in Figure 2 and Figure 3), the results of *C. obsoletus* population in the Mallorca Island were highly variable.

## Discussion

This multicentric study represents the first assessment of the insecticide susceptibility of *Culicoides* species of veterinary interest in a wide scale across countries and continents working in network, using the same experimental design and providing robust, reliable and comparable data, which may be used to establish the baseline concentrations to the most commonly used pyrethroid insecticide active ingredients (deltamethrin and permethrin) for subsequent susceptibility testing of field populations. Such basic information is required to

guide insecticide use in disease control programs: for selecting insecticide(s) and for ascertaining continued susceptibility of target insect species to and efficacy of insecticides in use, in particular regarding the potential development of insecticide resistance.

All the *Culicoides* populations tested in this study were susceptible to deltamethrin and permethrin active ingredients, which was documented previously using the same WHO test method [12, 18, 32, 33] and also using the wind tunnel method [34-36]. Deltamethrin showed higher toxicity against all the *Culicoides* populations tested than permethrin, which was previously documented in mosquitoes [37]. It is well known that synthetic 2nd generation type II  $\alpha$ -cyano pyrethroid insecticides as deltamethrin and cypermethrin were more efficient/toxic than 1st generation type I (without an  $\alpha$ -cyano, providing less stability) as permethrin, bifenthrin and tetramethrin [27, 38, 39].

This multicentric study, conducted on a larger scale with different *Culicoides* populations, allowed to confirmed that the recently established diagnostic doses of the two commonly used synthetic pyrethroids, deltamethrin (0.03%) and permethrin (2.65%), using the reference laboratory reared *C. nubeculosus* [17] are an excellent means of resistance detection and survey. This kind of multicentric bio-assay was conducted in Ivory Coast to assess the geographical distribution of resistance of *Anopheles gambiae* populations to deltamethrin and permethrin [40].

While not resistance of any *Culicoides* population investigated in the current study was evidence, low variability between results was observed. The bioassays conditions were slightly different depending on the country, the collection site, the laboratory and the person that performed the test, which may explain this susceptibility variability. Multicentric insecticide bioassays are subjected to extrinsic factors that can influence results, misleading the real effect of an insecticide to a given population. Some factors can be controlled like test room temperature and humidity during the test, and also the origin of impregnated papers and the use procedure standardisation as made in this study. Unfortunately, other factors cannot be controlled as the temperature during collection over the night, usually cooler than the test room. This change of temperature could affect the response of *Culicoides* to insecticides as recently observed in *Anopheles stephensi* exposed to permethrin by changing the temperature before and during the test [41]. This point highlights the complexity of field-based trials and the importance of reducing bias to obtain reliable data.

Given that insecticides, and particularly pyrethroids, have been used for decades in farms for the control of pests in agriculture [42] and vectors of veterinary interest as ticks, mites and biting flies [43], this could provide additional selection pressure and could lead the development of resistance mechanism to insecticide in *Culicoides* populations, which require particular monitoring [27]. Establishing a baseline insecticide discriminating dose is crucial for determining susceptibility status and changing temporal patterns of physiological response over time in insect populations. Most insecticides used for the control of *Anopheles* malaria vectors and *Aedes* dengue vectors have well established and recommended discriminating concentrations (diagnostic doses) for routine monitoring of vector populations. The discriminating concentrations for mosquitoes were defined as 0.05% of deltamethrin and 0.75% of permethrin [24, 27, 44-46]. The monitoring of resistance of malaria vector to

pyrethroids has been performed in Africa and permitted to reveal that resistance is clearly widespread across the continent, highlighting the limitations of previous control measures and also the importance of encouraging alternative methods rather than insecticides [47].

Local baseline data and its monitoring over time throughout the year are needed to assess early detection and temporal trends in resistance in such broadly distributed species as *C. imicola* and *C. obsoletus*, as each site has its own specific context and historical use of insecticides. Broad scale data is also needed to provide information about geographical detection, distribution (aims of the present study) and surveillance of insecticide resistance (next studies).

In conclusion, this study has defined the baseline susceptibility of seven field collected different *Culicoides* populations across countries in Europe and Africa, that confirmed the baseline diagnostic concentrations for the two most commonly used pyrethroid active ingredients (deltamethrin and permethrin), which could be used in further studies in the detection and monitoring of resistance to these insecticides. The susceptibility values may also be used to evaluate in the field the efficiency of insecticidal products against local *Culicoides* populations.

## **Acknowledgments**

This study was funded by EU grant FP7-261504 and is catalogued by the EDENext steering committee as EDENext manuscript # XXXX. (<http://www.edenext.eu>).

The authors are grateful to farmers: Jacques Virolles and family (Corrèze, France), Albert Jungen and family (Corsica, France), Joan Capó and family (Catalonia, Spain), Andreu Cosme Oliver Ramón and family (Mallorca Island, Spain), Samba Coura Diop and family (Rufisque, Senegal) and the ARC-OVI and OBP (Onderstepoort Biological Products) (Pretoria, South Africa), who permit us to enter in their farms and making there stables available for *Culicoides* collection. Authors are also grateful to Laëtitia Gardès, Johnathan Lhoir, Xavier Allène, Ignace Rakotoarivony from Cirad (France), Bethasabée Scheid, Marie Laure Setier-Rio from EID-Med (France) and Lassana Konaté from LEVP/UCAD (Senegal) for technical help.

## **Author contribution**

RV, ThiB, ThoB, SC designed the study.

RV, MF, RdR, ST, KL, NP, GV carried out the bioassays.

RV, ThiB, ThoB analysed the data.

RV, ThiB, ThoB, SC wrote the manuscript, which was revised by all the authors.

All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Carpenter S, Groschup MH, Garros C, Felipe-Bauer ML, Purse BV: *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res* 2013, 100:102-113.
2. Sinclair M, Bührmann G, Gummow B: An epidemiological investigation of the African horsesickness outbreak in the Western Cape Province of South Africa in 2004 and its relevance to the current equine export protocol. *J S Afr Vet Assoc* 2006, 77:191-196.
3. Hoogendam K: International study on the economic consequences of outbreaks of bluetongue serotype 8 in north-western Europe. University of Van Hall-Larenstein, 2007.
4. Riek RF: Studies on Allergic Dermatitis (“queensland Itch”) of the Horse. *Australian Veterinary Journal* 1953, 29:177-184.
5. Anderson GS, Belton P, Kleider N: The Hypersensitivity of Horses to *Culicoides* Bites in British Columbia. *Can Vet J* 1988, 29:718-723.
6. Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ: Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. *Med Vet Entomol* 2008, 22:175-187.
7. Savini G, al e: Vaccines against bluetongue in Europe. 2007.
8. EFSA: Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission (DG SANCO) on Bluetongue. *The EFSA Journal* 2008, 735:1-69.
9. Schmahl G, Walldorf V, Klimpel S, Al-Quraishy S, Mehlhorn H: Efficiency of Oxyfly on *Culicoides* species -the vectors of Bluetongue virus- and other insects. *Parasitol Res* 2008, 103:1101-1103.
10. Mehlhorn H, Schmahl G, D'Haese J, Schumacher B: Butox ® 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitol Res* 2008, 102:515-518.
11. Papadopoulos E, Bartram D, Carpenter S, Mellor PS, Wall R: Efficacy of alphacypermethrin applied to cattle and sheep against the biting midge *Culicoides nubeculosus*. *Vet Parasitol* 2009, 163:110-114.

12. Venail R, Mathieu B, Setier-Rio ML, Borba C, Alexandre M, Viudes G, Garros C, Allene X, Carpenter S, Baldet T, Balenghien T: Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. *J Med Entomol* 2011, 48:351-357.
13. Bauer B, Jandowsky A, Schein E, Mehlitz D, Clausen PH: An appraisal of current and new techniques intended to protect bulls against *Culicoides* and other haematophagous nematocera: the case of Schmergow, Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 2009, 105:359-365.
14. Venter GJ, Labuschagne K, Boikanyo SNB, Morey L, Snyman MG: The repellent effect of organic fatty acids on *Culicoides* midges as determined with suction light traps in South Africa. *Vet Parasitol* 2011, 181:365-369.
15. Del Rio R, Barceló C, Lucientes J, Miranda MA: Detrimental effect of cypermethrin treated nets on *Culicoides* populations (Diptera; Ceratopogonidae) and non-targeted fauna in livestock farms. *Vet Parasitol* 2014, 199:230-234.
16. Page PC, Labuschagne K, Venter GJ, Schoeman JP, Guthrie AJ: Field and in vitro insecticidal efficacy of alphacypermethrin-treated high density polyethylene mesh against *Culicoides* biting midges in South Africa. *Vet Parasitol* 2014, 203:184-188.
17. Venail R, Lhoir J, Rakotoarivony I, Allène X, Setier-Rio ML, Scheid B, Gardès L, Gosset A, Lancelot R, Gimonneau G, et al: Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in France. *PLoS ONE*, in press.
18. Del Rio R, Venail R, Calvete C, Barceló C, Baldet T, Lucientes J, Miranda MA: Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test. *Parasitology* 2014, 141:542-546.
19. Oyarzún MP, Quiroz A, Birkett MA: Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Med Vet Entomol* 2008, 22:188-202.
20. Lehmann K, Werner D, Hoffmann B, Kampen H: PCR identification of culicoid biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the *Obsoletus* complex including putative vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses. *Parasit Vectors* 2012, 5:213.
21. Venter GJ, Labuschagne K, Hermanides KG, Boikanyo SNB, Majatladi DM, Morey L: Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Vet Parasitol* 2009, 166:299-307.
22. Delécolle JC, De La Rocque S: 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). *Bull Soc Entomol Fr* 2002, 107:371-379.
23. Nolan V, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas J, Mordue JA, Piertney SB: Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris*

species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol* 2007, 124:82-94.

24. WHO: Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: mimeographed document (WHO/VBC/81.810). In Book Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: mimeographed document (WHO/VBC/81.810) World Health Organization 1981.

25. Rajatileka S, Burhani J, Ranson H: Mosquito age and susceptibility to insecticides. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011, 105:247-253.

26. Chareonviriyaphap T, Kongmee M, Bangs MJ, Sathantriphop S, Meunworn V, Parbaripai A, Suwonkerd W, Akwatanakul P: Influence of nutritional and physiological status on behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to deltamethrin and cypermethrin. *J Vector Ecol* 2006, 31:89-101.

27. WHO: Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. In Book Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes (Editor ed.^eds.). City: World Health Organization 2013.

28. Dyce A: The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Aust J Entomol* 1969, 8:11-15.

29. Abbott WS: A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 1925, 18:265-267.

30. Finney D: Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Oxford, England: Macmillan; 1947.

31. Team RDC: R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. In Book R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org> (Editor ed.^eds.). City: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2013.

32. Braverman Y, Wilamowsky A, Chizov-Ginzburg A: Susceptibility of *Culicoides imicola* to cyhalothrin. *Med Vet Entomol* 1995, 9:443-444.

33. Braverman Y, Chizov-Ginzburg A, Perner H, Wilamowski A: Susceptibility and repellency of *Culicoides imicola* and *Culex pipiens* to lambda-cyhalothrin. *Vet Ital* 2004, 40:336-339.

34. Kline D, Haile D, Baldwin K: Wind tunnel tests with seven insecticides against adult *Culicoides mississippiensis* Hoffman. *Mosq News* 1981, 41:745-747.

35. Floore T: Laboratory wind tunnel tests of nine insecticides against adult *Culicoides* species. Fla Entomol 1985, 68:678-682.
36. Holbrook FR: Wind tunnel evaluations of insecticides applied to colonized *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). J Fla Anti-Mosq Assoc 1986, 57:1-3.
37. Mosha F, Lyimo I, Oxborough R, Matowo J, Malima R, Feston E, Mndeme R, Tenu F, Kulkarni M, Maxwell C, et al: Comparative efficacies of permethrin-, deltamethrin- and alpha-cypermethrin-treated nets, against *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in northern Tanzania. Ann Trop Med Parasitol 2008, 102:367-376.
38. Soderlund D, Clark J, Sheets L, Mullin L, Piccirillo V, Sargent D, Stevens J, Weiner M: Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology 2002, 171:3-59.
39. Soderlund D: Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Arch Toxicol 2012, 86:165-181.
40. Darriet F: The impact of permethrin and deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae* s.s. on the efficacy of insecticide-treated mosquito nets. [Geneva, Switzerland]: World Health Organization; 1998.
41. Glunt KD, Paaijmans KP, Read AF, Thomas MB: Environmental temperatures significantly change the impact of insecticides measured using WHOPES protocols. Malar J 2014, 13.
42. Oerke EC: Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science 2006, 144:31-43.
43. Walker AR: Ticks and associated diseases: a retrospective review. Med Vet Entomol 2014.
44. WHO: Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides. Tenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organ Tech Rep Ser 1986, 737:1-87.
45. WHO: Vector resistance to pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organ Tech Rep Ser 1992, 818:1-62.
46. WHO | Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces (archived) [[http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who\\_cds\\_cpc\\_mal\\_98\\_12/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpc_mal_98_12/en/)]
47. Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V: Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? Trends Parasitol 2011, 27:91-98.





## Tables

**Table 1 Origin of *Culicoides* tested populations and date of collection**

Species	Origin		Date of collection
	Country	Location	
<i>Culicoides nubeculosus</i>	France	Cirad colony, Montpellier	
<i>Culicoides imicola</i>	France	Piannotoli Caldareello, Corsica Island	08/2012, 09/2013
	Spain	Caldes de Malavella, Catalonia	09/2012
	Senegal	Niague, Rufisque	03/2013, 02/2014
	South Africa	ARC-OVI Institute, Pretoria	06/2010
<i>Culicoides obsoletus</i>	France	Peret–Bel-Air, Corrèze	06/2012, 06/2013
	Spain	Susqueda, Catalonia	09/2010
	Spain	Felanitx, Mallorca Island	06/2013

**Table 2 Concentrations in percentage of deltamethrin and permethrin active ingredients used to assess the insecticide susceptibility of different populations of *Culicoides***

Species	Origin (Country)	Deltamethrin	Permethrin
<i>Culicoides nubeculosus</i>	CIRAD colony (France)	0.0001, 0.0005, 0.00075, 0.001, 0.002, 0.003	0.05, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2
<i>Culicoides imicola</i>	Corsica Island (France)	0.0001, 0.0005, 0.00075, 0.001, 0.002, 0.003	0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4
	Catalonia (Spain)	0.0001, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.003, 0.005	0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1
	Pretoria (South Africa)	0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01	
	Rufisque (Senegal)	0.00025, 0.0005, 0.00075, 0.001, 0.002, 0.003	0.001, 0.003, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.02, 0.04
<i>Culicoides obsoletus</i>	Corrèze (France)	0.0001, 0.00025, 0.0005, 0.001, 0.00125, 0.002, 0.003, 0.005	0.01, 0.02, 0.04, 0.08
	Mallorca Island (Spain)	0.0001, 0.0002, 0.0003, 0.0005, 0.001, 0.003	0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08

**Table 3 Susceptibility values (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, expressed in % of active ingredient.) of different populations of *Culicoides* to deltamethrin and permethrin active ingredients: mortality recorded 24 h after 1h exposure to different concentrations**

Species	Origin (Country)	Deltamethrin			Permethrin		
		No. test (n)	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>90</sub> (95% CI)	No. test (n)	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>90</sub> (95% CI)
<i>Culicoides nubeculosus</i>	CIRAD colony (France)	4	0.0003	0.0019	3	0.0102	0.1045
		(1,940)	(0.0001-0.0004)	(0.0012-0.0043)	(2,054)	(0.0080-0.0117)	(0.0849-0.1337)
<i>Culicoides imicola</i>	Corsica Island (France)	3	0.0002	0.0008	4	0.0194	0.0812
		(2,283)	(0.0001-0.0002)	(0.0005-0.0014)	(1,369)	(0.0171-0.0219)	(0.0695-0.0975)
	Catalonia (Spain)	3	0.0003	0.0023	2	0.0175	0.1071
	(378)	(0.0002-0.0004)	(0.0016-0.0037)	(123)	NA	NA	
	Pretoria (South Africa)	3	0.0003	0.0020			
(291)	NA	NA					
Rufisque (Senegal)	4	0.0005	0.0015	3	0.0031	0.0168	
(458)	(0.0004-0.0005)	(0.0012-0.0018)	(521)	(0.0018-0.0045)	(0.01048-0.0431)		
<i>Culicoides obsoletus</i>	Corrèze (France)	3	0.0001	0.0008	2	0.0207	0.0668
		(1,304)	(0.0000-0.0002)	(0.0005-0.0018)	(432)	(0.0188-0.0229)	(0.0565-0.0822)
	Mallorca Island (Spain)	4	0.0005	0.0032	4	0.0147	0.0840
(382)	(0.0002-0.0011)	(0.0013-0.1246)	(131)	(0.0101-0.0203)	(0.0502-0.2445)		

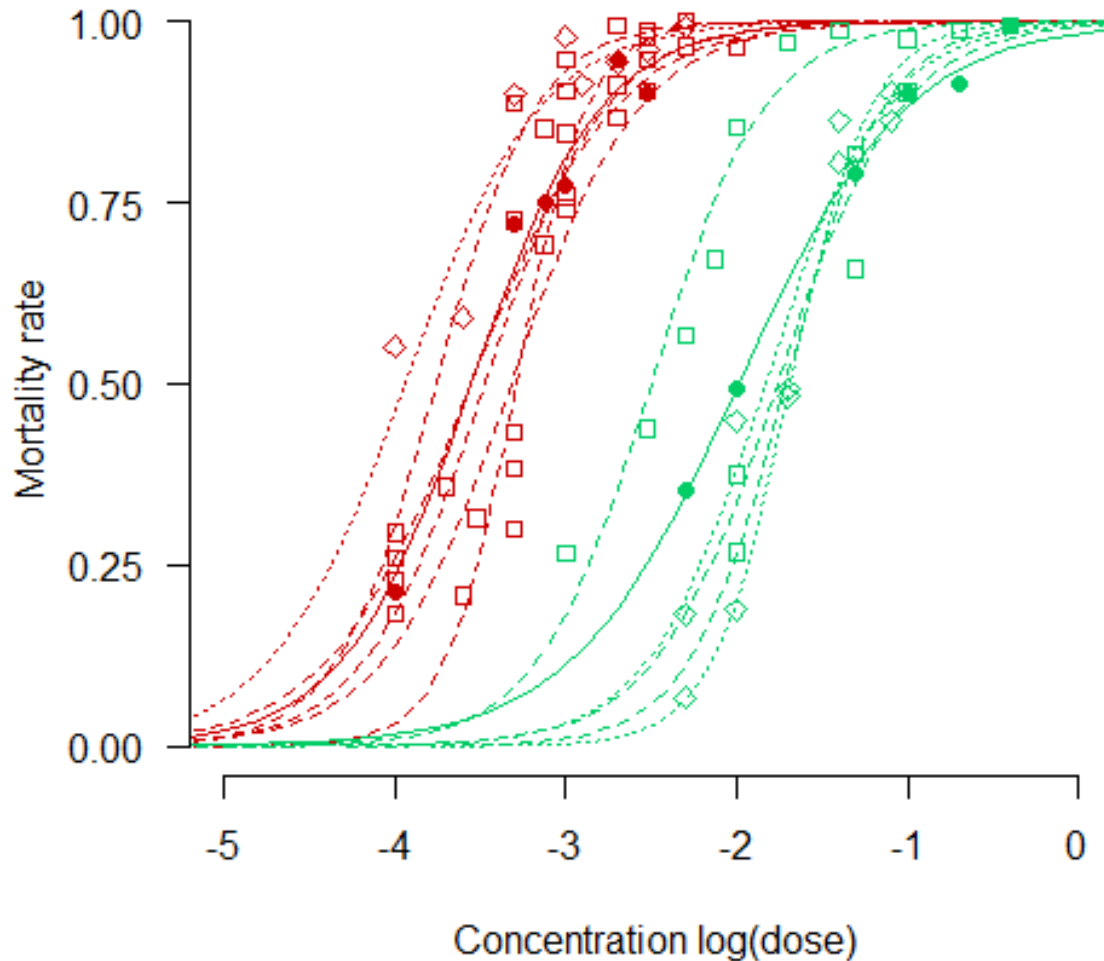
No. test = number of test performed. *n* = number of individual tested. 95% CI = 95% confidence interval, NA = confidence interval not computed, due to a large variability in the dose/response effect.

**Table 4 Susceptibility values (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, expressed in mg/m<sup>2</sup> of active ingredient.) of different populations of *Culicoides* to deltamethrin and permethrin active ingredients: mortality recorded 24 h after 1h exposure to different concentrations**

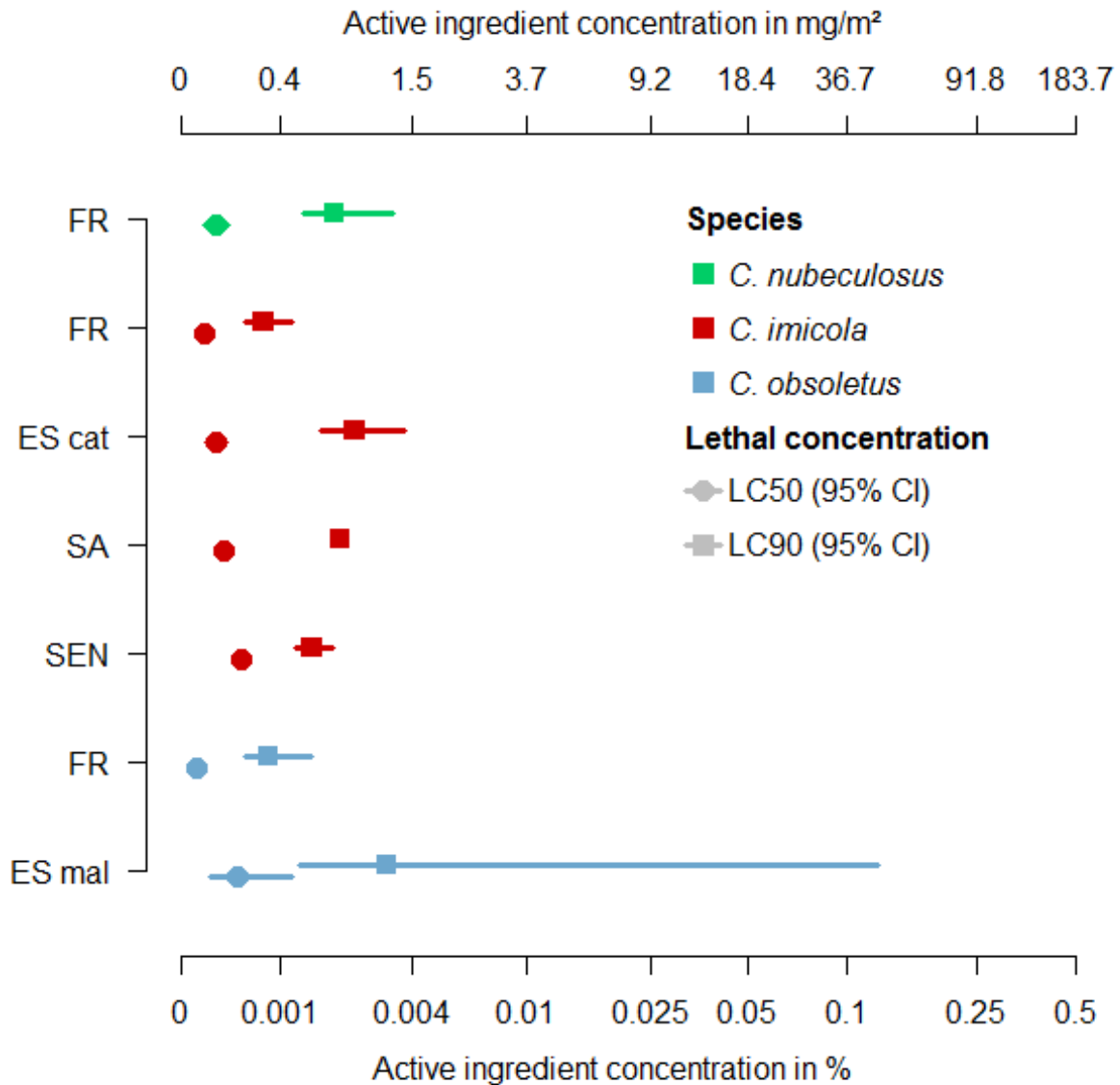
Species	Origin (Country)	Deltamethrin			Permethrin		
		No. test (n)	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>90</sub> (95% CI)	No. test (n)	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>90</sub> (95% CI)
<i>Culicoides nubeculosus</i>	CIRAD colony (France)	4	0.10	0.69	3	3.75	38.39
		(1,940)	(0.05-0.15)	(0.45-1.59)	(2,054)	(3.23-4.28)	(31.19-49.11)
<i>Culicoides imicola</i>	Corsica Island (France)	3	0.06	0.28	4	7.14	29.84
		(2,283)	(0.04-0.09)	(0.19-0.49)	(1,369)	(6.29-8.04)	(25.54-35.81)
	Catalonia (Spain)	3	0.11	0.84	2	6.43	39.34
		(378)	(0.07-0.15)	(0.59-1.36)	(123)	NA	NA
	Pretoria (South Africa)	3	0.11	0.73			
	(291)	NA	NA				
	Rufisque (Senegal)	4	0.17	0.55	3	1.14	6.17
		(458)	(0.15-0.18)	(0.44-0.66)	(521)	(0.66-1.65)	(3.85-15.83)
<i>Culicoides obsoletus</i>	Corrèze (France)	3	0.04	0.30	2	7.62	24.53
		(1,304)	(0.01-0.07)	(0.19-0.37)	(432)	(6.91-8.42)	(20.75-30.21)
	Mallorca Island (Spain)	4	0.18	1.18	4	5.40	30.86
		(382)	(0.07-0.40)	(0.48-45.77)	(131)	(3.71-7.46)	(18.44-89.81)

No. test = number of test performed. *n* = number of individual tested. 95% CI = 95% confidence interval, NA = confidence interval not computed, due to a large variability in the dose/response effect.

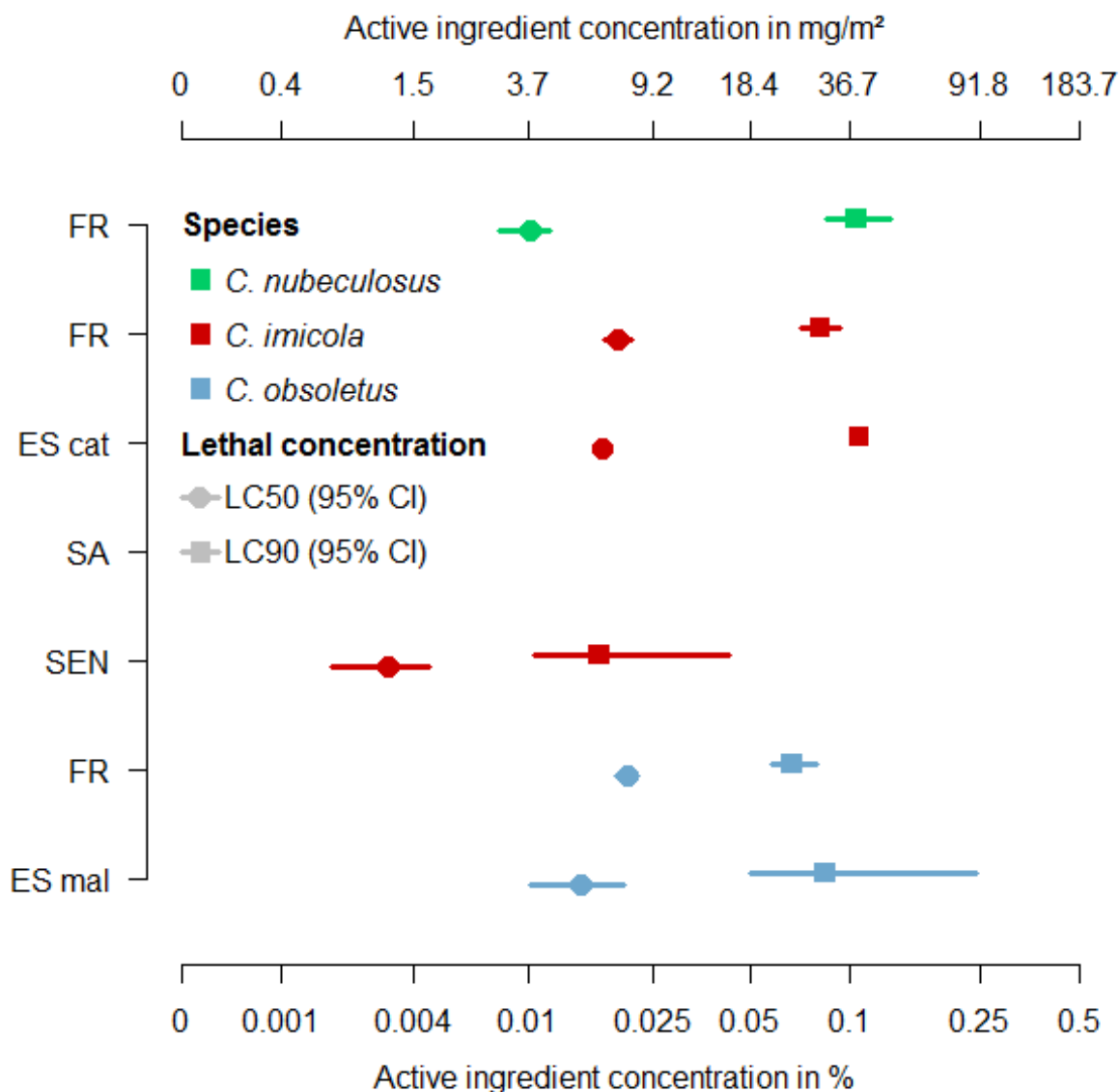
## Figures



**Figure 1 Overview of sigmoidal dose-response curves of different populations of *Culicoides* exposed to deltamethrin (red) and permethrin (green) active ingredients: dots represent observed data and lines represent the logistic regression line of each population for each active ingredient (solid lines: *C. nubeculosus* and dotted lines: *C. obsoletus* and *C. imicola*) calculated with PriProbit ver. 1.63, based on the mortality recorded at 24 h after 1h exposure to different concentrations.**



**Figure 2** Lethal concentrations  $LC_{50}$ ,  $LC_{90}$  and 95% confidence intervals for different populations of *Culicoides* exposed to deltamethrin. FR: France, ES cat: Catalonia, Spain, SA: South Africa, SEN: Senegal and ES mal: Mallorca Island, Spain. Lethal concentrations were calculated with PriProbit ver. 1.63, based on the mortality recorded at 24 h after 1h exposure to different concentrations.



**Figure 3** Lethal concentrations LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> and 95% confidence intervals for different populations of *Culicoides* exposed to permethrin. FR: France, ES cat: Catalonia, Spain, SA: South Africa, SEN: Senegal and ES mal: Mallorca Island, Spain. Lethal concentrations were calculated with PriProbit ver. 1.63, based on the mortality recorded at 24 h after 1h exposure to different concentrations.



## Discussion du chapitre 2

---

Les études menées avaient comme objectif de **déterminer la sensibilité des principales espèces de *Culicoides* d'importance vétérinaire en Europe aux substances actives insecticides**. Nos travaux établissent pour la première fois des valeurs de sensibilité de référence de différentes populations de *C. obsoletus* en France et en Espagne et de *C. imicola* en France, en Espagne, au Sénégal et en Afrique du Sud à la deltaméthrine et à la perméthrine.

Malgré la levée de nombreux obstacles méthodologiques, certaines difficultés persistent. D'abord, la réussite de la mise en élevage d'une seule espèce paléarctique, dont l'implication dans la transmission de pathogènes reste encore à prouver, impose une extrapolation des résultats pour les populations sauvages des espèces d'intérêt. Cette souche, *C. nubeculosus*, reste très adaptée à la manipulation en laboratoire et est un excellent outil de travail : les individus supportent la manipulation et sont de grande taille. La mise en élevage d'une souche de référence pour une espèce d'intérêt vétérinaire serait une grande avancée. La capture d'un grand nombre de *Culicoides* sauvages peut être entravée par la saisonnalité des espèces et les conditions météorologiques au moment des piégeages. En effet, cette abondance peut être largement impactée en présence de pluie, de vent ou de températures fraîches. De plus, la diversité d'espèces présente en un site est généralement importante et nécessite donc des prospections préalables pour s'assurer que l'espèce cible soit majoritairement représentée. Les temps d'identification des individus après les essais sont trop longs. L'analyse de la dynamique spatiale et temporelle des populations de *Culicoides* en France (*Manuscrit #1*) a permis de programmer les campagnes de piégeages pour les tests de sensibilité insecticide au moment des pics d'abondance dans les sites où les espèces ciblées sont prépondérantes. De plus, il est impossible de standardiser l'âge des adultes collectés lors des piégeages dans les populations sauvages. Sachant que la sensibilité dépend de l'âge, du stade physiologique et du sexe (WHO, 2013), seules les femelles nullipares (à l'abdomen non pigmenté) et non gorgées ont été incluses dans les analyses. Enfin, l'absence quasi-totale de données de sensibilité de base a rendu laborieuse la mise au point des gammes de concentrations.

Les modifications techniques apportées au test original OMS développé pour les moustiques ont été indispensables pour une utilisation avec les *Culicoides*. Cependant, ces modifications sont mineures et les tests réalisés sur *Culicoides* continuent de respecter les grandes lignes des recommandations publiées par l'OMS pour déterminer la sensibilité aux insecticides des insectes d'intérêt.

Les valeurs de sensibilité obtenues dans ces études démontrent que la population de l'espèce de référence *C. nubeculosus* entretenue en élevage et les différentes populations sauvages de *C. obsoletus* et *C. imicola* sont sensibles aux 7 substances actives testées : l'alpha-cyperméthrine, la cyperméthrine, la deltaméthrine et la perméthrine appartenant à la famille des pyréthrinoïdes et le chlorpyrifos-méthyl, le diazinon et le phoxime de la famille

des organophosphorés. Les populations de *Culicoides* testées sont plus sensibles aux pyréthriinoïdes, classe d'insecticides développée plus récemment que les organophosphorés, ce qui est aussi observé chez les moustiques (Bansal and Singh, 2004 ; Mosha *et al.*, 2008 ; Juntarajumnong *et al.*, 2012). Aussi, nous confirmons que les pyréthriinoïdes de 2<sup>e</sup> génération de type II, l'alpha-cyperméthrine et la deltaméthrine, sont parmi les substances actives les plus toxiques contre les *Culicoides*, ceci étant aussi observé chez les moustiques (WHO, 2013). Parmi les substances actives autorisées en Europe dans le contexte vétérinaire, la deltaméthrine apparaît donc comme la plus toxique.

Nos résultats à partir des tubes OMS ne mettent pas en évidence de phénomènes de résistance aux pyréthriinoïdes et aux organophosphorés dans les populations testées.

## **Chapitre 3 :**

**Comment évaluer l'efficacité des produits insecticides appliqués directement sur les animaux et des répulsifs contre les *Culicoides* ?**



## Introduction du chapitre 3

---

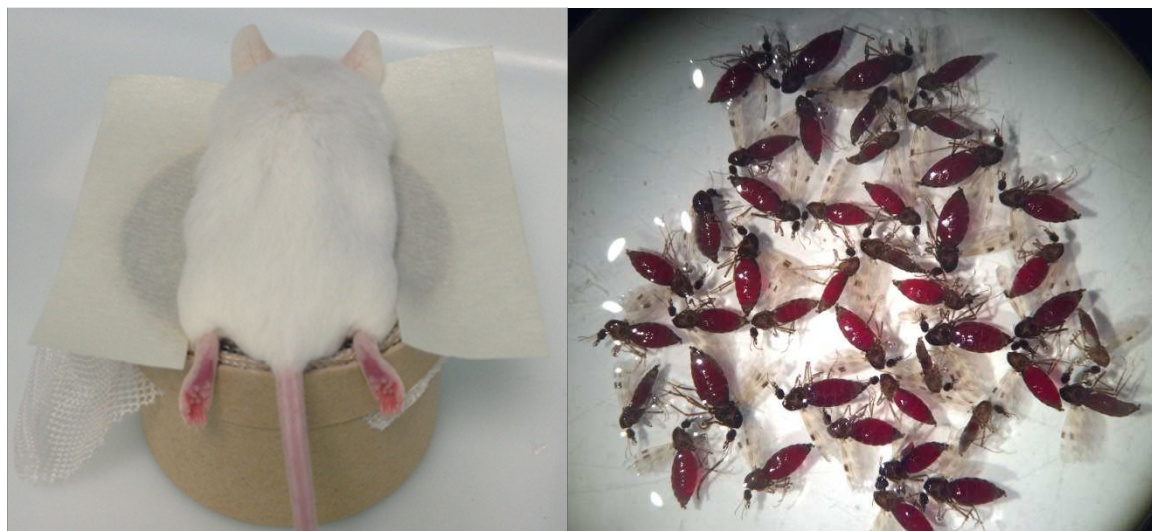
Suite à l'émergence soudaine de la FCO en 2006 en Europe, l'évaluation de l'efficacité des traitements insecticides et répulsifs devint une priorité au niveau européen. Plusieurs essais ont été menés à ce propos. C'est ainsi que quelques produits commercialisés pour le traitement des animaux, recommandés par les autorités européennes afin de contrôler la maladie, ont été étudiés. Leur efficacité a été généralement évaluée suivant le même schéma : les animaux sont traités sur le terrain avec les produits à tester, puis quelques poils sont coupés et transportés au laboratoire, où finalement ils sont mis en contact avec des *Culicoides*. Après un premier contact de quelques minutes, les poils sont placés dans un sac plastique hermétique et stockés à 4°C et la mortalité est enregistrée. Quelques jours plus tard, les poils sont sortis du réfrigérateur et remis en contact avec les *Culicoides*. C'est ainsi que la persistance des formulations a été évaluée pour plus de 10 produits commercialisés. En utilisant cette méthode, tous les produits testés que nous avons répertoriés ont montré d'excellentes performances, allant jusqu'à 100% de mortalité à 35 jours après le traitement de bovins et ovins avec Butox 7.5 en *pour-on* (7.5 g de deltaméthrine/l) (Schmahl *et al.*, 2009a). Le stockage à froid des produits insecticides comme les papiers imprégnés, est préconisé par l'OMS pour conserver leur efficacité pendant des semaines voire des mois (WHO, 1981). Ceci expliquerait les persistances observées dans ces études.

Dans une étude menée en Australie quelques années auparavant, les animaux avaient été traités avec des avermectines (anti-parasitaire injectable en sous-cutané) et leur efficacité et persistance évaluées en exposant les *Culicoides* directement sur le corps de l'animal traité. Après une exposition de 30 minutes à l'oreille de l'animal, la mortalité a été enregistrée, puis les animaux ont été placés dans des enclos, séparant témoins et traités pour éviter des contaminations. Les expositions ont été répétées tous les jours pendant une vingtaine de jours et il a été observé que le traitement était très efficace avec 70-100 % de mortalité les premiers jours, puis 50 % à 10 jours, moins de 20 % à 15 jours et inférieur à 10 % 18 jours après le traitement (Standfast *et al.*, 1984). Cette méthode d'exposition directe des *Culicoides* à l'animal (conditions plus réelles et moins artificielles que les poils stockés au froid), a permis de mettre en évidence une perte d'efficacité dans le temps des avermectines, se traduisant en une persistance inférieure à celles observées avec les formulations d'application cutanée.

Confrontés à ce contraste, nous avons choisi d'évaluer l'efficacité de la formulation topique plus utilisée en Europe, le Butox 7.5 en *pour-on*, en exposant les *Culicoides* directement à l'animal traité. Cette méthode avait déjà été utilisée auparavant pour tester l'effet répulsif d'autres formulations (Reeves *et al.*, 2010). Ainsi, nous avons traité des ovins avec la dose préconisée par le fabricant (10 ml sur le dos) puis nous avons exposé les *Culicoides* pendant 3 minutes à la partie antérieure de la cuisse de l'animal traité (Figure 2.2 page 79), nous avons enregistré la mortalité et nous avons répété les contacts pendant plusieurs jours. Cette étude, réalisée en dehors de ce travail de thèse, est incluse dans cette thèse car elle nous a permis d'avoir des bases conceptuelles et méthodologiques. La mise en place de ce type d'étude a nécessité d'importants moyens tels qu'un élevage avec des

animaux où le traitement insecticide soit autorisé et à proximité de l'insectarium où sont élevés les *Culicoides*.

Limités par ces difficultés logistiques, nous avons tenté, en laboratoire, d'évaluer l'efficacité des formulations en utilisant la procédure de référence de l'OMS, le test en cage, où les moustiques maintenus en cage sont mis en présence d'un animal traité (lapin ou cobaye). Comme le repas de *C. nubeculosus* d'élevage était assuré sur souris avant de passer au système de gorgement artificiel actuellement mis en place, nous avons choisi la souris comme modèle animal pour servir d'appât vivant. Les cages préconisées pour ce test, 25 cm x 25 cm couverte d'un voile en moustiquaire, se sont avérées trop grandes pour les *Culicoides* femelles de 3 jours n'ayant jamais pris de repas sanguin, et aucune attirance pour la souris posée endormie sur le voile n'a été observée. Nous avons donc remplacé les cages par des plus petites de 20 x 20 cm puis par des cylindres de 15 cm de hauteur avec un diamètre de 9 cm, mais dans aucun des deux cas les *Culicoides* ne se sont intéressés à la souris. Nous sommes, par la suite, retournés à l'utilisation des cages en carton avec des adultes issus de l'élevage et nous avons disposé les souris anesthésiées comme il avait été fait auparavant pour la maintenance de l'élevage de *C. nubeculosus* (Figure 3.1). La formation d'expérimentation animale de niveau 2 a été suivie pour permettre la manipulation des souris. Afin d'optimiser le taux de gorgement du témoin, nous avons réalisé des pré-tests sous différentes conditions comme l'âge des femelles, la luminosité, la température et l'humidité. Finalement, nous avons constaté que les meilleures conditions pour mener le test étaient avec des femelles âgées au maximum de 5 jours, dans l'obscurité totale, avec une température et une humidité relative d'environ 20°C et 60%. Ces conditions nous ont permis de gorger à plus de 80% des femelles sur souris témoin (Figure 3.1). Nous avons ainsi démarré le test avec des souris traitées avec quatre formulations : le Butox 7.5 (deltaméthrine), l'Ectotrène (cyperméthrine), le Vectochlor ou Cyperchlor (chlorpyrifos-méthyl, cyperméthrine et citronnelle) et le Sebacil (phoxime). Nous avons permis le gorgement pendant 30 minutes, car nous voulions standardiser le temps d'exposition et nous ne disposions que de 1 h (temps d'effet anesthésique) pour endormir toutes les souris. La mortalité et le taux de gorgement ont été enregistrés 24 h après l'exposition et les contacts ont été répétés dans le temps. Les atouts majeurs de cette approche sont la faisabilité, la répétabilité, la comparabilité mais surtout le criblage rapide des produits.



**Figure 3.1** Mise en contact de la souris traitée avec les *Culicoides* (gauche) et femelles gorgées (droite).

Concernant les produits à caractère répulsif, les études menées jusqu'à présent, ont utilisé diverses méthodologies se basant sur des collectes à proximité des traitements ou en utilisant des pièges avec les filets imprégnés, mais aussi, sur l'exposition des *Culicoides* à des poils ou au sang d'animal traité, ou directement à l'animal ou dans un olfactomètre en Y. L'effet répulsif obtenu dans ces études est très variable, voire contradictoire selon la méthode utilisée, comme par exemple ; le traitement du filet d'un piège avec de la citronnelle n'a pas diminué les captures par rapport au piège témoin (Page *et al.*, 2009), mais, quand elle est testée dans un olfactomètre, la répulsion est de 86% à des concentrations de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de substances actives (González *et al.*, 2014).

Dans le but d'évaluer, de façon homogène, l'efficacité des répulsifs qui inhibent le repas des *Culicoides*, nous proposons une approche différente à celles menées jusqu'à présent. Elle consiste à employer le système de gorgement artificiel, utilisé en routine pour le gorgement de *C. nubeculosus* mis en élevage, et traiter avec différents produits la membrane de la pastille de sang sur laquelle le repas est pris afin de quantifier la réduction du taux de gorgement par rapport au témoin sans traitement. Nous avons donc, testé en laboratoire l'efficacité de 6 huiles essentielles : géranium, lavande, eucalyptus citronnée, citronnelle, menthe poivrée et arbre à thé, 2 répulsifs : neem et DEET et 1 insecticide : deltaméthrine contre des femelles de *C. nubeculosus* de 3 jours n'ayant jamais pris un repas sanguin. Tous les produits ont été dilués dans l'éthanol à 96 % et 16  $\mu\text{l}$  ont été appliqués et étalés délicatement sur la membrane du système de gorgement rempli de sang bovin (Figure 3.2) afin d'obtenir des concentrations de 0,083  $\mu\text{l}$  de substance active/ $\text{cm}^2$  pour les 6 huiles essentielles, le neem et le DEET à 5 %, de 3,2  $\mu\text{l}$  de substance active/ $\text{cm}^2$  pour le DEET à 20 %, et de 4  $\mu\text{g}$  de deltaméthrine/ $\text{cm}^2$ . Les surfaces ont été laissées 10 minutes à l'air libre pour que l'éthanol s'évapore, puis le gorgement a été permis pendant 20 minutes et finalement le nombre de femelles gorgées et non gorgées a été enregistré. La procédure a été répétée 3 fois.

Nous avons prévu de mener ce test avec des populations sauvages et des missions ont été réalisées en France pour collecter *C. obsoletus* dans le département de la Corrèze (19) et *C. imicola* au sud du département de Corse du Sud (2A) et pour réaliser les tests sur place dans un gîte rural, où une chambre a été réservée à cet effet. Malheureusement, les taux de gorgement de ces deux espèces n'ont atteint que 10 %. Face à cette contrainte, nous avons adapté la procédure en remplaçant la membrane traitée par une pastille de papier filtre imprégné (comme dans le test en tube OMS) avec une surface identique à celle de la pastille de sang. Le sang a été remplacé par de l'eau sucrée colorée pour nous permettre d'identifier les femelles qui ont pris de l'eau. Vu que le papier filtre est plus absorbant que la membrane, le volume des dilutions à appliquer a été augmenté à 100 µl pour obtenir des concentrations de 0,104 µl de substance active/cm<sup>2</sup> pour les 6 huiles essentielles, le neem et le DEET à 1%, de 0,052 µl de substance active/cm<sup>2</sup> pour le DEET à 5 %, et de 4 µg de deltaméthrine/cm<sup>2</sup>. Sur les pastilles de papiers d'abord 150 µl d'eau sucrée colorée puis les 100 µl de dilutions ont été pipetés. Par la suite, elles ont été posées sur des tubes en plastique transparent nous permettant de visualiser le comportement des *Culicoides* (Figure 3.2). Les pastilles ont été laissées 10 minutes à l'air libre pour que l'éthanol s'évapore, puis le gorgement a été permis pendant 1 h et le nombre de femelles gorgées et non gorgées a été enregistré. La procédure a été répétée 3 fois avec *C. obsoletus* mais les tests programmés avec *C. imicola* n'ont pas pu être réalisés à cause des conditions météorologiques (vents violents) qui n'ont pas permis des captures conséquentes. Nous disposons donc seulement des données pour *C. nubeculosus* et *C. obsoletus*.



**Figure 3.2** Dispositifs pour évaluer l'inhibition de repas sur les *Culicoides* avec des répulsifs, membrane sur la pastille de sang (à gauche) et pastille de papier filtre non traitée (au centre) et traitée avec du géranium (à droite).



L'objectif de ce chapitre est donc d'évaluer l'efficacité des produits insecticides appliqués directement sur les animaux et des répulsifs contre les *Culicoides*. Les résultats obtenus au cours des essais sont présentés à la suite de ce manuscrit sous la forme de deux articles, le premier concernant les insecticides et le second, les répulsifs :

- **Venail R**, Balenghien T, Carpenter S and Baldet T. Assessment of the efficiency of insecticides formulations against *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) using a novel approach. À soumettre à Veterinary Parasitology. *Manuscrit #7* page 149.
- **Venail R**, Lachance S, Lhoir J, Rakotoarivoany I, Garros C, Balenghien T, Carpenter S and Baldet T. Feeding inhibition and lethal properties of various essential oils against adult *Culicoides* biting midges. En preparation. *Manuscrit #8* page 161.



### 3.1 Efficacité des produits insecticides appliqués directement sur les animaux contre les *Culicoides*

---

*Manuscrit #7* (à soumettre à Veterinary Parasitology) :

#### **Assessment of the efficiency of insecticide formulations against *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) using a novel approach**

Roger Venail<sup>1\*</sup>, Thomas Balenghien<sup>2</sup>, Simon Carpenter<sup>4</sup> and Thierry Baldet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen (EID Med), Montpellier, France.

<sup>2</sup>Cirad, UMR15 CMAEE; INRA, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France

<sup>3</sup>INRA, UMR1309 CMAEE, 34398 Montpellier, France

<sup>4</sup>The Pirbright Institute, Vector-borne Viral Disease Programme, Woking, GU24 0NF, UK

\* e-mail: [rvenail@yahoo.com](mailto:rvenail@yahoo.com)

#### **Abstract**

*Culicoides* biting midges transmit viruses of veterinary importance worldwide, including bluetongue virus and Schmallenberg virus. Insecticidal products in pour-on and bath formulations are commonly employed to reduce survival of *Culicoides* bloodfeeding on treated animals. This is despite a lack of published, standardised data concerning their efficiency in this role. The objective of the present study was to assess the efficacy of four commercialized insecticidal formulations against *Culicoides* using a novel laboratory method. Laboratory reared *Culicoides nubeculosus* Meigen specimens were exposed for 30 minutes to the belly of laboratory mice treated with commercial topical insecticidal products: Butox<sup>®</sup> 7.5 (deltamethrin active ingredient: a.i.), Ectotrine<sup>®</sup> (Cypermethrin a.i.), Vectoclor<sup>®</sup> (Cypermethrin, Chlorpyrifos a.i. and Piperonyl Butoxide enhancement) and Sebacil<sup>®</sup> 50% (Phoxim a.i.). Products were applied following the recommended dose for biting flies, taking into account the substantially smaller body weight of the mice used. The mortality rate of *C. nubeculosus* was then observed at 24h following exposure and the lethal persistence of insecticide products was assessed for 15 days after treatment. All products elicited immediate impacts of feeding *C. nubeculosus* with a lethality of > 75% one day after treatment followed by a general decrease in efficacy over time. The cypermethrin (pyrethroid) based topical formulation, Ectotrine<sup>®</sup>, presented the better results with the highest lethal effect at 15 days postapplication and the longest persistence, estimated at 18 days after treatment. The method

described may be used as a reference in further studies of product screening against *Culicoides*.

**Keywords** *Culicoides*, vector control, insecticide formulation efficiency.

### Introduction

*Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are responsible for the transmission of livestock arboviruses of veterinary importance including bluetongue virus (BTV), African horse sickness virus (AHSV), epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) and Schmallenberg virus (SBV) (Carpenter *et al.*, 2013). *Culicoides*-borne diseases caused by these arboviruses can inflict mortality and reduce the quantity and quality of products from affected livestock. The imposition of animal movement restrictions to reduce the disease spread in the case of arboviruses notifiable to the OIE also impacts on trade at a global scale, particularly in epidemic regions.

In the attempt to reduce transmission of *Culicoides*-borne arboviruses, guidelines have been recommended by the European Food Safety Authority (EFSA) (EFSA, 2008). Insecticidal control measures implemented against *Culicoides* tend to be highly specific as the abundance and ubiquity of potential larval development sites, particularly in northern Europe, precludes wide scale treatment. Applications of insecticides are generally restricted to direct treatment of valuable animals as prize rams and racehorses and limited use within stables and during transport when livestock is moved outside restricted zones (EFSA, 2008). While larval *Culicoides* habitat modification or removal is also recommended, this practice has recently been shown to have little discernable impact on emergence (Harrup 2014). This is a significant issue for farmers as prior to the implementation of an effective vaccination strategy, there is often an extended period where these techniques represent the only available response to transmission.

Insecticidal pour-on formulations are the most commonly used method to control *Culicoides* in Europe, despite the fact that no specific insecticide has been registered for use against them (EFSA, 2008). The commercially available formulations are commonly based on a synthetic pyrethroid active ingredient. The efficacy of such products has previously been assessed in a variety of methods. These include exposing *Culicoides* to hair clipping from pyrethroid-treated animals (Mehlhorn *et al.*, 2008; Papadopoulos *et al.*, 2009; Schmahl *et al.*, 2008) or by exposing *Culicoides* directly to treated animal and then monitoring mortality (Venail *et al.*, 2011). Comparison between such studies is challenging and results produced are highly variable due to major differences in experimental protocol, which highlights the importance of standardising the methods to obtain and compare data.

Since 1960, with the initiation of the WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), the World Health Organization (WHO) has been coordinating the evaluation of insecticides for

public health by studying their safety and their efficacy. Specific guidelines for testing are available (<http://www.who.int>) including i) for monitoring the insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes (WHO, 1981, 2013); ii) for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets; iii) for efficacy testing of spatial repellents; iv) for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets and; v) for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying. The baseline of WHO reference guidelines is to test insecticides against mosquito vectors in a human health context. In the absence of such reference procedures for testing insecticides against *Culicoides*, recent studies have been performed by adapting WHO test to be used with this genus allowing the assessment of their susceptibility to insecticide active ingredients and formulations (Braverman *et al.*, 1995; Venail *et al.*; Venail *et al.*, 2011).

An issue also arises in standardising methods of testing the efficacy of insecticides when applied to live hosts. While this remains a vital component of assessing the impact of applications, such studies are extremely difficult to standardise across countries, costly and time consuming. In this paper we therefore examine the use of a mouse model system to at partially fulfil this role in the laboratory. We use this system to assess three veterinary products commercialized in Europe, Butox ® 7.5 (deltamethrin-based), Ectotrine ® (alpha-cypermethrin-based) and Sebacil ® 50% (phoxim-based), and one used in Africa, Vectoclor ® (chlorpyrifos-methyl-based).

## Material and Methods

### Biting midges

Laboratory-reared *C. nubeculosus* used during trials were provided from the Cirad (Montpellier, France) colony. This was established in 2012 from eggs and larvae provided by The Pirbright Institute in the framework of the FP7 EDENext European Project and maintained following rearing procedures described by Kremer (Kremer and Lienhart, 1998). As insecticide susceptibility could change not only with age (Chareonviriyaphap *et al.*, 2006; Rajatileka *et al.*, 2011), but also with the physiological status and sex (WHO, 2013), all bioassays were performed with < 5 day old, laboratory-reared, unfed *C. nubeculosus* females.

### Mice

Eighteen four-week old mice were separated in six batches (two as controls and one for each insecticidal product tested) of three individuals and placed in cages. All animals had access to identical food and water during the three-week trials. Mice were maintained in a room at moderated conditions (temperature:  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; relative humidity:  $60 \pm 10\%$ ; light:dark : 12/12). No direct sunlight exposure was allowed to avoid the possible photo-degradation of insecticide.

### **Insecticide formulations**

The insecticidal products used are described in Table 1. The amount of insecticide to be applied on each mouse was calculated according to manufacturer recommendations related to the skin surface of the animal to be treated. The skin surface area (SA) of cattle was estimated using the Brody's equation:  $SA = 0.14 \times W \exp 0.57$  (Brody, 1945), where W is the weight of the animal in kg. The theoretical concentrations of active ingredients on cattle skin were calculated following manufacturer recommendations as follows: 10 ml of pour-on per 100 kg of animal for Butox ® 7.5, Ectotrine ® and Vectoclor ®, which represent a theoretical concentration of 39 mg/m<sup>2</sup> of deltamethrin for Butox ® 7.5; 259 mg/m<sup>2</sup> of cypermethrin for Ectotrine ® and; 362 mg/m<sup>2</sup> of chlorpyrifos-methyl and 259 mg/m<sup>2</sup> of cypermethrin for Vectoclor ®. The recommended dosage for Sebacil ® 50% is 3 L per 100 kg animal which represents 388 mg/m<sup>2</sup> of phoxim. The mouse skin surface was then calculated using the Meeh equation:  $BSA = k \times W \exp 0.667$  (Cheung *et al.*, 2009), where K is a constant (9.693) and W is the weight of the mouse in grams. Finally, the amount of product to be applied on each mouse was calculated (39.4 µl of pour-on and 11.8 ml of bath product), in order to obtain the theoretical concentrations previously calculated on cattle. Preliminary investigation found that the bath product volume was too high for application so all products were tested as for pour-on's.

### **Insecticide applications**

On the treatment day (T0), all mice (untreated and treated) were anesthetized with an intramuscular injection of 0.12 µl of a solution containing 0.2 ml of Imalgène 500; 0.05 ml of Rompun 2% and 0.4 ml of distilled water. The belly of mouse was shaved with an electric razor, then, 39.4 µl of pour-on were applied (19.7 µl in the belly and 19.7 µl in the back as the pour-on application on cattle) and spread with a glove over the mouse's body. Gloves were changed after each mouse treatment.

### **Insecticide assays**

The WHO cage bioassay on which the current study is based, evaluates the efficiency of authorised pour-on and dip-wash formulation insecticides using a mosquitoes guinea pig or mouse enclosed in a cage. This procedure was tested with *Culicoides* but no feeding by *Culicoides* on mice was observed in mosquito cages (40cm<sup>3</sup> and 20cm<sup>3</sup> trialled). Small card pill boxes used for the maintenance of *C. nubeculosus* in the colony, were therefore used as exposure cages. At T0, approximately one hundred *C. nubeculosus* that were not sorted for gender were placed in each card pill box (coverer with fine mesh) to obtain at least 25 fed females. A paper sheet (Whatman n°1 filter paper, 90 g/m<sup>2</sup>, 5 x 5 cm) with a 2 x 4 cm hole was placed over the covering mesh to standardise the exposure surface on the mouse. To avoid contamination, untreated mice (control) were tested first. Exposure time for treated and untreated mice was 30 minutes.

Following exposure, mice were returned to their mouse cages to recover. All *Culicoides* were transferred using a mouth aspirator from pill boxes to observation WHO tubes that were kept vertically for 24h, with a 10% sucrose solution provided on cotton wool pads. After completion, the number of dead and live *Culicoides* was recorded to assess the mortality. Tests were performed in a laboratory room with temperature of 21±3°C and relative

humidity of  $60\pm 10\%$ . Mortality was assessed on day following the insecticidal treatment and then on 5, 8, 12 and 15 days in order to examine the persistence of insecticide during the trial. When control mortality was above 20% the entire replicate was discarded.

### Statistical analysis

Formulations were analysed separately because of the differences in active ingredient. Due to over-dispersion of data, a  $\beta$ -binomial logistic regression model was used. The goodness of fit was tested using the function *gof* of the *aods3* package from the software R ( R. Development Core Team, <http://www.R-project.org>) to test the total quality of the adjustment and verify the over dispersion of data ( $p > 0.05$ ). The average mortality was modelled and the lower and upper confidence interval of prediction were computed for  $\alpha = 0.05$ . Data was not corrected in all trials due to some missing control values. Thus, the average control mortality was calculated ( $\sim 10\%$ ) and was considered as the threshold of experimental mortality. Indeed, the lethal effect was considered statistically different from 10% as long as the lower value of the confidence interval was  $> 10\%$ . R freeware (R Development Core Team 2012) and additional packages (*aods3*, *lattice*) were used for data analysis and graphs.

### Ethical considerations

This study was performed following the appropriate technical requirements for accommodation and care of experimental animals according to the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes in Europe. All tests were performed in an accredited institution for animal experimentation by the French authorities (Arrêté N° 09 XIX 109 licensed the 15<sup>th</sup> of September 2009 by the Prefecture de l'Hérault, Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Herault). All activities followed the Guidelines of Good clinical practices (GCP) outlined by the International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, VICH GL9 (GCP) June 2000 - Implemented in July 2001 (<http://www.vichsec.org/>). The protocol was approved by the ethics committee Comité d'éthique du Languedoc-Rousillon and each step of the protocol was conducted by qualified staff for animal experimentation.

## Results

A total of 2,749 *C. nubeculosus* unfed females were exposed to mice: 346 to untreated mice; 617 to Butox ® 7.5; 760 to Ectotrine ®; 542 to Sebacil ® 50 % and 484 to Vectoclor to treated mice. All formulations elicited a high lethal effect against *C. nubeculosus* one day after their application on mice, ranging from 77.4% with Butox ® 7.5 to 96.4% with Sebacil ® 50%. Following this there was a clear decrease in the lethal effect of all treatments during the trial period of fifteen days. The mortalities obtained with Vectoclor ® and Sebacil ® 50% declined from  $> 75\%$  at day 1 to  $< 25\%$  at day 8 and  $< 10\%$  at day 10 after exposure. Butox ® 7.5 demonstrated greater long-term efficacy with average mortalities  $> 75\%$  at day 1,  $> 25\%$  at day 8 and  $> 10\%$  at day 10 post-exposure. The Ectotrine ® gave the best performance

with average mortalities > 75% at day 1, > 50% at day 12 and > 25% at day 15 post-exposure (Table 2).

The models constructed fitted well with the data observed for all products ( $p > 0.05$ ). The reduction of efficiency was observed in all products, with a steep slope with Vectoclor® and Sebacil® 50%, a medium slope for Butox® 7.5 and a moderate slope for Ectotrine®, consequently, the persistence of the lethal effect was predicted to be 8 days, 10 days, 13 days and 18 days after application for phoxim, chlorpyrifos-methyl-cypermethrin, deltamethrin and cypermethrin (Table 2. and Fig. 1.).

## Discussion

While the reference procedures to assess the efficiency of insecticides against mosquitoes in a public health setting have been used for decades, these systems are poorly developed for veterinary vectors such as *Culicoides*. In the absence of standard protocols, the present study shows a novel technique permits rapid and straightforward assessment of the efficiency of insecticidal formulation under laboratory conditions. While not entirely replacing the use of testing of insecticides on the hosts for which they are intended (e.g. cattle, sheep and horses), this assay circumvents some of the technical constraints encountered when performing trials in the field. Data provided from the assay was robust and repeatable and the longevity of the products on the mice clearly varied. A major consideration for future studies would be how the spread of insecticide on the mice compares with that on target animals where hair and application may vary.

One of the most critical values for insecticide testing is the diagnostic dose (i.e. the dose of insecticide that kills 100% of susceptible *Culicoides*) because it represents the threshold between susceptibility and resistance. The diagnostic dose of *C. nubeculosus* was determined to be 11.13 mg/m<sup>2</sup> of deltamethrin; 301.56 mg/m<sup>2</sup> of chlorpyrifos-methyl; 385.28 mg/m<sup>2</sup> of phoxim (Venail in press) and 143.90 mg/m<sup>2</sup> of cypermethrin (Venail unpublished data). Theoretical concentrations of products applied to mice in the current study were 38.81 mg/m<sup>2</sup> of deltamethrin; 362.22 mg/m<sup>2</sup> of chlorpyrifos-methyl; 388.09 mg/m<sup>2</sup> of phoxim and 258.73 mg/m<sup>2</sup> of cypermethrin. Thus, the applied doses were about 3.5, 1.2, 1 and 1.8 times greater than deltamethrin, chlorpyrifos-methyl, phoxim and cypermethrin diagnostic doses, respectively. This differential between expected and observed efficiency was previously documented with the widely used Butox® 7.5 deltamethrin-based pour-on, and the limited diffusion of the active ingredient was suggested to explain in part the poor efficiency of pour-on products (Carpenter *et al.*, 2008; EFSA, 2008; Mullens *et al.*, 2010; Sallovitz *et al.*, 2003; Venail *et al.*, 2011). Given the use of small mice weighting 20 g and the spread of the insecticide all over the body, the explanation of low diffusion would be an unlikely explanation for the disappointing results obtained in this study.



The patterns of distribution and skin availability of active ingredient from treated animals following a pour-on's formulation are poorly documented, although discussed by (Carpenter *et al.*, 2008). It would be interesting to quantify this pattern on a representative available and licenced product used in Europe although the issue of absorption of the AI into the skin remains difficult to quantify. The method proposed in this study, however, allows a rapid and straight-forward first screening of insecticidal products.

## Conclusion

To conclude, this study has illustrated that laboratory screening of veterinary used insecticide products is feasible, easy and rapid to conduct, avoiding heavy studies in the field and facilitating the screening of commercialized or potential products and formulations.

All products tested in this study, exhibited good performances with lethal effects > 75% one day after mice treatment, then the effect decreased in time. The cypermethrin (pyrethroid) based topical formulation, Ectotrine ®, presented the better results with the higher lethal effect at 15 days postapplication and with the longer persistence than other products estimated at 18 days after treatment.

This novel approach may be used as reference method in further studies of product screening against *Culicoides*, and will provide useful data and will also have an important impact in vector control strategies. For example, it is worth to assess the performance, persistence and the kinetic behaviour of Ectotrine ® spread with a glove all over the animal body.

## Acknowledgments

This study was funded by EU grant FP7-261504 and is catalogued by the EDENext steering committee as EDENext manuscript # XXXX. The authors are grateful to Johnathan Lhoir, Xavier Allène, Ignace Rakotoarivony and Geoffrey Gimonneau from Cirad for technical help. We thank the anonymous reviewers for their useful comments.

## References

- Braverman, Y., Wilamowsky, A., Chizov-Ginzburg, A., 1995. Susceptibility of *Culicoides imicola* to cyhalothrin. *Med Vet Entomol* 9, 443-444.
- Brody, S., 1945. *Bioenergetics and Growth*. Reinhold Publishing Co, New York, 1023 p.

- Carpenter, S., Groschup, M.H., Garros, C., Felipe-Bauer, M.L., Purse, B.V., 2013. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res.* 100, 102-113.
- 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, 175-187.
- Chareonviriyaphap, T., Kongmee, M., Bangs, M.J., Sathantriphop, S., Meunworn, V., Parbaripai, A., Suwonkerd, W., Akranakul, P., 2006. Influence of nutritional and physiological status on behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to deltamethrin and cypermethrin. *J Vector Ecol* 31, 89-101.
- Cheung, M.C., Spalding, P.B., Gutierrez, J.C., Balkan, W., Namias, N., Koniaris, L.G., Zimmers, T.A., 2009. Body surface area prediction in normal, hypermuscular, and obese mice. *J. Surg. Res.* 153, 326-331.
- EFSA, 2008. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission (DG SANCO) on Bluetongue. *The EFSA Journal* 735, 1-69.
- Kremer, M., Lienhart, E., 1998. Elevage de *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasite* 5, 211-214.
- Mehlhorn, H., Schmahl, G., D'Haese, J., Schumacher, B., 2008. Butox ® 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitol Res* 102, 515-518.
- Mullens, B., Gerry, A., Sarto I Monteys, V., Pinna, M., González, A., 2010. Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. *J Med Entomol* 47, 106-110.
- Papadopoulos, E., Bartram, D., Carpenter, S., Mellor, P.S., Wall, R., 2009. Efficacy of alphacypermethrin applied to cattle and sheep against the biting midge *Culicoides nubeculosus*. *Vet. Parasitol.* 163, 110-114.
- Rajatileka, S., Burhani, J., Ranson, H., 2011. Mosquito age and susceptibility to insecticides. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105, 247-253.
- Sallovitz, J.M., Lifschitz, A., Imperiale, F., Virkel, G., Lanusse, C., 2003. A detailed assessment of the pattern of moxidectin tissue distribution after pour-on treatment in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26, 397-404.
- Schmahl, G., Walldorf, V., Klimpel, S., Al-Quraishy, S., Mehlhorn, H., 2008. Efficiency of Oxyfly on *Culicoides* species -the vectors of Bluetongue virus- and other insects. *Parasitol Res* 103, 1101-1103.

- Venail, R., Lhoir, J., Rakotoarivony, I., Allène, X., Setier-Rio, M.L., Scheid, B., Gardès, L., Gosset, A., Lancelot, R., Gimonneau, G., Garros, C., Balenghien, T., Carpenter, S., Baldet, T., Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in France. PLoS ONE in press.
- Venail, 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, 351-357.
- WHO 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: mimeographed document (WHO/VBC/81.810) (Geneva, Switzerland, World Health Organization ).
- WHO 2013. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes (Geneva, Switzerland, World Health Organization ).

## Tables

Table 1. List of veterinary medical product tested.

Product trade name (Country*)	Active ingredient	Applied theoretical concentration**	Route of administration	Targeted species	Dose rates***	Theoretical persistence
Butox ®7.5 (BE, DE, FR,IE, IT, PL, PR, UK)	Deltamethrin 7.5 mg/ml	38.81 mg/m <sup>2</sup>	Pour-on	Cattle, sheep	< 100 kg: 10 ml 100-300 kg: 20 ml > 300 kg: 30 ml	8-10 weeks
Ectotrine ® (FR, Renegade® in IT, UK)	Cypermethrin 50 mg/ml	258.73 mg/m <sup>2</sup>	Pour-on	Cattle	10 ml/ animal	7-8 weeks
Vectoclor ® (Africa)	Cypermethrin 50 mg/ml Chlorpyrifos-methyl 70 mg/ml Citronella 5 mg/ml Piperonyl butoxide (PBO) 50 mg/ml	258.73 mg/m <sup>2</sup> 362.22 mg/m <sup>2</sup>	Pour-on	Cattle, pigs	10 ml/ 100 kg of animal	unknown
Sebacil ® 50% (AT, CH, DE, FR, IT, NO, PL, PR, SE)	Phoxim 500 mg/ml	388.09 mg/m <sup>2</sup>	Topical application	Cattle, sheep, goats, pigs, horses	Cattle : 3-4 l *****, sheep and goats: 2-3 l, pigs: 0.5-1 l , horses: 2-3 l	2-8 weeks

\*Country where the product is commercialized and licensed, \*\*Concentration estimated from the skins surface of a 100kg animal calculated with Brody's equation, \*\*\*Doses recommended for the prevention and treatment against flies, \*\*\*\* prepared solution: 1 l of Sebacil 50% for 1,000 l of water / animal. Countries abbreviations: AT, Austria; BE, Belgium; CH, Switzerland; DE, Germany; FR, France; IE, Ireland; ; IT, Italy; NO, Norway; PL, Poland; PR, Portugal; UK, United Kingdom ;SE, Sweden.

Table 2. Mortality of *Culicoides nubeculosus* postexposure to treated mice at 1, 5, 8, 12 and 15 days after the application of formulations and the estimation of persistence in days

Commercialized product	Active ingredient	Applied theoretical concentration	Mortality (%) after insecticide application (Range)					Estimated persistence
			Day 1	Day 5	Day 8	Day 12	Day 15	
Butox ® 7.5	Deltamethrin	38.81 mg/m <sup>2</sup>	79.9 (77.4-82.3)	52.2 (50.0-54.5)	27.1 (20.0-34.2)	18.6 (15.1-22.1)	5.9 (5.8-6.0)	13 days
Ectotrine ®	Cypermethrin	258.73 mg/m <sup>2</sup>	85.9 (79.2-92.7)	66.2 (62.5-70.0)	52.8 (45.1-65.0)	52*	32.5 (25.0-40.0)	18 days
Vectoclor ®	Chlorpyrifos-methyl	362.22 mg/m <sup>2</sup>	79.0	59.7*	14.6	3.8*	3.5*	10 days
	Cypermethrin	258.73 mg/m <sup>2</sup>	(78.1-79.6)		(10.8-18.5)			
Sebacil ® 50%	Phoxim	388.09 mg/m <sup>2</sup>	91.1 (87.0-96.4)	32.1*	10.75 (7.2-16.0)	3.8*	3.6*	8 days

Minimal and maximal observed mortality in brackets. \*only one replicate was kept for analysis

## Figures

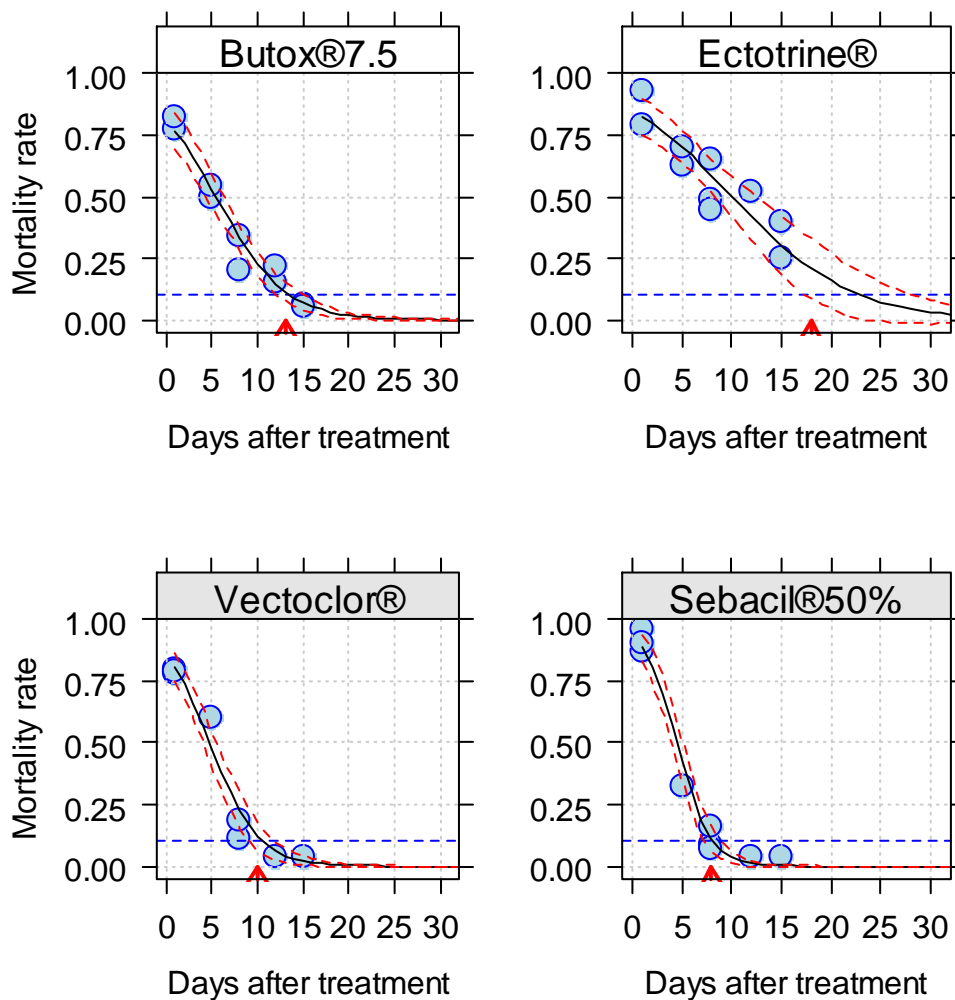


Fig. 1. Estimated persistence of insecticidal formulations applied to mice against *Culicoides nubeculosus*. Dots represent the observed data. Solid lines represent the average mortality predicted by the model. Red dashed lines represent the 95% lower and upper confidence intervals. Blue dashed lines represent the 10% mortality threshold. Red arrows represent the predicted day to obtain less than 10% mortality with the lower confidence interval with  $\alpha=0.05$  threshold.

## 3.2 Efficacité des répulsifs contre les *Culicoides*

*Manuscrit #8* (en préparation) :

### **Feeding inhibition and lethal properties of various essential oils against adult *Culicoides* biting midges**

Roger Venail<sup>1\*</sup>, Simon Lachance<sup>2</sup>, Jonathan Lhoir<sup>3</sup>, Ignace Rakotoarivony<sup>3</sup>, Xavier Allène<sup>3</sup>, Claire Garros<sup>3</sup>, Thomas Balenghien<sup>3</sup>, Simon Carpenter<sup>4</sup> and Thierry Baldet<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen (EID Med), Montpellier, France.

<sup>2</sup>University of Guelph, Campus Ridgetown, Ridgetown, Canada.

<sup>3</sup>Cirad, UMR15 CMAEE; INRA, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France.

<sup>4</sup>The Pirbright Institute, Vector-borne Viral Disease Programme, Woking, United Kingdom.

\*e-mail: [rvenail@yahoo.com](mailto:rvenail@yahoo.com)

### **Abstract**

*Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are vectors of various pathogens that cause important economic losses to international livestock industry. In the attempt to control *Culicoides* species and reduce disease transmission, the most common technique is the use of insecticides, however, because of their negative effects on human health and the environment, combined to the restrictions on the use of some insecticides, have led into the development of alternative control strategies to synthetic neurotoxic insecticides, such as plant-based repellents and more specifically the use of plant essential oils. This study assesses the feeding inhibition and lethal properties of six essential oils, one oil extract, the gold standard repellent (DEET) and the gold standard insecticide (deltamethrin) against laboratory-reared *Culicoides nubeculosus* and field-collected *Culicoides obsoletus* using a novel approach. Geranium and lemongrass showed excellent repellent properties similar to DEET, and lemon-eucalyptus and lemongrass exhibit better performance than deltamethrin inflicting mortality. Essential oils could be useful for use as alternative strategies to insecticides.

**Key words :** *Culicoides*, vector control, repellency effet, essential oils

## Introduction

*Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are small hematophagous vectors of several arboviruses affecting livestock and wild animals (1), among which are bluetongue (2) and Schmallenberg (3) viruses in ruminants and African horse sickness virus in equids (4), some of the most feared pathogens of domestic livestock (5). These *Culicoides*-borne diseases have a severe economic impact, the direct losses are due to the animal mortality and morbidity and the veterinary costs of care for sick animals. The indirect losses are due to the reduction of animal trade during animal movement restriction when countries attempt to limit disease spread. *Culicoides* are very abundant in some areas inflicting nuisance biting on humans and livestock, limiting tourism and producing allergies in horses (6).

While integrated strategies have been used for reducing the transmission of viruses, as compulsory vaccination campaigns (7), the most common employed method to control *Culicoides* currently is the chemical control, more specifically, the use of pour-on pyrethroid insecticide formulation directly on ruminants. The efficiency (lethality) of insecticides against *Culicoides* has been studied worldwide and reviewed (6), since, most of the work done has focused on the pyrethroid insecticides (8-16). To sum, as expected, the studies performed showed that *Culicoides* are very sensitive to pyrethroids, particularly to the gold-standard insecticide: the deltamethrin (Venail *et al.* in press). However, because of their negative effects on human health and the environment (17), combined to the restrictions on the use of some insecticides (18), it has led into the development of alternative control strategies to synthetic neurotoxic insecticides, such as repellents (19).

The EU legislation for the use of repellents to protect livestock from pest bites is vague and the rigorous safety testing for possible animal health risks, have not been properly undertaken (17). While no repellents are authorized in Europe specifically for the treatment of animals to decrease *Culicoides* biting rates, and consequently, reduce virus transmission, a wide range of products are available and used as such. Most of these repellents are synthetic, amongst them; the most common and efficient at keeping midges away (20), as permethrin (8, 21, 22) and the gold-standard synthetic repellent, DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide) (23-25). In the context of pest management, the increasing use of organic or “green” farming practices has led to the development and use of plant-derived or natural repellent as essential oils (19).

Essential oils are usually extracted from plants through steam distillation producing a mixture of different volatile secondary metabolites with a low molecular weight characterized by strong odours (26). Some essential oils have an important biological activity against pest insects (27), including insecticidal, antifeedants, deterrent or repellent properties (19). Considering the potential value of essential oils, some effort has been made to demonstrate their efficacy in veterinary ectoparasite control, such as mites, ticks, flies, lice and fleas (18). Other studies focused their efficacy against *Culicoides* and it has been observed that some essential oils have no effect as citronella (8) and neem.



In contrast, lemon eucalyptus (23), oregano (25), tea tree (24, 25), neem (28), lemongrass (29), eucalyptus and lavender were found to repel *Culicoides*. The variety of experimental designs used across studies makes difficult to compare data obtained.

In the need for adequate and standardized protocols (6) to obtain more data on control of *Culicoides* (30), which could be integrated in sustainable management programs, this paper presents a novel approach to evaluate the efficiency of repellents against *Culicoides nubeculosus* Meigen (a reference laboratory-reared species) and *Culicoides obsoletus* Meigen (the commonest species in Europe). The aims of this study are to evaluate the feeding inhibition and lethal properties of various essential oils against *Culicoides* and compare their performances with repellent and insecticide gold-standards, DEET and deltamethrin.

## Materials and methods

### Targeted species

The tests were performed with two different species of veterinary importance, *C. nubeculosus* and *C. obsoletus*. The laboratory-reared *C. nubeculosus* specimens were provided from the colony maintained by the CIRAD, Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes (Montpellier, France, April 2012). *C. obsoletus* specimens were collected in the field in Peret-Bel-Air (Corrèze department, France, May-June 2012) using a suction trap UV-light trap (OVI model, South Africa). To collect live individuals during the trapping period (1h before sunset to midnight), the collection jar was replaced with a fine mesh cage. Collection cages were stored in an isothermal polystyrene box covered with a soaked tissue overnight to avoid desiccation.

### Tested products

Six essential oils, geranium rosat (*Pelargonium graveolens*), lavender (*Lavendula angustifolia*), lemon-eucalyptus (*Corymbia citriodora*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), peppermint (*Mentha piperita*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), and one oil extract of neem (*Azadiracta indica*), with a purity degree >99% obtained from Sigma Aldrich were diluted in ethanol to obtain 1% and 5% concentrations. Synthetic repellent DEET was diluted in ethanol to obtain 1%, 5% and 20% concentration and the synthetic insecticide deltamethrin was used as an equivalent of 75 mg a.i./100 kg animal, as recommended for commercial formulations (0.004 mg a.i./cm<sup>2</sup>). Ethanol was used as control. In total, 11 diluted solutions were tested against two species of *Culicoides*: 1 control (ethanol), 6 essential oils, 1 oil extract, 2 concentrations of DEET and 1 insecticide (deltamethrin).

#### *Experiment 1: blood feeding inhibition and mortality of essential oils against C. nubeculosus*

Sixteen microliters of the 11 ethanol diluted solutions : ethanol as control, essential oils at 5% (0.083  $\mu\text{l}$  a.i./ $\text{cm}^2$ ), DEET at 5% (0.083  $\mu\text{l}$  a.i./ $\text{cm}^2$ ) and 20% (3.2  $\mu\text{l}$  a.i./ $\text{cm}^2$ ) and deltamethrin at 0.004 mg a.i./ $\text{cm}^2$ , were pipeted and uniformly distributed, using an L-shaped disposable petri spreader, over the Parafilm membrane covering the reservoir (surface of 9.6  $\text{cm}^2$ ) of an Hemotek 6W1 artificial feeding system (Discovery Workshops, Lancs, England) previously filled with cattle blood, as used routinely for colony maintenance. The treated surfaces were allowed to ambient air-dry for 10 minutes before the test. The temperature of the blood was set and maintained at 37°C during the exposure period. About 50 *C. nubeculosus* nulliparous females (3-4 days old) were placed in top screened cylindrical cages of 160  $\text{cm}^3$  (radius = 2.7 cm, height = 7 cm), and exposed for 20 minutes to the treated membranes (Stuart *et al.* 2000). Following the exposure period, the reservoir was removed and *Culicoides* were kept for 24h with a 10% sugar solution provided on cotton wool pads. The number of dead, live, engorged and not engorged females was recorded to assess the blood feeding and the 24h mortality rates. The experiment was repeated three times (April 2012), using new individuals, new blood and new treated membrane at each replicate.

#### *Experiment 2: sugar feeding inhibition and mortality of essential oils against C. obsoletus*

The same experimental design as experiment (1) performed with laboratory-reared *C. nubeculosus* should have been used with field collected *C. obsoletus*, but after few unsuccessful attempts to engorge them using the artificial blood feeding system, a different experimental design (protocol) was used. The concentrations of DEET used in this experiment were reduced to 1% and 5% as results of experiment 1 showed high performances of 5% and 20% concentrations.

One hundred microliters of the 11 ethanol diluted solutions (ethanol as control, essential oils at 1% (0.104  $\mu\text{l}$  a.i./ $\text{cm}^2$ ), DEET at 1% (0.104  $\mu\text{l}$  a.i./ $\text{cm}^2$ ) and 5% (0.520  $\mu\text{l}$  a.i./ $\text{cm}^2$ ) and deltamethrin at 0.004 mg a.i./ $\text{cm}^2$ ), were pipeted over a filter paper (Whatman N°1 filter paper; 90g/ $\text{m}^2$  and a surface of 9.6  $\text{cm}^2$ ) previously soaked with 150 $\mu\text{l}$  of colored sugar solution (10 drops of food coloring on 100 cl of water). Filter papers were allowed to ambient air-dry for 10 minutes before the test. About 50 unsorted *Culicoides* were placed in top screened cylindrical cages of 229  $\text{cm}^3$  (radius = 2.7 cm, height = 7 cm) and exposed for 1 hour to the treated filter-papers. Following the exposure period, the treated filter-papers were removed and *Culicoides* were kept for 24h with a 10% sugar solution provided on cotton wool pads. Following trials, the number of dead, live, colored and not colored females was recorded to assess the sugar feeding and the 24h mortality rates. The experiment was repeated three times (June 2012), using new individuals, new colored sugar solution and new treated filter-paper at each replicate.

### **Statistical analysis** (to be completed)

Following WHO recommendations (WHO 1981, WHO 2013) for susceptibilities studies, only replicates with control mortality <20% were retained for data analysis, control mortalities which exceeded 5%, were corrected using Abbott's method and those <5% were not corrected. The engorgement rate was calculated as the number of engorged females / total number of females x 100.

The best statistical approach is been discussed with authors...

### **Results** (to be completed)

Effects of essentials oils on *Culicoides* feeding and survival were evidenced (Fig 1 and 2), indeed, the repellent and/or lethal performances of few plant extracts were similar or better than synthetic gold standards repellent DEET and insecticide deltamethrin (Table 1). These positive controls show in both experiments similar characteristic effects, as DEET which reduce considerably the feeding rate (<5 %) and inflict mortality (<50%) and as deltamethrin with average feeding rate and mortalities ranged between 25 % and 50 %.

In experiment 1, *C. nubeculosus* show a higher feeding rate unexpectedly with neem oil extract (46.6 %) better than the control with ethanol (43.8 %). The best repellent performances with feeding rate lower than 5 %, were obtained with DEET 5% (0.0 %) and 20% (2.1 %) treatments, and only essential oils of geranium (0.0 %) and lemongrass (3.8 %) exhibited similar degree of repellency. In terms of lethality, lemon-eucalyptus essential oil (43.3 %) and DEET 5% (48.5 %) exhibited higher mortality than deltamethrin (36.5 %) (Fig 1). Statistical significance ?

In experiment 2, very few females of *C. obsoletus* were found engorged with colored sugar, hence, feeding rates were very low (i.e. control with ethanol 6.2%), none fed individuals were found with DEET 1% and 5% and essential oils of geranium and lemongrass. The feeding rate obtain with deltamethrin is surprisingly high, with a maximum observed at 40.1% compare to the control with a maximum observed at 7.9%. Mortality obtain with essential oil of lemongrass (83.6%) was higher than deltamethrin (43.3%) (Fig 2). Statistical significance ?

## Discussion (to be completed)

This study presents a novel technique that permits rapidly the assessment of the efficiency of repellent active ingredients in the laboratory and field conditions against *Culicoides* biting midges. The results of this study are the first repellent screening assessment across *Culicoides* species in Europe. All essential oils evaluated have an effect on the feeding and survival in targeted *Culicoides* species at varying degrees; among them geranium and lemongrass have excellent repellent properties comparable/better to DEET. Previous studies have focused the performances of essential oils against *Culicoides* to prevent them to bite humans and it was documented that eucalyptus-based repellent (PMD) reduced *C. impunctatus* landings and protect humans for 8h at 99% (23). Essential oil of tea tree also showed 80-95% repellence up to 3h against *C. ornatus* and *C. immaculatus* when applied to lower legs at 1.8 g per lower leg (31). Lemongrass-based lotion applied on the forearms showed high efficacy against *C. pachymerus*, up to 5 h post-application (29). When light trap nets were treated with essentials oils to quantify the repellent effect traduced by the reduction of individuals caught compared to an untreated trap, it was found that oregano and tea tree (24, 25) were efficient at repelling *C. imicola* from traps. In contrast, using the same methodology, essential oils of citronella (8) and neem showed no significant effect reducing catches. More contrasting, it was documented that lemon-eucalyptus essential oil attracted *C. imicola* (25). In laboratory-based assays using a Y tube olfactometer it was observed that essential oils of lemon eucalyptus (23, 25), neem (28), eucalyptus and lavender repel *Culicoides*.

Divergences between laboratory and field results across studies (including the present study) highlight one of the major difficulties in interpretation of field based bioassay data. These discrepancies have been attributed to the different mesh sizes used in net treatments (32), or the meshes material (8), or the use of olfactometer which could be considered as unnatural behavior in a confined space (33).

Some mayor difficulties encountered when working with field *Culicoides* species (complexity of testing in field conditions) are their small size, their short seasonality peak, their not-well documented behavior and, with the scarce control baseline information, the development and standardisation of appropriated technique are long. Taking into account the above, the present study provide useful information for further studies, as technical improvements for screening potential repellents. For example, field collected *C. obsoletus* from Terramo int he central Italian region of Abruzzo could be fed on artificial membranes with a feeding rate of about 6% using parafilm and sheep blood (34). These results are similar to those obtained in the present study, where the *C. obsoletus* have a feeding rate of 6.2% but using filter paper with sugar. This could demonstrate that the use of paper with sugar is equivalent to the use of blood for repellency testing.

The alternative experimental design of using paper with sugar in the field was important to circumvent logistical difficulties in feeding field-collected species with artificial membranes and blood. Artificial membranes have been used routinely in *Culicoides* colonies since 2010, after been fed for 30 years directly with mice.

It would be desirable to investigate the repellent efficiency against other *Culicoides* species of veterinary and/or public health interests given that repellents only provide minimal and temporary relief and that they are not considered a long-term solution (23, 35, 36). Despite the lack of information, repellents are presently the only means of self-protection against biting by modifying the olfaction cues of *Culicoides*, which are essential for the location and identification of host required for a blood meal in order to grow their eggs (36). But, it should be taken into account that some volatiles cues from flowers are used by adult midges to locate sugar source and suitable oviposition or resting sites (36) and they risk to act as attractant and not as repellents for different species. It was recorded that *Culicoides* are attracted by carbon dioxide (37), lactic acid (38) and 1-octen-3-ol (39) (Blackwell *et al.* 1996), thus, it was recommended to avoid attractants-based products in control programs (25).

Fields trials should be complemented with electrophysiological assays, which aim to quantify the odour response of a given molecule by recording the magnitude of the electrical signal from the insect's antennae when exposed to a given molecule/active ingredient. These hyphenated techniques can be helpful to identify relevant components that can be integrated into methods for the management and control. The complex mixture of alkaloid, phenolic and terpenoid compounds of essential oils and the joint contribution of the natural molecules to insect repellence may also slow the development of resistance.

## **Conclusion** (to be completed)

Geranium and lemongrass showed excellent repellent properties similar to DEET, with a feeding inhibition > 90% against laboratory-reared *C. nubeculosus* and field-collected *C. obsoletus*.

A dose of 5% of geranium or lemongrass would offer 100% feeding inhibition against both species of *Culicoides*, but the duration of this protection should be consider in further studies. Even if blood-feeding and sugar-feeding inhibition assays were performed with two different methods, the observed effects are similar. Same method should be used for both species to allow comparable results.

The present study demonstrated the difficulty of evaluating the repellent effect. *Culicoides* research is certainly hindered by the difficulties associated with the lack of knowledge, but with novel approaches like the present study alternative integrated vector control strategies could be developed.

## Acknowledgements

This study was funded by EU grant FP7-261504 and is catalogued by the EDENext steering committee as EDENext manuscript XXXX. The authors are grateful to Jacques Virolles and family, farmers from Corrèze who permit us to enter in their farms and run our tests.

## References

1. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* 2000;45:307-40.
2. Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends in Microbiology.* 2009;17:172-8.
3. Veronesi E, Henstock M, Gubbins S, Batten C, Manley R, Barber J, *et al.* Implicating *Culicoides* biting midges as vectors of Schmallenberg virus using semi-quantitative RT-PCR. *PLoS ONE.* 2013;8(3).
4. Meiswinkel R, LEO B. African horsesickness epidemiology: five species of *Culicoides*. *Journal of Veterinary Res.* 1994;61.
5. WHO. PESTICIDES AND THEIR APPLICATION. 2006.
6. Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaeartic. *Med Vet Entomol.* 2008;22:175-87.
7. Caporale V, Giovannini A. Bluetongue control strategy, including recourse to vaccine: a critical review. *Rev - Off Int Epizoot.* 2010;29(3):573-91.
8. Page PC, Labuschagne K, Nurton JP, Venter GJ, Guthrie AJ. Duration of repellency of N,N-diethyl-3-methylbenzamide, citronella oil and cypermethrin against *Culicoides* species when applied to polyester mesh. *Vet Parasitol.* 2009;163:105-9.
9. Papadopoulos E, Bartram D, Carpenter S, Mellor PS, Wall R. Efficacy of alphacypermethrin applied to cattle and sheep against the biting midge *Culicoides nubeculosus*. *Vet Parasitol.* 2009;163:110-4.
10. Schmahl G, Mehlhorn H, Abdel-Ghaffar F, Khaled Al-Rasheid K, Schumacher B, Jatzlau A, *et al.* Does rain reduce the efficiency of Butox 7.5 pour on (deltamethrin) against biting midges (*Culicoides* specimens)? *Parasitol Res.* 2009;105:1763-5.
11. Mullens B, Gerry A, Sarto I, Monteys V, Pinna M, González A. Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. *J Med Entomol.* 2010;47:106-10.
12. Papadopoulos E, Rowlinson M, Bartram D, Carpenter S, Mellor PS, Wall R. Treatment of horses with cypermethrin against the biting flies *Culicoides nubeculosus*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Vet Parasitol.* 2010;169:165-71.

13. Reeves WK, Peiris KHS, Scholte EJ, Wirtz RA, Dowell FE. Age-grading the biting midge *Culicoides sonorensis* using near-infrared spectroscopy. *Med Vet Entomol.* 2010;24:32-7.
14. Griffioen K, van Gemst DBJ, Pieterse MC, Jacobs F, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MMS. *Culicoides* species associated with sheep in the Netherlands and the effect of a permethrin insecticide. *Vet J.* 2011;190:230-5.
15. Venail R, Mathieu B, Setier-Rio ML, Borba C, Alexandre M, Viudes G, *et al.* Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. *J Med Entomol.* 2011;48:351-7.
16. Del Rio R, Venail R, Calvete C, Barceló C, Baldet T, Lucientes J, *et al.* Sensitivity of *Culicoides obsoletus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) to deltamethrin determined by an adapted WHO standard susceptibility test. *Parasitology.* 2014;141(4):542-6.
17. Maia MF, Moore SJ. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar J.* 2011;10 Suppl 1.
18. Ellse L, Wall R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Med Vet Entomol.* 2013.
19. Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol.* 2006;51:45-66.
20. Brown M, Hebert AA. Insect repellents: an overview. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(2 Pt 1):243-9.
21. Mullens BA. In vitro assay for permethrin persistence and interference with bloodfeeding of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) on animals. *J Am Mosq Control Assoc.* 1993;9(3):256-9.
22. de Raat IJ, van den Boom R, van Poppel M, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MMS. The effect of a topical insecticide containing permethrin on the number of *Culicoides* midges caught near horses with and without insect bite hypersensitivity in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2008;133:838-42.
23. Trigg JK. Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Scotland. *J Am Mosq Control Assoc.* 1996;12(2 Pt 1):329-30.
24. Braverman Y, Chizov-Ginzburg A. Repellency of synthetic and plant-derived preparations for *Culicoides imicola*. *Med Vet Entomol.* 1997;11(4):355-60.
25. Braverman Y, Chizov-Ginzburg A, Mullens BA. Mosquito repellent attracts *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol.* 1999;36(1):113-5.
26. Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour Technol.* 2010;101(1):372-8.
27. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46(2):446-75.
28. Blackwell A, *al e.* Toward development of neem-based repellents against the Scottish Highland biting midge *Culicoides impunctatus*. 2004.

29. Santamaría E, Cabrera OL, Zipa Y, Pardo RH. [Field efficacy of repellent formulation containing para-menthane-3,8-diol and lemongrass against *Culicoides pachymerus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Colombia]. *Biomedica*. 2012;32(3):457-60.
30. Wilson A, P M. Bluetongue in europe: vectors, epidemiology and climate change. 2008.
31. Greive K, Staton JA, Miller PF, Peters BA, Oppenheim VMJ. Development of Melaleuca oils as effective natural-based personal insect repellents. *Aust J Entomol*. 2010;49:40–8.
32. Del Rio R, Barceló C, Lucientes J, Miranda MA. Detrimental effect of cypermethrin treated nets on *Culicoides* populations (Diptera; Ceratopogonidae) and non-targeted fauna in livestock farms. *Vet Parasitol*. 2014;199(3-4):230-4.
33. Bernier UR, Furman KD, Kline DL, Allan SA, Barnard DR. Comparison of contact and spatial repellency of catnip oil and N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) against mosquitoes. *J Med Entomol*. 2005;42(3):306-11.
34. Goffredo M, Romeo G, Monaco F, Di Gennaro A, Savini G. Laboratory survival and blood feeding response of wild-caught *Culicoides obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. *Vet Ital*. 2004;40(3):282-5.
35. Carpenter S, Eyres K, McEndrick I, Smith L, Turner J, Mordue W, *et al*. Repellent efficiency of BayRepel against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasitol Res*. 2005;95(6):427-9.
36. Logan JG, Cook JI, Mordue AJ, Kline DA. Understanding and exploiting olfaction for the surveillance and control of *Culicoides* biting midges (Ceratopogonidae). In: Takken W, Knols BJ, editors. *Ecology and Control of Vectors of Infectious Diseases: Olfaction in vector-host interactions*. 2. Wageningen: Wageningen Academic; 2010.
37. Mullens BA. Flight activity and response to carbon dioxide of *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in southern California. *J Med Entomol*. 1995;32(3):310-5.
38. Lillie TH, Kline DL, Hall DW. Host-seeking activity of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) near Yankeetown, Florida. *J Am Mosq Control Assoc*. 1988;4(4):485-93.
39. Blackwell A, Dyer C, mordue Aj, Wadhams Lj, Mordue W. The role of 1-octen-3-ol as a host-odour attractant for the biting midge, *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, and interactions of 1-octen-3-ol with a volatile pheromone produced by parous female midges. *Physiological Entomology*. 1996;21(1):15-9.



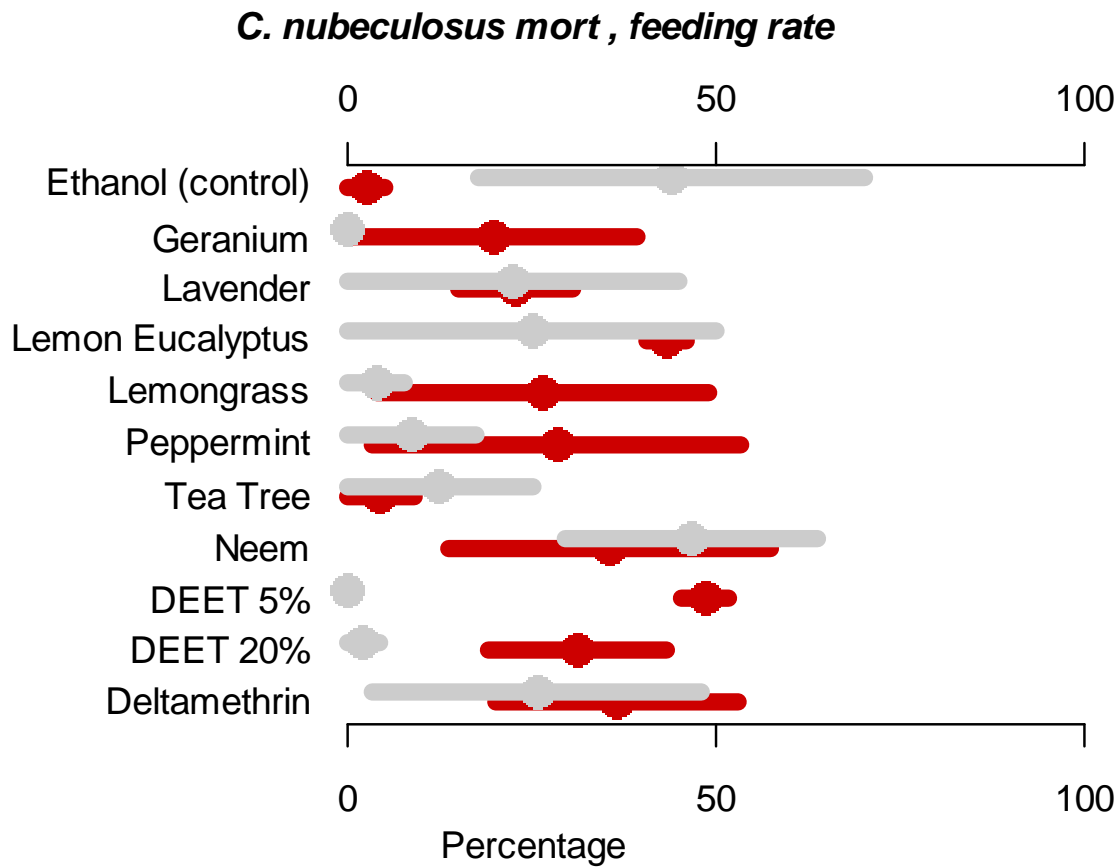
## Tables

**Table 1.** Average feeding and mortality rates (min-max) of *Culicoides nubeculosus* and *Culicoides obsoletus* after exposure to plant derived and synthetic treatments

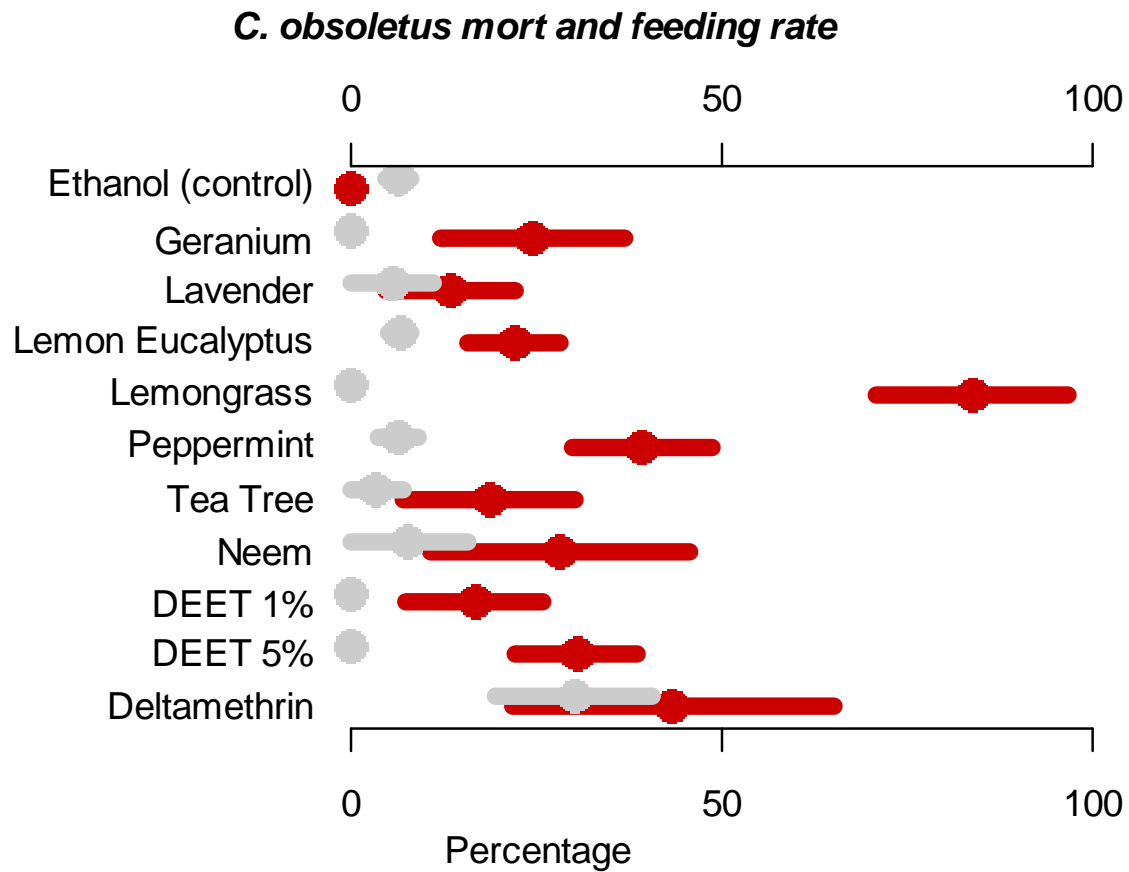
Treatment	<i>C. nubeculosus</i>		<i>C. obsoletus</i>	
	Feeding rate %	Mortality %	Feeding rate %	Mortality %
Ethanol (control)	43.8 (17.6-70.0)	2.5 (0.0-5.0)	6.2 (4.5-7.9)	0.0 (0.0-0.0)
Geranium	0.0 (0.0-0.0)	19.6 (0.0-39.3)	0.0 (0.0-0.0)	24.4 (12.2-36.8)
Lavender	22.5 (0.0-45.0)	22.8 (15.0-30.6)	5.5 (0.0-11.1)	13.4 (4.5-22.2)
Lemon-eucalyptus	25 (0.0-50.0)	43.3 (40.6-46.0)	6.5 (5.1-7.9)	22.0 (15.8-28.2)
Lemongrass	3.8 (0.0-7.7)	26.3 (3.8-48.9)	0.0 (0.0-0.0)	83.6 (70.7-96.5)
Peppermint	8.6 (0.0-17.2)	28.3 (3.4-53.3)	6.4 (3.7-9.1)	39.1 (29.6-48.5)
Teatree	12.5 (0.0-25.0)	4.5 (0.0-8.9)	3.4 (0.0-6.8)	18.6 (7.0-30.1)
Neem	46.6 (29.4-63.6)	35.4 (13.6-57.1)	7.8 (0.0-15.6)	28.0 (10.6-45.5)
DEET 1 %	NA	NA	0.0 (0.0-0.0)	16.6 (7.0-25.7)
DEET 5 %	0.0 (0.0-0.0)	48.5 (45.4-51.6)	0.0 (0.0-0.0)	30.4 (22.2-38.6)
DEET 20 %	2.1 (0.0-4.2)	31.2 (19.0-43.3)	NA	NA
Deltamethrin	25.6 (3.2-48.0)	36.5 (20.0-53.0)	30.1 (19.6-40.1)	43.3 (21.7-64.8)

NA: not performed

Figures



**Figure 1.** Feeding rate (grey) and mortality rate (red) of *Culicoides nubeculosus*, observed 24 hours after 20 min exposure to different treatments



**Figure 2.** Feeding rate (grey) and mortality rates (red) of *Culicoides obsoletus*, observed 24 hours after 1 hour exposure to different treatments.

## Discussion du chapitre 3

Les études que nous avons conduites avaient comme but principal d'**évaluer l'efficacité des produits insecticides appliqués directement sur les animaux et des répulsifs contre les *Culicoides***. Elles nous ont permis de tester non seulement l'efficacité létale et répulsive de quelques produits contre les *Culicoides*, mais surtout, les procédures en elles-mêmes que nous avons adaptées, modifiées et développées avec l'intention de standardiser les méthodes d'évaluation.

Aux difficultés liées au modèle *Culicoides*, auxquelles nous nous sommes heurtés auparavant et que nous avons déjà mentionnées dans la discussion du chapitre antérieur, viennent s'ajouter celles de i) la complexité de mener des tests sur le terrain avec des animaux disponibles et à proximité de l'insectarium ou du site de capture et ii) de la réussite très limitée du gorgement artificiel des espèces sauvages. Néanmoins, nous avons réalisé les études en essayant de les contourner.

Le test réalisé sur le terrain en exposant les *Culicoides* directement à la partie intérieure de la cuisse d'ovins traités avec du Butox 7.5 nous a permis de vérifier, avec cette nouvelle approche, que les évaluations menées en utilisant d'autres techniques (comme l'exposition aux poils coupés d'animal traité) surestimaient l'efficacité et la persistance des produits. Il a permis aussi de mettre en évidence la perte d'efficacité du produit dans le temps, observation qui avait déjà été signalée avec d'autres substances actives (Carpenter *et al.*, 2008). Notre estimation de la persistance (10 jours) est inférieure à celles obtenues ailleurs (5 semaines) (Schmahl *et al.*, 2008, 2009a, 2009b ; Mehlhorn *et al.*, 2008a, 2008b) et nettement inférieure à celle annoncée par le fabricant (8-10 semaines) (<http://www.butox-info.com/butox/spc-butox75.asp>). Le test que nous avons mené en laboratoire, en exposant les *Culicoides* à des souris traitées, confirme la faible efficacité et la courte persistance du Butox 7.5 observée sur le terrain en traitant des moutons. L'obtention de résultats analogues obtenus par ces deux approches différentes, nous mène à considérer les essais avec les souris comme plus avantageux par rapport à ceux avec les moutons. En effet, ils ont moins de contraintes logistiques et génèrent des résultats équivalents que ceux sur le terrain, permettant un criblage rapide des produits à application cutanée. Avec cette approche, nous avons testé 4 produits, le Butox 7.5, la Ectotrène (cyperméthrine) à base de pyréthriinoïdes, le Sebacil (phoxime) à base d'organophosphorés, tous les trois très utilisés en Europe contre les *Culicoides*, et le Vectochlor ou Cyperclor (chlorpyrifos-méthyl, cyperméthrine et citronnelle) un mélange de pyréthriinoïde, d'organophosphoré et de dérivé de plantes, utilisé en Amérique du Sud et en Afrique de l'ouest contre les mouches. Nous avons prévu de quantifier le taux de gorgement à chaque exposition, mais pendant la durée du test, elle n'a jamais dépassé 25% sur les souris témoins. Nous avons donc opté pour ne pas exploiter ces résultats et seuls ceux sur la mortalité ont été pris en compte, présentés et analysés. Les deux produits à base d'organophosphorés se sont démarqués par leurs bonnes performances les premiers jours, mais ils ont perdu très vite leur efficacité. Par contre, les pyréthriinoïdes, moins performants au début, se sont montrés plus efficaces dans le temps avec des persistances d'environ 2 semaines,

14 jours pour le Butox 7.5 et 17 jours pour l'Ectotrine selon nos estimations. La quantité théorique de substance active suite au traitement avec les deux produits est 39 mg de deltaméthrine/m<sup>2</sup> et 259 mg de cyperméthrine/m<sup>2</sup>, c'est-à-dire 3 fois plus que la concentration diagnostique calculée pour la deltaméthrine (11,13 mg/m<sup>2</sup>) et 1,5 fois plus que celle de la cyperméthrine (143,9 mg/m<sup>2</sup>). La concentration diagnostique est calculée comme 2 fois la dose qui donne 99 % de mortalité. En principe, 100 % des *Culicoides* qui rentrent en contact avec ces deux concentrations de substances actives sont tués, mais ce n'est pas le cas. Une perte de la biodisponibilité du produit après le traitement est évidente. La cyperméthrine, moins létale que la deltaméthrine selon les tests de sensibilité, serait moins vite dégradée et qui resterait plus disponible pour induire la mortalité. Poursuivre des études en utilisant cette approche en laboratoire permettra de comparer des produits, valider leur efficacité et faire des recommandations pour les stratégies de lutte.

Concernant l'étude menée sur l'inhibition du repas, elle nous a permis de confronter deux nouvelles approches, l'une qui visait à quantifier l'inhibition du repas de sang et l'autre qui visait l'inhibition du repas de sucre, en réponse à l'impossibilité d'utiliser la première avec des populations sauvages. Le faible taux de gorgement obtenu dans le témoin (<10 %) en utilisant le sucre avec *C. obsoletus*, ne permet pas de quantifier le taux d'inhibition du repas et les résultats obtenus avec cette méthode ne peuvent pas être exploités. Le criblage effectué sur plusieurs produits comme des huiles essentielles, des répulsifs et un insecticide, en utilisant la méthode du sang avec *C. nubeculosus*, confirme les caractéristiques répulsives du gold standard des répulsifs, le DEET, même à faibles concentrations, et démontre que des huiles essentielles peuvent être aussi efficaces que des produits synthétiques. En effet, les huiles essentielles de géranium et de citronnelle ont montré des capacités répulsives équivalentes à celles du DEET et des capacités létales équivalentes à celles de la deltaméthrine. Les autres huiles essentielles ont montré de plus faibles performances. Par contre, le répulsif neem, qui avait fait preuve d'efficacité dans un olfactomètre (Blackwell *et al.*, 2004), a montré de médiocres performances, observées récemment aussi dans un olfactomètre (González *et al.*, 2014). Il conviendrait d'améliorer le test d'inhibition du repas de sucre afin d'obtenir des résultats comparables qui permettront d'optimiser les stratégies de lutte existantes.



## **Chapitre 4 :**

**Comment évaluer l'efficacité des  
matériaux imprégnés ou traités  
d'insecticide contre les *Culicoides* ?**





## Introduction du chapitre 4

---

Peu d'études se sont intéressées à l'effet létal des insecticides sur un support solide comme des moustiquaires en aluminium, le bois, le plastique ou des vêtements (voir Chapitre 1). Là encore, aucune procédure expérimentale standardisée n'existe.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'efficacité des matériaux imprégnés ou traités d'insecticides contre les *Culicoides*.

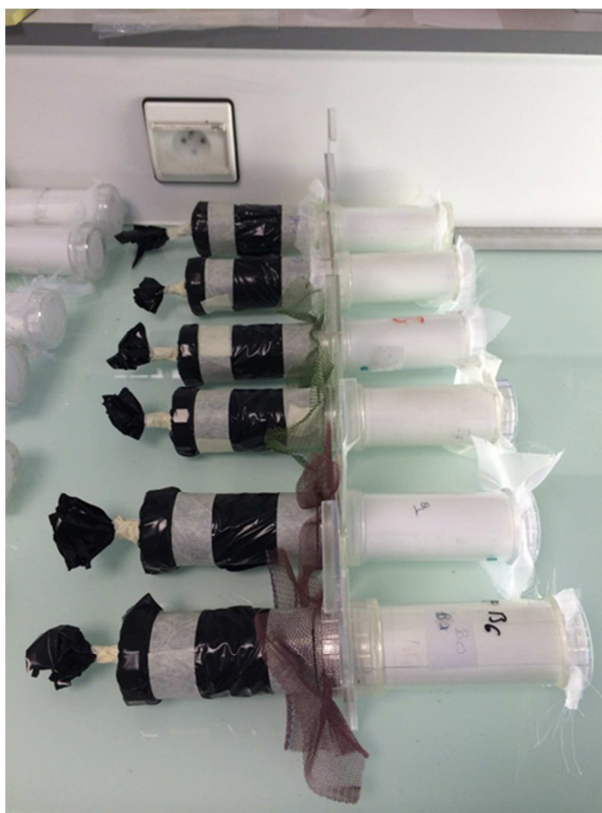
Deux protocoles expérimentaux ont été proposés de manière à standardiser l'évaluation de l'effet létal et de la persistance de produits insecticides commercialisés pour application sur support. Le premier, adaptation pour les *Culicoides* du test en tunnel, permet de quantifier la mortalité induite par le contact, la persistance et la réduction du taux de passage des *Culicoides* par rapport à des moustiquaires imprégnées industriellement. Cette procédure consiste à séparer les *Culicoides* et un appât avec une moustiquaire imprégnée puis d'enregistrer le nombre d'individus qui la traversent, qui meurent suite au contact, et à suivre son efficacité dans le temps. Le deuxième, le test en cône, permet de quantifier la mortalité induite par le contact et la persistance d'une formulation insecticide appliquée sur un substrat solide (ciment, bois, plastique). Le procédé consiste à exposer les *Culicoides* à une surface traitée et à enregistrer le nombre d'individus morts suite au contact, et à suivre son efficacité dans le temps. Nous présentons ici les protocoles détaillés et les résultats préliminaires.

## 4.1 Protocole et premiers résultats pour le test en tunnel adapté pour évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées contre les *Culicoides*

---

Le test en tunnel, procédure utilisée notamment par certains centres collaborateurs OMS, permet d'évaluer l'impact des moustiquaires imprégnées d'insecticides sur des moustiques adultes en laboratoire. La procédure consiste à placer une moustiquaire imprégnée dans un tunnel rectangulaire de verre de 25 x 25 x 60 cm aboutissant à deux compartiments, le petit (1/3 du tunnel) où est placé un appât (cobaye maintenu en contention) et le grand où sont placées de jeunes femelles. Les femelles sont lâchées le soir, laissées toute une nuit, puis récupérées le lendemain matin dans chaque compartiment, dénombrées et classées en : i) gorgées/vivantes/petit compartiment, ii) gorgées/vivantes/grand compartiment, iii) gorgées/mortes/petit compartiment, iv) gorgées/mortes/grand compartiment, v) non gorgées/vivantes/petit compartiment, vi) non gorgées/vivantes/grand compartiment, vii) non gorgées/mortes/petit compartiment et viii) non gorgées/mortes/grand compartiment. L'analyse des résultats obtenus par cette méthode permet d'obtenir le degré de protection individuelle (PI) en déterminant le nombre de femelles gorgées (vivantes ou mortes) quel que soit le compartiment, le degré de protection collective (PC) en déterminant le nombre de femelles gorgées vivantes quel que soit le compartiment et la mortalité induite par l'insecticide en déterminant le nombre total de femelles mortes. L'effet répulsif de la moustiquaire peut aussi être obtenu en déterminant le nombre de femelles qui sont restés dans le grand compartiment par rapport au nombre total de femelles. Pour que le test soit valide, la mortalité du témoin doit être inférieure à 20 % et le taux de gorgement supérieur à 45 %.

Nous avons observé l'absence d'intérêt, lorsqu'elles sont placées dans un volume important, des femelles *C. nubeculosus* pour l'appât souris lors de la mise au point du test pour l'évaluation des formulations d'application cutanée (Chapitre 3). Nous avons modifié la procédure et le matériel d'origine avec plusieurs essais. Nous avons réduit l'échelle du système en utilisant deux tubes OMS, fixés entre eux et séparés par une moustiquaire non imprégnée. Dans un tube, nous avons placé une souris anesthésiée et dans l'autre, nous avons lâché une cinquantaine de jeunes femelles. Nous avons permis le contact pendant 30 minutes, puis retiré la souris encore endormie. L'inconvénient avec ce type de système était une perte importante de femelles (échappement, écrasement) dans le compartiment souris lors du retrait de cette dernière. Nous avons ensuite opté pour exposer la souris à l'extérieur du tube OMS. Nous avons placé les 2 tubes à la verticale pour pouvoir poser la souris anesthésiée sur le tube. Dans cette configuration, la majorité des femelles est restée dans le tube inférieur, très peu de passage a été constaté, et celles qui ont réussi à passer au tube supérieur ont eu du mal à atteindre la souris, très peu de gorgement ayant été observé. Finalement, nous nous sommes focalisés sur le taux de passage étant donnée la difficulté à évaluer le taux de gorgement. Nous avons donc une source lumineuse pour attirer les *Culicoides*, puisqu'ils présentent un phototropisme important. Les tubes ont été placés à l'horizontale. L'un d'eux, celui où les femelles sont placées, a été couvert d'un plastique noir pour l'obscurcir et favoriser le passage des *Culicoides* attirés par la lumière (Figure 4.1).

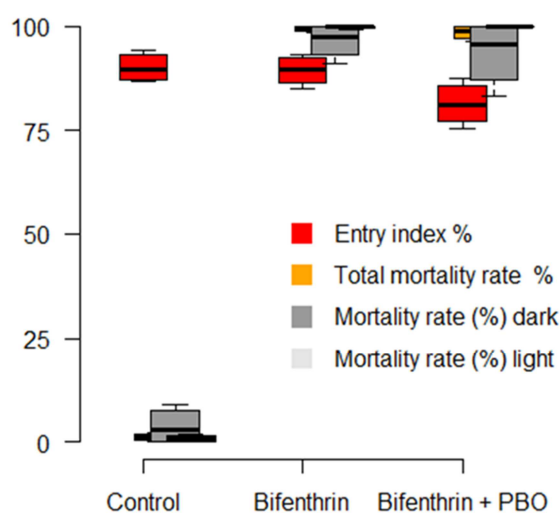


**Figure 4.1** Test tunnel adapté pour évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées contre les *Culicoides*.

Avec cette procédure, nous avons évalué l'efficacité de deux moustiquaires en polyester avec une maille de 1,0 x 1,5 mm (équivalent à environ 66 trous par cm<sup>2</sup>), imprégnées avec des concentrations de 200 mg de biféthrine (pyréthrianoïde) par m<sup>2</sup>, et pour l'une d'elle en plus du PBO, un synergisant généralement associé aux pyréthrianoïdes, à concentration inconnue. Ces échantillons nous ont été fournis par le fabricant *Intelligent insect control* (<http://www.insectcontrol.net/IIC/>). Une moustiquaire en polyester avec une maille de 1,0 x 1,0 mm (équivalent à 100 trous par cm<sup>2</sup>) a été utilisée comme témoin. Une centaine de jeunes femelles *C. nubeculosus* a été placée dans le tube sombre, et autorisée à traverser la moustiquaire pendant 30 minutes. Le nombre d'individus dans chaque tube a alors été relevé.

Les premiers résultats (Figure 4.2) montrent que ces deux moustiquaires (66 trous par cm<sup>2</sup>), conçues pour les moustiques, diminuent peu le passage de *C. nubeculosus*. En effet, en moyenne, 89,7 % des individus réussissent à traverser la moustiquaire imprégnée avec la biféthrine et 81,5% celle avec la biféthrine et le PBO, alors que 90,2 % le font à travers la moustiquaire témoin. En revanche, en termes de mortalité à 24 h après exposition, elles s'avèrent très efficaces puisque plus de 99 % des individus qui les traversent, meurent dans le

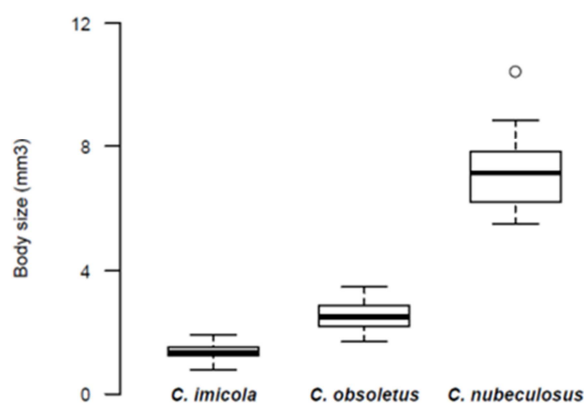
tube exposé à la lumière, contre moins de 1 % dans le témoin. Mais aussi, plus de 90 % des individus restés dans le tube sombre meurent, contre moins de 5 % dans le témoin. Globalement, la mortalité est supérieure à 98 % pour les individus exposés aux moustiquaires imprégnées et de 1 % pour le témoin. Néanmoins, le passage des *Culicoides* implique une protection non immédiate (avec une mortalité différée) qui suppose la possibilité d'une transmission à l'animal à protéger en cas de présence de *Culicoides* infectés. En revanche, ce délai peut suffire pour mettre en quarantaine un animal infecté et réduire la transmission de la maladie.



**Figure 4.2** Premiers résultats de l'efficacité de moustiquaires imprégnées sur le taux de passage et la mortalité induite de *Culicoides nubeculosus* suite à l'adaptation du test en tunnel.

Après échange avec le fabricant, nous avons obtenu des moustiquaires non traitées de différentes mailles : 382, 245, 96, et 44 trous/cm<sup>2</sup>, dans l'idée de déterminer la maille permettant de bloquer le passage des *Culicoides*. Nous avons observé que les deux plus fines (382 et 245 trous/cm<sup>2</sup>) ont réussi à bloquer totalement le passage des individus *C. nubeculosus*, alors que les autres laissaient passer 70 % (96 trous/cm<sup>2</sup>) et 86 % (44 trous/cm<sup>2</sup>) des individus. Parallèlement, en collaboration avec l'ISRA au Sénégal, la même expérimentation a été réalisée avec des individus *C. imicola* collectés sur le terrain. En effet, *C. nubeculosus* présente une taille bien supérieure (7,1 mm<sup>3</sup>) aux espèces associées à la transmission du virus de la FCO comme *C. imicola* (1,1 mm<sup>3</sup>) et *C. obsoletus* (2,5 mm<sup>3</sup>) (Figure 5.3). Cette taille des *Culicoides* a été calculée en élevant au cube la longueur de l'aile (Briegel 1990) de 30 individus issus de tests précédents. Les résultats confirmeront que la plus fine maille (382 trous/cm<sup>2</sup>) bloque totalement le passage de *C. imicola*, environ 7 fois plus petit que *C. nubeculosus*, alors que celle à 245 laisse passer 77 % et les plus grandes sont perméables à 100 %. Néanmoins, en conditions d'élevage, des moustiquaires avec de si fines mailles sont difficilement utilisables, car elles limiteraient grandement la ventilation des bâtiments d'élevage, d'autant plus qu'elles se colmatent très vite à cause de la poussière. De ce fait, nous avons demandé au fabricant d'imprégner les moustiquaires de maille à 96 et 245 trous/cm<sup>2</sup> avec différentes substances actives aux doses diagnostiques déterminées dans

les études de sensibilité (Chapitre 2). L'évaluation de ces moustiquaires n'a pas pu être réalisée dans le temps imparti pour cette thèse. Elle sera menée au Sénégal en première intention avec *C. imicola*.



**Figure 4.3** Taille de *Culicoides nubeculosus*, *C. imicola* et *C. obsoletus*, calculé en élevant au cube la longueur de l'aile.

## 4.2 Protocole et premiers résultats pour le test en cône adapté pour évaluer l'efficacité des supports traités contre les *Culicoides*

---

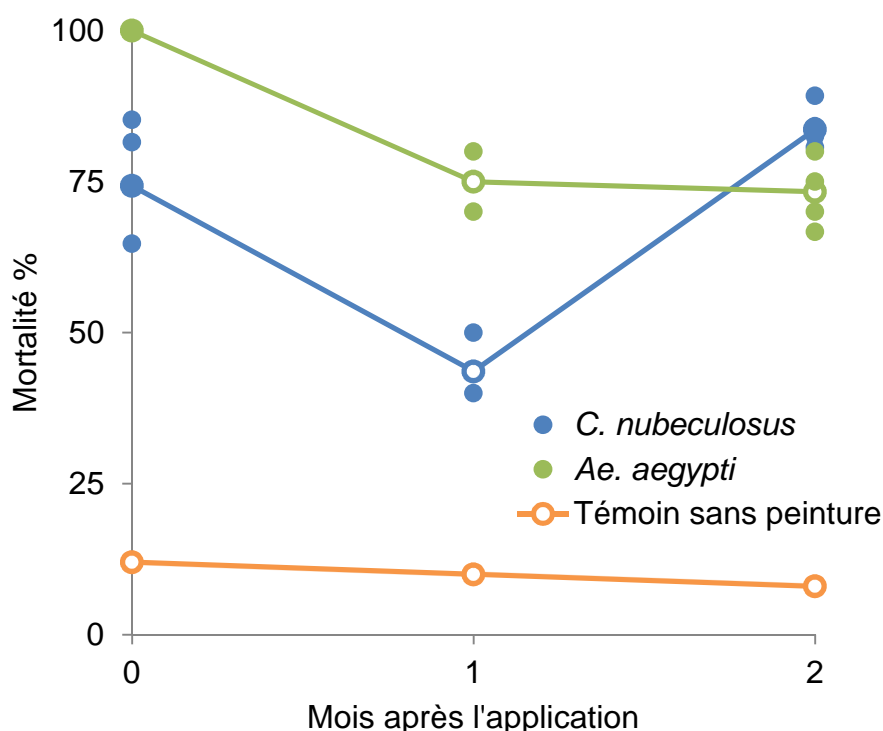
Le test en cône, procédure de référence OMS pour les moustiques, permet d'évaluer en laboratoire l'efficacité et la persistance d'un insecticide appliqué sur un support (tissu, moustiquaire, bois, ou ciment). Ces cônes transparents sont en PVC, une matière sur laquelle les moustiques ont des difficultés à se poser, permettant de maximiser le contact entre les moustiques et la surface traitée durant l'exposition. La procédure consiste à placer le cône sur le support à tester (moustiquaire placée sur un support à 40° et substrat solide à l'horizontale), puis d'introduire 15 jeunes femelles, de fermer l'orifice supérieur avec un bouchon en polyéthylène et d'exposer pendant 30 minutes les individus. Après exposition, les moustiques sont transférés dans un gobelet en plastique et maintenus dans une étuve en conditions contrôlées ( $27 \pm 1$  °C et  $90 \pm 10$  % d'humidité), pendant 24 h avec du jus sucré *ad libitum*. Après ce délai, le nombre de femelles mortes est compté. Pour que le test soit valide, la mortalité du témoin doit être inférieure à 20 %, sachant que les données brutes sont corrigées si cette mortalité est comprise entre 5 et 20 % ou utilisées telles qu'elles si elle est inférieure à 5 %. Les expositions sont répétées dans le temps afin d'obtenir la persistance du produit.

Par cette méthode, nous avons évalué l'efficacité d'une peinture insecticide, Inesfly IGR VET PYR, homologuée en Espagne en usage vétérinaire et conçue pour être utilisée sur les murs de bâtiments d'élevage (<http://www.inesfly.com>). Ce type de peinture microencapsulée a une grande efficacité et persistance contre les moustiques *Anopheles gambiae*, vecteurs de la malaria (100% des moustiques morts, 1 an après application) (Mosqueira *et al.*, 2010a, 2010b). Le fabricant nous a fourni un échantillon de cette peinture blanche à base d'alpha-cyperméthrine (0,7 %), de tétraméthrine (0,3 %) et de diflubenzuron (0,015 %) et un échantillon de la même peinture sans insecticide (témoin).

Trois blocs de ciment (20 x 20 x 2 cm) ont été utilisés. Un a été traité avec une seule couche de peinture insecticide. Un autre a été d'abord peint avec une couche de peinture sans insecticide, puis avec la peinture insecticide. Le dernier, servant de témoin, a été peint avec deux couches de peinture sans insecticide. Pour chaque couche (insecticide ou non), nous avons utilisé la dose recommandée par le fabricant (1 kg/6 m<sup>2</sup>) et un temps de séchage de 24 h à l'air ambiant a été respecté. Les cônes ont été fixés aux blocs placés à la verticale. Une centaine de femelles *C. nubeculosus* âgées de 3 jours n'ayant jamais pris un repas de sang a été placée dans le cône, puis le cône a été fermé avec un bouchon (Figure 5.5) pour une exposition de 30 minutes. Après exposition, les individus ont été transférés dans un tube OMS et maintenus pendant 24 h en conditions stables (environ 21°C et 70 % d'humidité) avec apport sucré, pour observation de la mortalité. Entre deux expositions les blocs ont été enveloppés dans un sac plastique noir et stockés dans une salle à 21°C et 60 % d'humidité, suivant la procédure décrite par Mosqueira et collaborateurs (Mosqueira 2010 a et b) afin de comparer avec ces études.

Nous avons observé une mortalité à 24 h, pour les blocs traités, comprise entre 50 et 75 % un jour après l'application de la peinture, inférieure à 50 % un mois après application et d'environ 20 % deux mois après. Les mortalités pour le bloc témoin n'ont pas dépassé 20 %. Au vu des résultats, moins probants que ceux connus chez les moustiques, nous avons réalisé un deuxième test avec deux blocs, l'un traité avec une seule couche de la peinture insecticide, l'autre restant nu. Nous avons quantifié la peinture perdue lors de l'application en pesant le matériel avant et après l'application, observant une perte d'environ 10 % de la peinture. Nous avons repris le test décrit précédemment en réalisant en parallèlement le même test à des femelles *Aedes aegypti* bora bora (souche sensible aux pyréthrinoïdes) de 4 jours.

Les premiers résultats (Figure 5.4), montrent une mortalité induite par la peinture faible et très variable sur *C. nubeculosus* (< 80 %) les deux premiers mois. *Culicoides nubeculosus* paraît moins sensible qu'*Aedes aegypti* bora bora, mais la même diminution d'efficacité est observée sur moustique 1 mois après l'application. Néanmoins, en observant les *Culicoides* pendant l'exposition, un effet *Knock-Down* (KD) est observé chez tous les individus au bout de 15 minutes, effet très variable et persistant de quelques minutes voire quelques heures.



**Figure 4.4** Premiers résultats sur l'efficacité de la peinture Inesfly IGR VET PYR contre *Culicoides nubeculosus* et *Aedes aegypti* évaluée avec le test en cône.



**Figure 4.5** Visualisation de l'effet *Knock Down* causé par la peinture insecticide, appliquée sur un support en béton, à des individus *Culicoides nubeculosus* lors de test en cône OMS. Cinq minutes séparent les prises de vue (de gauche à droite), la première étant prise immédiatement après la mise en contact.



## Discussion du chapitre 4

Ce chapitre a comme objectif principal d'évaluer l'efficacité des supports imprégnés ou traités d'insecticides contre les *Culicoides*. Les deux méthodologies utilisées, le test en tunnel adapté et le test en cône, nous ont permis d'explorer des éléments jusqu'à présent pas ou très peu étudiés, comme la réduction du taux de passage à travers une moustiquaire ou la mortalité induite par une peinture insecticide, qui à notre avis, sont des pistes intéressantes à explorer dans de futures stratégies de lutte contre les *Culicoides*.

En adaptant le test en tunnel classique, pour être utilisé avec des *Culicoides*, nous avons été en mesure d'évaluer le taux de passage qui peut s'avérer indispensable lors de la conception et la commercialisation de moustiquaires imprégnées dans un but de protection des animaux. En effet, une moustiquaire imprégnée laisse passer les *Culicoides* mais les tue dans les 24 heures, ce qui démontre l'intérêt de son utilisation en termes de protection d'animaux sensibles, et surtout de quarantaine d'animaux infectés. Ce test permet par ailleurs de faire un criblage rapide de moustiquaires permettant de tester un grand nombre de combinaison de substance active, concentration ou taille de maille.

Le test en cône nous a permis d'évaluer l'efficacité d'une peinture insecticide applicable sur un support solide. Dans le contexte des *Culicoides*, l'utilisation de peintures insecticides sur les murs intérieurs des bâtiments (où les animaux sont mis en stabulation) peut avoir un intérêt en présence d'espèces vectrices, capables de rentrer dans les bâtiments pour piquer comme *C. obsoletus* (Baldet *et al.*, 2008). En effet, nous avons observé sur le terrain lors des piégeages nocturnes, que cette espèce peut être capturée en grande quantité à l'intérieur des bâtiments (*Manuscrits #1 et #9*). Parallèlement, nous avons constaté que les femelles gorgées de sang se posaient sur les murs (observations personnelles non quantifiées). Ainsi, en se posant sur les murs traités, elles s'exposeraient à la peinture et mouraient suite au contact avec l'insecticide, ce qui réduirait la transmission des agents pathogènes. Néanmoins, nos premiers résultats sur la peinture contre les *Culicoides* en utilisant le test en cône, ne permettent pas de conclure sur son efficacité. Vraisemblablement, des problèmes méthodologiques persistent et des études complémentaires sont nécessaires.



**DISCUSSION**  
**GÉNÉRALE**



## Discussion générale

---

L'objectif principal de ce travail de thèse était de contribuer à **améliorer les connaissances sur les méthodes de lutte antivectorielle disponibles contre les *Culicoides* paléarctiques, vecteurs de virus émergents d'intérêt en santé animale** et ainsi apporter des éléments de réponse à plusieurs questions.

### **Les produits insecticides et répulsifs autorisés en Europe sont-ils efficaces pour le contrôle des *Culicoides* ?**

Jusqu'à présent, de nombreuses études portant sur l'efficacité des produits insecticides et répulsifs contre les *Culicoides* ont été menées en employant diverses méthodologies, propres à chaque laboratoire de recherche, rendant très difficile leur interprétation et leur comparaison. Ces études, parfois mal adaptées aux effets recherchés ou aux produits à tester, biaisent les résultats obtenus et surévaluent l'efficacité des produits.

Pour contrecarrer cette absence de procédures expérimentales standardisées et afin d'apporter des réponses plus congruentes sur l'efficacité des produits autorisés en Europe, nous proposons quelques méthodes d'évaluation orientées en fonction du produit à tester (substance active, type de formulation) et de l'objectif scientifique (sensibilité aux insecticides, efficacité létale ou répulsive).

### **Les *Culicoides* sont-ils sensibles aux substances actives insecticides ?**

Dans le contexte de la lutte anti-vectorielle, déterminer la sensibilité des vecteurs aux substances actives doit être la première étape pour l'évaluation de l'efficacité des insecticides (WHO, 2013). En effet, cette phase est indispensable pour préciser dans quelle mesure une population visée est moins sensible qu'une population sensible de référence, ce qui permet de mettre en évidence un éventuel phénomène de résistance et d'orienter ainsi le choix et le dosage des produits à recommander contre cette population cible. La sensibilité aux insecticides peut être déterminée en exposant les insectes, dans un tunnel à vent ou dans un tube OMS, à un gradient de concentrations d'une substance active. L'analyse de la relation dose/effet permet d'établir la quantité de substance active nécessaire pour induire une certaine mortalité des individus. Les concentrations létales ou CL, et en particulier la CL<sub>50</sub> et la CL<sub>90</sub>, sont des valeurs les plus utilisées en LAV.

Chez les *Culicoides* en général, et plus particulièrement chez les espèces d'intérêt vétérinaire, ces valeurs sont rares. Seules la sensibilité de *C. mississippiensis* et de *C. sonorensis* (espèces nord-américaines) à plusieurs substances actives ont été obtenues dans les années 80 à l'aide d'un tunnel à vent (Kline *et al.*, 1981 ; Floore, 1985 ; Holbrook, 1986). En Israël, des tests en tube OMS ont permis de déterminer les CL<sub>50</sub> et CL<sub>90</sub> de la cyhalothrine

(Braverman *et al.*, 1995) et de la lambda-cyhalothrine (Braverman *et al.*, 2004) chez *C. imicola*. Par contre en Europe, ces valeurs étaient inexistantes et ce, jusqu'en 2011 quand nous menâmes des tests en tubes OMS que nous adaptâmes pour être utilisés avec des petits insectes et nous obtînmes la sensibilité de 2 espèces vectrices de la FCO, *C. obsoletus* et *C. imicola* et celle de *C. nubeculosus* (provenant de l'élevage du TPI, Royaume Uni) à la deltaméthrine (*Manuscrit #2*).

Comme la méthode de test en tube OMS pour déterminer la sensibilité aux insecticides nous a paru encourageante, nous l'avons retenue dans ce travail de thèse pour réaliser un criblage plus approfondi avec d'autres substances actives et sur d'autres populations. Le choix des substances actives s'est porté vers celles contenues dans les produits commercialisés les plus utilisés en Europe, essentiellement des pyréthrinoïdes, mais aussi vers quelques organophosphorés employés en Afrique ou en Amérique du Sud.

Les sensibilités observées chez les différentes populations de *C. obsoletus* et de *C. imicola* en France, Espagne, Sénégal et Afrique du Sud, ne permettent pas de mettre en évidence l'existence de résistance ni aux pyréthrinoïdes ni aux organophosphorés chez ces populations, bien que l'absence de population de référence ne permet pas de le démontrer formellement. Il serait donc fondamental de poursuivre le suivi de la sensibilité chez ces populations afin de détecter l'éventuelle apparition de résistance, mais aussi d'acquérir des informations supplémentaires sur d'autres populations et d'autres substances actives. Néanmoins, nous avons pu confirmer que les *Culicoides* sont sensibles aux substances actives, plus aux pyréthrinoïdes de nouvelle génération qu'aux organophosphorés, et que la deltaméthrine est plus toxique que l'alpha-cyperméthrine, la cyperméthrine, la perméthrine et que le diazinon, le phoxime et le chlorpyrifos-méthyl.

### **Les formulations disponibles diminuent-elles la durée de vie des *Culicoides* et protègent-elles les animaux contre les piqûres de *Culicoides* ?**

Parmi la longue liste de produits insecticides disponibles dans le commerce européen contre les *Culicoides*, dont leurs vertus sont exaltées par les fabricants, aucun ne dispose d'une AMM spécifique. Alternativement, ce sont les produits disposant d'une AMM pour les mouches qui sont généralement recommandés par les autorités vétérinaires. L'évaluation de leur efficacité a fait l'objet de nombreuses études, mais les procédures expérimentales utilisées restent peu conformes (par exemple l'application du produit sur un animal, stockage au froid des poils coupés de l'animal traité puis exposition des *Culicoides* sur ces poils) aux conditions réelles (application du produit sur un animal et exposition directe des *Culicoides* à l'animal). Dans la quête d'évaluer de manière standardisée l'efficacité de ces produits commercialisés contre les *Culicoides*, nous avons proposé des approches différentes de celles jusqu'à présent utilisées, permettant de faire un criblage rapide et homogène de ces produits. Nos différentes méthodes proposées sont orientées en fonction du paramètre à évaluer, soit la létalité soit la répulsivité.

Premièrement, concernant les formulations insecticides qui visent à réduire la durée de vie des *Culicoides* qui rentrent en contact avec les animaux traités et à freiner la dispersion des maladies transmises par ces vecteurs, nous avons proposé deux approches. La première se basant sur les divers travaux effectués en traitant les animaux avec des formulations en *pour-on* (recommandées par les autorités sanitaires et très utilisées en Europe), mais contrairement à l'exposition à des poils coupés d'animal traité (Mehlhorn *et al.*, 2008a, 2008b ; Schmahl *et al.*, 2008, 2009a, 2009b ; Papadopoulos *et al.*, 2009 et 2010), nous avons exposé les *Culicoides* directement à l'animal traité comme l'avait déjà fait Strandfast en 1984. La seule différence est l'exposition à la partie antérieure de la cuisse et non à l'oreille de l'animal traité (Strandfast *et al.*, 1984). Cette méthode nous a permis d'évaluer la formulation la plus utilisée en Europe, le Butox 7.5 en *pour-on*, mais aussi de mettre en évidence une persistance très courte (10 jours) par rapport à celles obtenues dans les autres études (jusqu'à 7 semaines) et celle soutenue par le fabricant (entre 8 et 10 semaines). Traiter l'animal sur le terrain et exposer les *Culicoides* directement à l'animal aussi sur le terrain permettent de mieux mimer les conditions réelles que le stockage des poils, ce qui pourrait expliquer les différences de résultats entre notre étude et les précédentes. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'il existe une différence de persistance de l'insecticide entre les parties glabres et le pelage de l'animal. Malgré des résultats très intéressants obtenus avec cette approche, elle nécessite en revanche d'importants moyens (disponibilité d'un élevage avec plusieurs animaux à traiter). Par conséquent, faire un criblage de plusieurs produits avec cette méthode est difficile à standardiser et à réaliser. C'est ainsi, que nous avons développé au laboratoire une méthode moins contraignante, permettant de cribler différentes formulations tout en restant fiable et reproductible. Cette approche se base sur le test en cage (procédure de référence au LIN-IRD) qui permet d'évaluer une formulation cutanée appliquée sur un animal (lapin ou cobaye) contre les moustiques. Nous l'avons adaptée pour être utilisée avec des *Culicoides* en réduisant le volume de la cage d'exposition et la taille de l'appât (souris), ce qui nous a permis d'évaluer rapidement plusieurs produits commercialisés et d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec la première approche. En effet, elle a permis de mettre en évidence la courte persistance et la faible efficacité des produits commercialisés sur les parties glabres. Il serait donc essentiel de continuer le criblage d'autres produits en utilisant cette procédure, afin d'obtenir des données comparables qui pourront être utilisées par les autorités sanitaires pour choisir le ou les produits à recommander dans les futures stratégies de LAV contre les *Culicoides*. Une fois évaluées en laboratoire, les formulations les plus efficaces pourront être évaluées sur le terrain et il serait possible de vérifier, en conditions plus réelles, si par exemple l'étalage du produit avec un gant sur tout le corps de l'animal (comme nous l'avons fait avec les souris nous basant sur le mode d'application déjà expérimenté par Mullens sur des moutons (Mullens *et al.*, 2010), est plus avantageux que le *pour-on* sur le dos de l'animal.

Deuxièmement, concernant les produits à effet répulsif qui visent à réduire le contact entre les *Culicoides* et leur hôte, nous avons proposé une approche alternative, visant à quantifier l'inhibition du repas sanguin, qui nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de certaines substances actives d'origine végétale équivalente à celle des produits d'origine synthétique comme le DEET. Ces observations ont déjà été constatées chez d'autres vecteurs

tels que les acariens, les tiques, les mouches, les poux et les puces (Ellse and Wall, 2013) mais également chez les *Culicoides* en utilisant diverses méthodes comme dans un olfactomètre ou en les collectant avec un piège dont le tulle a été traité (Venter *et al.*, 2011, Gonzáles *et al.*, 2014). La procédure proposée, de traiter la membrane d'un système de gorgement artificiel, s'est avérée très convaincante et nous a permis de cribler plusieurs produits de façon rapide et reproductible avec *C. nubeculosus* provenant de l'élevage, mais, avec les espèces sauvages, nous n'avons pas pu faire l'évaluation correctement car les individus issus du terrain ne se sont pas gorgés sur la membrane artificielle. Nous avons donc modifié la procédure pour quantifier l'inhibition du repas de sucre sur *C. obsoletus*, en utilisant une pastille de papier filtre imbibée d'eau sucrée colorée puis traitée pour visualiser les individus qui auraient pris le repas en sucre. Le faible taux de gorgement obtenu sur le témoin avec cette méthode n'ont pas permis d'analyser les données. Néanmoins, la méthode avec le sang, nous a permis de mettre évidence que les huiles essentielles de géranium et de citronnelle ont un effet répulsif similaire à celui du DEET et un effet létal similaire à celui de la deltaméthrine. Dans la difficulté de réaliser l'évaluation sur des populations sauvages avec la méthode avec le sang, il serait donc pertinent de mener d'améliorer la procédure de la pastille de papier filtre imbibée d'eau sucrée colorée afin d'obtenir des données comparables.

Finalement, les procédures que nous avons proposées nous ont permis d'évaluer en laboratoire, de façon moins contraignante et en mimant les conditions du terrain, l'efficacité de différents produits insecticides et d'autres à caractère répulsif. Parallèlement, elles nous ont permis de confirmer que les produits commercialisés sont moyennement efficaces et que leur persistance est très faible ce qui conduirait, en conditions opérationnelles, à une application plus récurrente de ces produits, alourdissant les dépenses des éleveurs. D'où l'intérêt de poursuivre le criblage des produits disponibles sur le marché en utilisant les mêmes procédures que nous proposons afin d'obtenir des données comparables entre elles, permettant ainsi de guider le choix des produits et des formulations à recommander par les autorités sanitaires européennes.

### **Les matériaux imprégnés ou traités d'insecticide diminuent-ils la durée de vie des *Culicoides* après contact ?**

En Europe, aucun matériel imprégné n'est disponible contre les *Culicoides*, néanmoins, des moustiquaires imprégnées sont couramment utilisées contre d'autres modèles de vecteurs comme les moustiques en Afrique. Concernant les *Culicoides*, plusieurs travaux ont été menés jusqu'à présent avec des moustiquaires imprégnées mais ayant comme objectif de tester l'efficacité d'une substance active et non la moustiquaire en elle-même. En effet, les études se basent généralement sur la collecte de *Culicoides* via un piège dont le tulle en moustiquaire est trempé à la main dans la substance active ciblée. Ainsi, en comparant le nombre d'individus collectés avec un piège avec le tulle traité à celui d'un piège témoin sans traitement, l'efficacité répulsive du produit peut être évaluée. Nous basant sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées contre *An. gambiae* (vecteur de la malaria) ou *Cx. quinquefasciatus* (vecteur du virus du Nil occidental) en Afrique (N'Guessan *et al.*, 2007), nous avons voulu



tester ces moustiquaires contre les *Culicoides*. Pour ce faire, nous avons modifié la procédure de référence du LIN-IRD, le test en tunnel, afin de pouvoir la réaliser avec des *Culicoides*. D'ailleurs, elle peut être utilisée avec des petits insectes tels que les ravageurs des cultures. Nous avons donc testé en vain les moustiquaires commercialisées contre les moustiques, dont leur taille de maille se sont avérées trop larges laissant passer la totalité des *Culicoides* exposés, et malgré leur forte toxicité, elles ne convenaient pas. En collaboration avec le fabricant, d'autres tailles ont été évaluées et nous avons établi une taille optimale limitant le passage des *Culicoides* tout en laissant brasser l'air, indispensable en conditions opérationnelles. Elles seront imprégnées en industrie avec différentes substances actives. Les moustiquaires imprégnées conçues spécifiquement pour les *Culicoides* seront testées au Sénégal pour évaluer leur efficacité en laboratoire, en utilisant le test que nous avons développé dans ce travail de thèse, puis en conditions réelles avec des animaux dans des bâtiments.

Les supports plus solides, traités avec des produits insecticides contre les *Culicoides*, restent jusqu'à présent très peu étudiés, seuls quelques travaux ont été menés pour évaluer l'efficacité d'un pyréthrianoïde sur des plaques en bois (Schmahl *et al.*, 2008), d'un champignon sur des cages en plastique (Ansari *et al.*, 2011), et des organophosphorés sur des vêtements (Hill et Roberts, 1947) et sur des moustiquaires en aluminium (Jamnback, 1961 ; Jamnback and Watthews, 1963). Ces études ont révélé des substances actives très performantes une fois appliquées sur ces substrats, comme la lambda-cyperméthrine, dont l'efficacité perdure jusqu'à 9 semaines après traitement sur les plaques en bois. Au contraire, le champignon *Metarhizium anisopliae* sur un support plastique n'a présenté qu'une persistance de 3 jours. En regardant les résultats très prometteurs des peintures insecticides contre les moustiques, avec des persistances allant jusqu'à 1 an après traitement (Mosqueira *et al.*, 2010a, 2010b), nous avons voulu tester ce type de produit. En suivant la procédure de référence de l'OMS pour tester l'efficacité des substrats solides traités avec des insecticides, basée sur le test en cône, nous avons évalué une peinture spécialement conçue pour son utilisation dans un contexte vétérinaire. L'effet de la peinture Inesfly IGR VET PYR : alpha-cyperméthrine (0,7 %), tetraméthrine (0,3 %) et diflubenzuron (0,015 %), sur des plaques de ciment, s'est avérée très faible et variable contre *C. nubeculosus*. Nous ne pouvons attribuer cette faible efficacité contre les *Culicoides* qu'à des problèmes méthodologiques du test en cône pour les *Culicoides* nécessitant d'être amélioré dans des études complémentaires.

Comme nous venons de le voir, les différentes méthodes de lutte, individuellement parlant, ne permettent pas de réduire la totalité des *Culicoides* ni d'éviter complètement le contact entre les *Culicoides* et leur hôte. Ainsi, l'application combinée de l'ensemble de mesures présentées pourrait permettre de maintenir le contact entre *Culicoides* et leur hôte en-dessous des seuils nécessaires à la transmission et de contrôler les maladies transmises par eux.



**CONCLUSIONS**  
**GÉNÉRALES**  
**ET**  
**PERSPECTIVES**



## Conclusions générales et perspectives

---

Ce travail de thèse portant sur l'évaluation de méthodes de lutte contre les *Culicoides* européens vecteurs de maladies, a nécessité l'adaptation de procédures expérimentales de référence utilisées sur d'autres modèles biologiques, et plus particulièrement celles employées chez les moustiques. En effet, limités par l'absence de données de référence, nous avons consacré beaucoup de temps à la mise au point de ces procédures pour finalement proposer quelques-unes qui nous ont permis d'obtenir des données descriptives de base essentielles pour la LAV que nous ne possédions pas chez les *Culicoides*.

À présent, grâce à ce travail de thèse, nous disposons de méthodes d'évaluation spécifiques pour les *Culicoides*, orientées en fonction du produit à tester (substance active, formulation) et de l'objectif scientifique (sensibilité aux insecticides, efficacité létale ou répulsive) (voir Tableau récapitulatif), qui peuvent être aussi employées pour d'autres insectes hématophages d'intérêt médical ou vétérinaire de petite taille comme les phlébotomes (vecteurs d'arbovirus mais aussi de protozoaires responsables de la Leishmaniose).

Le modèle *Culicoides* est particulièrement complexe et intéressant à étudier car les connaissances sur leur biologie et leur écologie font défaut et, en même temps, ils sont responsables de pertes économiques importantes liées aux maladies qu'ils transmettent. Par ailleurs, nous avons été confrontés aux contraintes techniques de ce modèle liées aux difficultés de capture à proximité du laboratoire, de manipulation à cause de leur petite taille, de leur saisonnalité très variable et dépendante des conditions météorologiques et environnementales locales. Néanmoins, nous avons eu l'avantage de mettre en place un élevage de *C. nubeculosus* au Cirad à Montpellier, qui nous a fourni des individus en très grande quantité, nous permettant ainsi de mettre au point les différentes procédures et obtenir des valeurs de références avec une souche sensible jamais exposée aux insecticides dont la résistance est très peu probable.

Les études que nous avons menées nous ont permis de mettre en évidence, via les outils développés explicitement dans ce travail de thèse que :

- i) les *Culicoides* sont sensibles aux substances actives présentes dans quelques produits insecticides disponibles sur le marché européen. Nous disposons maintenant de 36 jeux de données différents sur la sensibilité aux insecticides de différentes populations en Europe et Afrique, qui ont été valorisés dans les *Manuscrits #2, 3, 4, 5 et 6* (Chapitre 2),
- ii) certaines substances actives sont plus toxiques que d'autres (l'effet létal des pyréthrinoides est plus important que celui des organophosphorés),
- iii) l'absence de résistance aux insecticides est supposée chez les différentes populations de *Culicoides* étudiées,
- iv) la faible efficacité et la courte persistance des produits à application cutanée commercialisés en Europe et recommandés par les autorités sanitaires a été constatée (*Manuscrits #2 et 7*, Chapitre 3),

- v) quelques huiles essentielles comme la citronnelle et le géranium ont un effet répulsif similaire à celui du DEET et un effet létal similaire à celui de la deltaméthrine contre *C. nubeculosus* (*Manuscrit #8*, Chapitre 3),
- vi) le grand potentiel des moustiquaires imprégnées (Chapitre 4) dans le contexte d'espèces de *Culicoides* endophiles (*Manuscrit #9*).

Les substances actives utilisées dans les différentes formulations insecticides commercialisées sont donc efficaces contre les *Culicoides*, en revanche, la persistance de ces formulations recommandées par les autorités sanitaires est très limitée sur les parties glabres. Pour avoir une protection optimale, l'idéal serait de traiter les animaux toutes les semaines, mais cela est impossible car les recommandations d'utilisation ne le permettent pas en plus des coûts élevés et que cela reste difficilement faisable en contexte d'élevage. Ces traitements hebdomadaires pourraient être limités aux périodes de grande activité vectorielle et de crise sanitaire pour la protection d'animaux de valeur comme les taureaux et béliers. Néanmoins, l'amélioration de la persistance de ces produits par les fabricants est indispensable.

Par rapport aux moustiquaires imprégnées, il est important de souligner qu'elles laissent passer les *Culicoides* mais les tuent après contact. Pour protéger les animaux des piqûres des *Culicoides*, l'idéal serait de réduire la taille de la maille pour réduire le taux de passage tout en permettant la circulation de l'air dans les bâtiments. Ces moustiquaires pourraient être utilisées pour combler les ouvertures (fenêtres et trous) des bâtiments où les animaux sont mis en stabulation pour réduire le passage des *Culicoides* et réduire la transmission.

Concernant les huiles essentielles, celles de géranium et de citronnelle ont un effet répulsif équivalent à celui du DEET et un effet létal équivalent à celui de la deltaméthrine. Elles pourraient être une alternative aux insecticides, pour réduire la pression et ainsi diminuer le risque d'apparition de la résistance aux insecticides, mais leurs persistances sont très courtes et leur utilisation sur des animaux est jusqu'à présent non autorisée.

A propos des peintures, il faut revoir tout le dispositif d'évaluation pour obtenir des résultats interprétables.


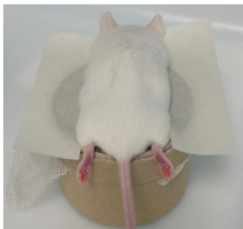



En tenant compte les améliorations que nous avons apportées aux connaissances de l'étude des méthodes de lutte contre les *Culicoides*, plusieurs perspectives de travaux peuvent être envisagées. En effet, avec les restrictions grandissantes à l'utilisation d'insecticides en Europe, la liste de substances actives autorisées dans le contexte vétérinaire est courte et le sera de plus en plus dans les années à venir. Ce qui veut dire qu'à moyen et long terme, l'utilisation répétée d'une ou deux substances actives entraînera inévitablement l'apparition d'une résistance à ces insecticides, et il ne restera aucun autre moyen de lutte chimique efficace contre les vecteurs (et pas seulement contre les *Culicoides*). Cela a déjà été observé chez des mouches des cornes (*Haematobia irritans*) aux États-Unis (Szalanski *et al.*, 1991 ; Oyarzun *et al.*, 2008, 2011) et chez des moustiques (*Aedes aegypti*) dans les Caraïbes (Dusfour *et al.*, 2011 ; Marcombe *et al.*, 2012), en Amérique centrale (Bisset *et al.*, 2013) et en Amérique du Sud (Lima *et al.*, 2011 ; Maciel-de-Freitas *et al.*, 2014). Dans ce contexte, il

est essentiel de continuer le criblage des substances actives, d'élargir les tests de sensibilité à d'autres populations dans les zones à forte activité économique et de poursuivre le suivi de leur sensibilité afin de détecter l'apparition de la résistance aux insecticides. Il est aussi essentiel de finaliser les protocoles du test d'inhibition du repas de sucre en l'optimisant avec *C. nubeculosus* pour le tester sur les espèces d'intérêt vétérinaire mais aussi celui du test en cône en l'optimisant avec *C. nubeculosus* pour évaluer l'efficacité d'autres peintures.

Il serait intéressant d'évaluer quelques méthodes séduisantes, utilisées chez les autres vecteurs, comme les bactéries endo-symbiontes avec leur capacité à modifier les traits de vie chez certains insectes (longévité et reproduction) et d'auto-dissémination de larvicides notamment avec le pyriproxyfène, très efficace pour le contrôle d'*Aedes albopictus* (vecteur de la dengue et du chikungunya) (Ohba *et al.*, 2013). Mais sans combler les lacunes sur l'écologie et la biologie des *Culicoides*, ces stratégies ne resteront qu'au stade de projet et le développement de vraies stratégies alternatives aux insecticides ne verront jamais le jour.

Ce travail de thèse a donné quelques outils d'évaluation et des valeurs de références sur la LAV contre les *Culicoides*, mais il reste beaucoup à découvrir...

**Tableau récapitulatif** Méthodes recommandées pour l'évaluation de l'efficacité des formulations insecticides ou répulsives contre les *Culicoides*.

<b>Formulation insecticide ou répulsive ciblée</b>					
	<b>Substance Active</b>	<b>Application cutanée</b>	<b>Répulsif</b>	<b>Matériaux imprégnés ou traités</b>	
<b>Exemples</b>	Deltaméthrine, perméthrine	<i>Pour-on</i> , pulvérisation	Huile essentielle, répulsif synthétique	Moustiquaire	Support solide, mur, bois, bâche
<b>Méthode</b>	Test en tube OMS*	Test en cage*	Membrane traitée* Papier filtre traité*	Test en tunnel*	Test en cône
					
<b>Information obtenue</b>	Sensibilité aux substances actives, LC <sub>50</sub> , LC <sub>90</sub> , CD,	Efficacité létale et persistance	Inhibition du repas de sang et de sucre, efficacité létale et répulsive	Efficacité létale et persistance, taux de passage	Efficacité létale et persistance

\* test spécialement adapté dans ce travail de thèse pour être utilisé avec les *Culicoides*. LC<sub>50</sub>: concentration létale d'une substance active entraînant la mort de 50% des individus exposés, CL<sub>90</sub>: concentration létale d'une substance active entraînant la mort de 90% des individus exposés, CD : concentration diagnostique (2 x CL<sub>99</sub>).



**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

---

- Ansari, M.A., Carpenter, S., Butt, T.M., 2010. Susceptibility of *Culicoides* biting midge larvae to the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*: prospects for bluetongue vector control. *Acta Trop* 113, 1-6.
- Anthony, S.J., Maan, S., Maan, N., Kgosana, L., Bachanek-Bankowska, K., Batten, C., Darpel, K.E., Sutton, G., Attoui, H., Mertens, P.P.C., 2009. Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): Comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup. *Virus Res* 145, 200-210.
- Baldet, T., Delécolle, J.C., Cêtre-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, 84-97.
- Balenghien, T., Pagès, N., Goffredo, M., Carpenter, S., Augot, D., Jacquier, E., Talavera, S., Monaco, F., Depaquit, J., Grillet, C., Pujols, J., Satta, G., Kasbari, M., Setier-Rio, M.-L., Izzo, F., Alkan, C., Delécolle, J.-C., Quaglia, M., Charrel, R., Polci, A., Bréard, E., Federici, V., Cêtre-Sossah, C., Garros, C., 2014. The emergence of Schmallenberg virus across *Culicoides* communities and ecosystems in Europe. *Prev Vet Med*.
- Batten, C.A., Maan, S., Shaw, A.E., Maan, N.S., Mertens, P.P.C., 2008. A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. *Virus Res* 137, 56-63.
- Baylis, M., Parkin, H., Kreppel, K., Carpenter, S., Mellor, P.S., McIntyre, K.M., 2010. Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. *Med Vet Entomol* 24, 38-45.
- Bisset, J.A., Marín, R., Rodríguez, M.M., Severson, D.W., Ricardo, Y., French, L., Díaz, M., Pérez, O., 2013. Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol* 50, 352-361.
- Blackwell, A., Evans, K.A., Strang, R.H.C., Cole, M., 2004. Toward development of neem-based repellents against the Scottish Highland biting midge *Culicoides impunctatus*. *Med Vet Entomol* 18, 449-452.
- Borkent, A., 2014. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), Vol American Museum of Natural History, and Instituto Nacional de Biodiversidad 691-8th Ave. SE, Salmon Arm, British Columbia, V1E 2C2, Canada, 238 p.
- Borkent, A., Wirth, W.W., 1997. World species of biting midges (Diptera, Ceratopogonidae). *Bulletin of the AMNH* ; no. 233.
- Braverman, Y., 1994. Nematocera (Ceratopogonidae, Psychodidae, Simuliidae and Culicidae) and control methods. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 13, 1175-1199.
- Braverman, Y., Chechik, F., 1996. Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 15, 1037-1052.

- Braverman, Y., Chizov-Ginzburg, A., 1997. Repellency of synthetic and plant-derived preparations for *Culicoides imicola*. Med Vet Entomol 11, 355-360.
- Braverman, Y., Chizov-Ginzburg, A., Mullens, B.A., 1999. Mosquito repellent attracts *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae). J Med Entomol 36, 113-115.
- Braverman, Y., Chizov-Ginzburg, A., Pener, H., Wilamowski, A., 2004. Susceptibility and repellency of *Culicoides imicola* and *Culex pipiens* to lambda-cyhalothrin. Vet. Ital. 40, 336-339.
- Braverman, Y., Wilamowsky, A., Chizov-Ginzburg, A., 1995. Susceptibility of *Culicoides imicola* to cyhalothrin. Med Vet Entomol 9, 443-444.
- Burgin, L.E., Gloster, J., Sanders, C., Mellor, P.S., Gubbins, S., Carpenter, S., 2013. Investigating incursions of bluetongue virus using a model of long-distance *Culicoides* biting midge dispersal. Transbound Emerg Dis 60, 263-272.
- Carnevale, P., Robert, V., Manguin, S., Corbel, V., Fontenille, D., Garros, C., Rogier, C., Roux, J., 2009. Les anophèles : biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD, Marseille.
- Carpenter, S., Eyres, K., McEndrick, I., Smith, L., Turner, J., Mordue, W., Mordue, A.J., 2005. Repellent efficiency of BayRepel against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). Parasitol Res 95, 427-429.
- Carpenter, S., Mellor, P.S., Torr, S.J., 2008. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. Med Vet Entomol 22, 175-187.
- Cilek, J.E., Hallmon, C.F., 2005. The effectiveness of the Mosquito Magnet® trap for reducing biting midge (Diptera: Ceratopogonidae) populations in coastal residential backyards. J Am Mosq Control Assoc 21, 218-221.
- Clements, B., Rogers, A., 1968. Tests of Larvicides for Control of Salt-Marsh Sand Flies (*Culicoides*) 1967. Mosq. News 28, 529-&.
- Curasson, G., 1925. Introduction de la "Blue Tongue" en Afrique Occidentale Française. Bulletin de la Société de pathologie exotique 18, 215-218.
- da Silva Azevedo, R.d.S., Nunes, M.R.T., Chiang, J.O., Bensabath, G., Vasconcelos, H.B., Pinto, A.Y.d.N., Martins, L.C., de Oliveira Monteiro, H.A., Rodrigues, S.G., da Costa Vasconcelos, P.F., 2007. Reemergence of Oropouche Fever, Northern Brazil. Emerg Infect Dis 13, 912-915.
- de La Rocque, S., Balenghien, T., Halos, L., Dietze, K., Claes, F., Ferrari, G., Guberti, V., Slingenbergh, J., 2011. A review of trends in the distribution of vector-borne diseases: is international trade contributing to their spread? Rev. - Off. Int. Epizoot. 30, 119-130.
- De Regge, N., Deblauwe, I., De Deken, R., Vantieghe, P., Madder, M., Geysen, D., Smeets, F., Losson, B., van den Berg, T., Cay, A.B., 2012. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. Transbound Emerg Dis 59, 471-475.

- Doceul, V., Lara, E., Sailleau, C., Belbis, G., Richardson, J., Breard, E., Viarouge, C., Dominguez, M., Hendrikx, P., Calavas, D., Desprat, A., Languille, J., Comtet, L., Pourquier, P., Eleouet, J.-F., Delmas, B., Marianneau, P., Vitour, D., Zientara, S., 2013. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res* 44.
- Du Toit, R., 1944. The transmission of bluetongue and horse-sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry* 19, 7-16.
- Dusfour, I., Thalmensy, V., Gaborit, P., Issaly, J., Carinci, R., Girod, R., 2011. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 346-352.
- EFSA, 2008. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission (DG SANCO) on Bluetongue. *The EFSA Journal* 735, 1-69.
- EFSA, 2014. Schmallenberg virus: State of Art. *EFSA J.* 12, 1-54.
- Elbers, A.R.W., Meiswinkel, R., van Weezep, E., Kooi, E.A., van der Poel, W.H.M., 2013. Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges in the Netherlands in 2012. *Transbound Emerg Dis*.
- Ellse, L., Wall, R., 2013. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Med Vet Entomol*.
- Floore, T., 1985. Laboratory wind tunnel tests of nine insecticides against adult *Culicoides* species. *Fla. Entomol.* 68, 678-682.
- Fulcher, A., Scott, J.M., Qualls, W.A., Müller, G.C., Xue, R.-D., 2014. Attractive toxic sugar baits mixed with pyriproxyfen sprayed on plants against adult and larval *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 51, 896-899.
- Gambles, R., 1949. Bluetongue of sheep in Cyprus. *Journal of Comparative Pathology* 59, 179-190.
- Garigliany, M.-M., Hoffmann, B., Dive, M., Sartelet, A., Bayrou, C., Cassart, D., Beer, M., Desmecht, D., 2012. Schmallenberg virus in calf born at term with porencephaly, Belgium. *Emerg Infect Dis* 18, 1005-1006.
- Garros, C., Gardès, L., Allène, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., Balenghien, T., 2011. Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1103-1110.
- Gaston, K.J., 2013. Global Species Richness, In: Levin, S.A. (Ed.) *Encyclopedia of Biodiversity* (Second Edition). Academic Press, Waltham, pp. 707-711.
- Goffredo, M., Monaco, F., Capelli, G., Quaglia, M., Federici, V., Catalani, M., Montarsi, F., Polci, A., Pinoni, C., Calistri, P., Savini, G., 2013. Schmallenberg virus in Italy: a retrospective survey in *Culicoides* stored during the bluetongue Italian surveillance program. *Prev Vet Med* 111, 230-236.

- González, M., Venter, G.J., López, S., Iturrondobeitia, J.C., Goldarazena, A., 2014. Laboratory and field evaluations of chemical and plant-derived potential repellents against *Culicoides* biting midges in northern Spain. *Med Vet Entomol*.
- Gourreau, J.-M., 2009. La fièvre catarrhale ovine: guides. France Agricole Editions, 194 p.
- Gullan, P.J., Cranston, P.S., 2010. *The Insects: An Outline of Entomology*. John Wiley & Sons, 590 p.
- Gutsche, T., 1979. *There was a Man*, 1st Edition Edition. Timmins Hardcover.
- Hardy, W.T., Price, D.A., 1952. Soremuzzle of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 120, 23-25.
- Harrup, L.E., Gubbins, S., Barber, J., Denison, E., Mellor, P.S., Purse, B.V., Carpenter, S., 2014. Does covering of farm-associated *Culicoides* larval habitat reduce adult populations in the United Kingdom? *Vet. Parasitol.* 201, 137-145.
- Hawking, F., 1977. The distribution of human filariasis throughout the world. Part III. Africa. *Trop Dis Bull* 74, 649-679.
- Hawking, F., 1979. The distribution of human filariasis throughout the world part IV. America. *Trop Dis Bull* 76, 693-710.
- Hendry, G., Godwin, G., 1988. Biting midges in Scottish forestry: A costly or a trivial nuisance? *Scottish Forestry* 42, 113-119.
- Henning, M., 1956. *Animal Diseases in South Africa* South Africa, 877 p.
- Hill, M.A., Roberts, E.W., 1947. An investigation into effects of gammexane on the larvae, pupae and adults of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer and on the adults of *Culicoides obsoletus* Meigen. *Ann Trop Med Parasitol* 41, 143-163.
- Hoffmann, B., Schulz, C., Beer, M., 2013. First detection of Schmallenberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012. *Vet. Microbiol.* 167, 289-295.
- Holbrook, F.R., 1986. Wind tunnel evaluations of insecticides applied to colonized *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Fla Anti-Mosq Assoc* 57, 1-3.
- Hoogendam, K., 2007. International study on the economic consequences of outbreaks of bluetongue serotype 8 in north-western Europe. University of Van Hall-Larenstein, Leeuwarden, Netherlands.
- Howell, P.G., 1960. A preliminary antigenic classification of strains of bluetongue virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 28, 357-364.
- Howerth, E.W., Stallknecht, D.E., Kirkland, P.D., 2001. Bluetongue, Epizootic Hemorrhagic Disease, and Other Orbivirus-Related Diseases, In: Williams, E.S., Barker, I.K. (Eds.) *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press, pp. 77-97.

- Hughes, G.L., Dodson, B.L., Johnson, R.M., Murdock, C.C., Tsujimoto, H., Suzuki, Y., Patt, A.A., Cui, L., Nossa, C.W., Barry, R.M., Sakamoto, J.M., Hornett, E.A., Rasgon, J.L., 2014. Native microbiome impedes vertical transmission of Wolbachia in Anopheles mosquitoes. PNAS.
- Hutcheon, D., 1902. Malarial catarrhal fever of sheep. Veterinary Record 14, 629-633.
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu Rev Entomol 51, 45-66.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., O' Neill, S.L., 2011. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. EMBO Rep. 12, 508-518.
- Jamnback, H., 1961. Observations on *Culicoides obsoletus* (Meigen) in the laboratory (Diptera: Ceratopogonidae). 21, 048-053.
- Jamnback, H., Watthews, T., 1963. Studies of Populations of Adult and Immature *Culicoides sanguisuga* (Diptera: Ceratopogonidae). Annals of the Entomological Society of America 56, 728-732.
- Kettle, D.S., 1962. The Bionomics and Control of *Culicoides* and *Leptoconops* (Diptera, Ceratopogonidae = Heleidae). Annu Rev Entomol 7, 401-418.
- Kilpatrick, A.M., Peters, R.J., Dupuis, A.P., Jones, M.J., Marra, P.P., Kramer, L.D., 2013. Predicted and observed mortality from vector-borne disease in small songbirds. Biological Conservation 165, 79-85.
- Kirkeby, C., Bødker, R., Stockmarr, A., Lind, P., Heegaard, P.M.H., 2013. Quantifying Dispersal of European *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Vectors between Farms Using a Novel Mark-Release-Recapture Technique. PLoS ONE 8.
- Kirst, H.A., 2010. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. J. Antibiot. 63, 101-111.
- Kline, D., Haile, D., Baldwin, K., 1981. Wind tunnel tests with seven insecticides against adult *Culicoides mississippiensis* Hoffman. Mosq. News 41, 745-747.
- Kline, D.L., 2006. Traps and trapping techniques for adult mosquito control. J Am Mosq Control Assoc 22, 490-496.
- Kline, D.L., Roberts, R.H., 1981. Effectiveness of Chlorpyrifos, Fenthion, Malathion, and Propoxur as Screen Treatments for Control of *Culicoides mississippiensis*. J Econ Entomol 74, 331-333.
- Komarov, A., Goldsmit, L., 1951. A disease similar to BT in cattle and sheep in Israel. Refu. Vet. 8, 96-100.
- Larska, M., Polak, M.P., Grochowska, M., Lechowski, L., Związek, J.S., Zmudziński, J.F., 2013. First report of Schmallenberg virus infection in cattle and midges in Poland. Transbound Emerg Dis 60, 97-101.

- Lehane, M. 2005. Biology Blood Sucking Insects 2nd Edition | Entomology | Cambridge University Press.
- Lewis, S.E., Rice, A., Hurst, G.D.D., Baylis, M., 2014. First detection of endosymbiotic bacteria in biting midges *Culicoides pulicaris* and *Culicoides punctatus*, important Palaeartic vectors of bluetongue virus. *Med Vet Entomol*, n/a-n/a.
- Lima, E.P., Paiva, M.H.S., Araújo, A.P.d., Silva, É.V.G.d., Silva, U.M.d., Oliveira, L.N.d., Santana, A.E.G., Barbosa, C.N., Neto, C.C.d.P., Goulart, M.O.F., Wilding, C.S., Ayres, C.F.J., Santos, M.A.V.d.M., 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit Vectors* 4.
- Linley, J.R., 1985. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *J Med Entomol* 22, 589-599.
- Linley, J.R., Parsons, R.E., Winner, R.A., 1988. Evaluation of ultraviolet light applied simultaneously against caged adult *Aedes taeniorhynchus* and *Culicoides furens*. *J Am Mosq Control Assoc* 4, 326-332.
- Liu, S.S., Li, A.Y., Lohmeyer, K.H., Pérez De León, A.A., 2012. Effects of pyriproxyfen and buprofezin on immature development and reproduction in the stable fly. *Med Vet Entomol* 26, 379-385.
- Logan, J.G., Cook, J.I., Mordue, A.J., Kline, D.A., 2010. Understanding and exploiting olfaction for the surveillance and control of *Culicoides* biting midges (Ceratopogonidae), In: Takken, W., Knols, B.J. (Eds.) *Ecology and Control of Vectors of Infectious Diseases: Olfaction in vector-host interactions*. Wageningen Academic, Wageningen.
- Lopez, A., Botija, C., 1958. Epizootie de fièvre catarrhale ovine en Espagne (bluetongue). *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 50, 65-93.
- Maciel-de-Freitas, R., Avendanho, F.C., Santos, R., Sylvestre, G., Araújo, S.C., Lima, J.B.P., Martins, A.J., Coelho, G.E., Valle, D., 2014. Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. *PLoS ONE* 9.
- MacLachlan, N.J., Gard, G., 2009. Clinical signs and pathology, In: *Bluetongue*. Elsevier, pp. 285-293.
- Madden, H. A., Lindquist, W. A., Longcoy, Knipling, O.M.a., F, E., 1946. Control of Adult Sand Flies by Airplane Spraying with DDT. *Florida Entomologist* 29, 5-10.
- Mair, J., Blackwell, A., 1998. Effect of age and multiple mating on the mating behavior of *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol* 35, 996-1001.
- Manso-Ribeiro, J., Noronha, F., 1958. Fièvre catarrhale du mouton au Portugal. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 50, 46-64.



- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Sélior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yébakima, A., Corbel, V., David, J.-P., Chandre, F., 2012. Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. PLoS ONE 7.
- Mason, J. 1940. Cultivation of Bluetongue Virus in Fertile Eggs produced on a Vitamin-deficient Diet : Abstract : Nature.
- May, R.M., 1988. How Many Species Are There on Earth? Science 241, 1441-1449.
- Meiswinkel, R., Baylis, M., Labuschagne, K., 2000. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. Bull. Entomol. Res. 90, 509-515.
- Meiswinkel, R., Braack, L.E., 1994. African horsesickness epidemiology: five species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) collected live behind the ears and at the dung of the African elephant in the Kruger National Park, South Africa. Onderstepoort J Vet Res 61, 155-170.
- Meiswinkel, R., Goffredo, M., Dijkstra, E.G.M., van der Ven, I.J.K., 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, 182-195.
- Mellor, P.S., Boorman, J., Baylis, M., 2000. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. Annu Rev Entomol 45, 307-340.
- Mellor, P.S., Hamblin, C., 2004. African horse sickness. Vet Res 35, 445-466.
- Mellor, P.S., Prrzous, G., 1979. Observations on breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. Bull. Entomol. Res. 69, 229-234.
- Mellor, P.S., Wittmann, E.J., 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. Vet. J. 164, 20-37.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B., 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? PLoS Biol 9.
- Morse, S.S., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis 1, 7-15.
- Mosqueira, B., Chabi, J., Chandre, F., Akogbeto, M., Hougard, J.-M., Carnevale, P., Mas-Coma, S., 2010a. Efficacy of an insecticide paint against malaria vectors and nuisance in West Africa - Part 2: Field evaluation. Malar. J. 9.
- Mosqueira, B., Duchon, S., Chandre, F., Hougard, J.-M., Carnevale, P., Mas-Coma, S., 2010b. Efficacy of an insecticide paint against insecticide-susceptible and resistant mosquitoes - Part 1: Laboratory evaluation. Malar. J. 9.
- Mullens, B., 1992. Integrated management of *Culicoides variipennis*: a problem of applied ecology. In Bluetongue, African horse sickness and related orbivirus , Paris, 17-21 June 1991. Co press, Boca Raton, 193-196. In: Proceedings of the second International symposium on Bluetongue, Paris, 17-21 June, pp. 193-196.

- Mullens, B., Gerry, A., Sarto I Monteys, V., Pinna, M., González, A., 2010. Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. *J Med Entomol* 47, 106-110.
- Mullens, B.A., 1993. In vitro assay for permethrin persistence and interference with bloodfeeding of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) on animals. *J Am Mosq Control Assoc* 9, 256-259.
- Mullens, B.A., Velten, R.K., 1994. Laboratory Culture and Life History of *Heleidomermis magnapapula* in Its Host, *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Nematol* 26, 1-10.
- Mullens, B.A., Velten, R.K., Federici, B.A., 1999. Iridescent virus infection in *Culicoides variipennis sonorensis* and interactions with the mermithid parasite *Heleidomermis magnapapula*. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 231-233.
- N'Guessan, R., Corbel, V., Akogbeto, M., Rowland, M., 2007. Reduced Efficacy of Insecticide-treated Nets and Indoor Residual Spraying for Malaria Control in Pyrethroid Resistance Area, Benin. *Emerg Infect Dis* 13, 199-206.
- Ohba, S.-y., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., Takagi, M., 2013. The Effect of Pyriproxyfen as a "Population Growth Regulator" against *Aedes albopictus* under Semi-Field Conditions. *PLoS ONE* 8.
- Page, P.C., Labuschagne, K., Nurton, J.P., Venter, G.J., Guthrie, A.J., 2009. Duration of repellency of N,N-diethyl-3-methylbenzamide, citronella oil and cypermethrin against *Culicoides* species when applied to polyester mesh. *Vet. Parasitol.* 163, 105-109.
- Panagiotatos, D.E., 2004. Regional overview of bluetongue viruses, vectors, surveillance and unique features in Eastern Europe between 1998 and 2003. *Vet. Ital.* 40, 61-72.
- Papadopoulos, E., Bartram, D., Carpenter, S., Mellor, P.S., Wall, R., 2009. Efficacy of alphacypermethrin applied to cattle and sheep against the biting midge *Culicoides nubeculosus*. *Vet. Parasitol.* 163, 110-114.
- Papadopoulos, E., Rowlinson, M., Bartram, D., Carpenter, S., Mellor, P.S., Wall, R., 2010. Treatment of horses with cypermethrin against the biting flies *Culicoides nubeculosus*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Vet. Parasitol.* 169, 165-171.
- Pinheiro, F.P., Hoch, A.L., Gomes, M.L., Roberts, D.R., 1981. Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 172-176.
- Pioz, M., Guis, H., Calavas, D., Durand, B., Abrial, D., Ducrot, C., 2011. Estimating front-wave velocity of infectious diseases: a simple, efficient method applied to bluetongue. *Vet Res* 42.
- Rasmussen, L.D., Kristensen, B., Kirkeby, C., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., Bodker, R., Botner, A., 2012. *Culicoides* as Vectors of Schmallenberg Virus. *Emerg Infect Dis* 18, 1204-1206.

- Reeves, W.K., Lloyd, J.E., Stobart, R., Stith, C., Miller, M.M., Bennett, K.E., Johnson, G., 2010. Control of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) blood feeding on sheep with long-lasting repellent pesticides. *J Am Mosq Control Assoc* 26, 302-305.
- Rieb, J.P., Delécolle, J.C., 1981. *Elaphrus cupreus* (Coleoptera , Carabidae ) un prédateur des nymphes de Diptères (Diptera , Ceratopogonidae ). *Israël Journal of Entomology*, 115-117.
- Rodhain, F., Pérez, C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire: notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. Maloine.
- Romón, P., Higuera, M., Delécolle, J.C., Baldet, T., Aduriz, G., Goldarazena, A., 2012. Phenology and attraction of potential *Culicoides* vectors of bluetongue virus in Basque Country (northern Spain). *Vet. Parasitol.* 186, 415-424.
- Sailleau, C., Breard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Vitour, D., Adam, M., Lasne, L., Martrenchar, A., Costes, L., Zientara, S., Zanella, G., 2010. Co-circulation of hemorrhagic disease virus of deer and bluetongue in Reunion in 2009. In: *Épidémiologie et Santé Animale*, 2010, pp. 21-29.
- Sanders, C.J., Carpenter, S., 2014. Assessment of an immunomarking technique for the study of dispersal of *Culicoides* biting midges. *Infect. Genet. Evol.*
- Santamaría, E., Cabrera, O.L., Zipa, Y., Ferro, C., Ahumada, M.L., Pardo, R.H., 2008. Diagnóstico preliminar de la molestia sanitaria causada por *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en el departamento de Boyacá, Colombia. *Biomedica* 28, 497-509.
- Sapre, S., 1964. An outbreak of bluetongue in goats and sheep. *Veterinary Review* 15, 78-80.
- Sarwar, M., 1962. A note on bluetongue in sheep in West Pakistan. *Pakistan Journal of Animal Science* 1, 1-2.
- Satta, G., Goffredo, M., Sanna, S., Vento, L., Cubeddu, G.P., Mascherpa, E., 2004. Field disinfection trials against *Culicoides* in north-west Sardinia. *Vet. Ital.* 40, 329-335.
- Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Al-Quraishy, S., Schumacher, B., Jatzlau, A., Mehlhorn, H., 2009a. Pilot study on deltamethrin treatment (Butox 7.5, Versatrine) of cattle and sheep against midges (*Culicoides* species, Ceratopogonidae). *Parasitol Res* 104, 809-813.
- Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Schumacher, B., Jatzlau, A., Al-Quraishy, S., Mehlhorn, H., 2009b. Effects of permethrin (Flypor) and fenvalerate (Acadrex60, Arkofly) on *Culicoides* species--the vector of Bluetongue virus. *Parasitol Res* 104, 815-820.
- Schmahl, G., Walldorf, V., Klimpel, S., Al-Quraishy, S., Mehlhorn, H., 2008. Efficacy of Oxyfly on *Culicoides* species--the vectors of Bluetongue virus--and other insects. *Parasitol Res* 103, 1101-1103.
- Sellers, R.F., Pedgley, D.E., 1985. Possible windborne spread to western Turkey of bluetongue virus in 1977 and of Akabane virus in 1979. *J Hyg (Lond)* 95, 149-158.

- Sellers, R.F., Pedgley, D.E., Tucker, M.R., 1978. Possible windborne spread of bluetongue to Portugal, June-July 1956. *J Hyg (Lond)* 81, 189-196.
- Shope, R.E., Macnamara, L.G., Mangold, R., 1960. A virus-induced epizootic hemorrhagic disease of the virginia white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Exp. Med.* 111, 155-170.
- Simonsen, P.E., Onapa, A.W., Asio, S.M., 2011. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Trop* 120 Suppl 1, S109-120.
- Southwood, T.R.E., Brown, V.K., Reader, P.M., 1979. The relationships of plant and insect diversities in succession. *Biological Journal of the Linnean Society* 12, 327-348.
- Spreull, J., 1905. Malarial Catarrhal Fever (Bluetongue) of Sheep in South Africa. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 18, 321-337.
- Standfast, H.A., Muller, M.J., Wilson, D.D., 1984. Mortality of *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae) fed on cattle treated with ivermectin. *J Econ Entomol* 77, 419-421.
- Szalanski, A.L., Black, W.C., Broce, A.B., 1991. Esterase staining activity in pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, 303-312.
- Tabachnick, W.J., 2003. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet. Ital.* 40, 144-150.
- Taylor, W.G., Danielson, T.J., Spooner, R.W., Golsteyn, L.R., 1994. Pharmacokinetic assessment of the dermal absorption of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in cattle. *Drug Metab. Dispos.* 22, 106-112.
- 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, 81-89.
- Trigg, J.K., 1996. Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Scotland. *J Am Mosq Control Assoc* 12, 329-330.
- Velthuis, A.G.J., Mourits, M.C.M., Saatkamp, H.W., de Koeijer, A.A., Elbers, A.R.W., 2011. Financial Evaluation of Different Vaccination Strategies for Controlling the Bluetongue Virus Serotype 8 Epidemic in the Netherlands in 2008. *PLoS ONE* 6.
- Velthuis, A.G.J., Saatkamp, H.W., Mourits, M.C.M., de Koeijer, A.A., Elbers, A.R.W., 2010. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev Vet Med* 93, 294-304.
- Venter, G.J., Labuschagne, K., Boikanyo, S.N.B., Morey, L., Snyman, M.G., 2011. The repellent effect of organic fatty acids on *Culicoides* midges as determined with suction light traps in South Africa. *Vet. Parasitol.* 181, 365-369.
- Venter, G.J., Paweska, J.T., Van Dijk, A.A., Mellor, P.S., Tabachnick, W.J., 1998. Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Med Vet Entomol* 12, 378-385.

- Veronesi, E., Henstock, M., Gubbins, S., Batten, C., Manley, R., Barber, J., Hoffmann, B., Beer, M., Attoui, H., Mertens, P.P.C., Carpenter, S., 2013. Implicating *Culicoides* biting midges as vectors of Schmallenberg virus using semi-quantitative RT-PCR. PLoS ONE 8.
- Verwoerd, D.W., Louw, H., Oellermann, R.A., 1970. Characterization of Bluetongue Virus Ribonucleic Acid. J Virol 5, 1-7.
- Webster, W.R., St. George, T.D., Kirkland, P.J., 1992. The Australian bluetongue control strategy. In: International Symposium on Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses, 1992, pp. 843-850.
- WHO, 1967. Les arbovirus et leur rôle dans la pathologie humaine : rapport d' un groupe scientifique de l' OMS [réuni à Genève du 26 septembre au 1er octobre 1966].
- WHO 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: mimeographed document (WHO/VBC/81.810) (Geneva, Switzerland, World Health Organization ).
- WHO 2013. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes (Geneva, Switzerland, World Health Organization ).
- Wilson, A.J., Mellor, P.S., 2009. Bluetongue in Europe: past, present and future. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364, 2669-2681.



# ANNEXES





# Host-Seeking Activity of Bluetongue Virus Vectors: Endo/Exophagy and Circadian Rhythm of *Culicoides* in Western Europe

Elvina Viennet<sup>1\*</sup>, Claire Garros<sup>1</sup>, Ignace Rakotoarivony<sup>1</sup>, Xavier Allène<sup>1</sup>, Laëtitia Gardès<sup>1</sup>, Jonathan Lhoir<sup>1</sup>, Ivanna Fuentes<sup>1</sup>, Roger Venail<sup>2</sup>, Didier Crochet<sup>3</sup>, Renaud Lancelot<sup>1</sup>, Mickael Riou<sup>3</sup>, Catherine Moulia<sup>4</sup>, Thierry Baldet<sup>1</sup>, Thomas Balenghien<sup>1\*</sup>

**1** CIRAD, UMR Contrôle des Maladies, Montpellier, France, **2** EID-Méditerranée, Montpellier, France, **3** INRA, UE1277 PFIE, Plate Forme d'Infectiologie Expérimentale, Nouzilly, France, **4** Université de Montpellier 2, ISEM équipe « Génomique interactive », Montpellier, France

## Abstract

Feeding success of free-living hematophagous insects depends on their ability to be active when hosts are available and to reach places where hosts are accessible. When the hematophagous insect is a vector of pathogens, determining the components of host-seeking behavior is of primary interest for the assessment of transmission risk. Our aim was to describe endo/exophagy and circadian host-seeking activity of Palearctic *Culicoides* species, which are major biting pests and arbovirus vectors, using drop traps and suction traps baited with four sheep, as bluetongue virus hosts. Collections were carried out in the field, a largely-open stable and an enclosed stable during six collection periods of 24 hours in April/May, in late June and in September/October 2010 in western France. A total of 986 *Culicoides* belonging to 13 species, mainly *C. brunnicans* and *C. obsoletus*, was collected on animal baits. *Culicoides brunnicans* was clearly exophagic, whereas *C. obsoletus* was able to enter stables. *Culicoides brunnicans* exhibited a bimodal pattern of host-seeking activity with peaks just after sunrise and sunset. *Culicoides obsoletus* was active before sunset in spring and autumn and after sunset in summer, thus illustrating influence of other parameters than light, especially temperature. Description of host-seeking behaviors allowed us to discuss control strategies for transmission of *Culicoides*-borne pathogens, such as bluetongue virus. However, practical vector-control recommendations are difficult to provide because of the variation in the degree of endophagy and time of host-seeking activity.

**Citation:** Viennet E, Garros C, Rakotoarivony I, Allène X, Gardès L, et al. (2012) Host-Seeking Activity of Bluetongue Virus Vectors: Endo/Exophagy and Circadian Rhythm of *Culicoides* in Western Europe. PLoS ONE 7(10): e48120. doi:10.1371/journal.pone.0048120

**Editor:** Matthew Baylis, University of Liverpool, United Kingdom

**Received:** June 25, 2012; **Accepted:** September 20, 2012; **Published:** October 29, 2012

**Copyright:** © 2012 Viennet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was funded by CIRAD, by the Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire and by the EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. This paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext032 (<http://www.edenext.eu>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding received for this study.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: elvina.viennet@anu.edu.au (EV); thomas.balenghien@cirad.fr (TB)

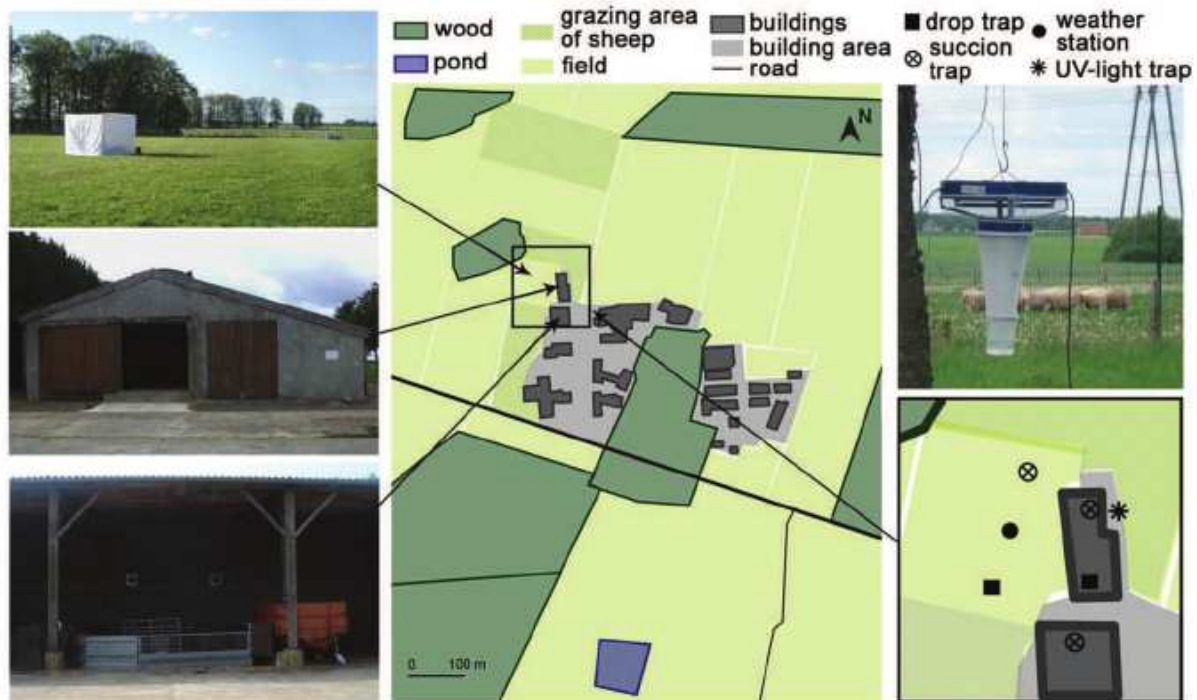
□ Current address: National Centre for Epidemiology and Population Health, College of Medicine, Biology and Environment, Australian National University, Canberra, Australia

## Introduction

Host-parasite systems are subject to opposing selective processes: on the one hand, parasite fitness is increased by a higher frequency of encounters with hosts and on the other hand, host fitness is increased by avoiding these contacts [1]. Feeding success of free-living hematophagous insects, which can be considered parasites of vertebrates with periodic and brief contacts, depends on their ability to be active when hosts are available and to reach places where hosts are accessible [2]. Circadian and seasonal activities of insect are regulated by endogenous oscillators which are initiated by natural diel alternation of light and darkness [3]. These biological clocks enable organisms to anticipate variations of biotic and abiotic factors associated with seasonal or diel progression rather than follow them [3,4]. Diel timing of host-seeking activity should be selected to ensure temporal encounter of the insect and host and to minimize the risk of dying during host-seeking activities. Similarly, endophagy, defined as the trend of

obtaining a blood meal within a man-made structure [3], can be regarded as an adaptation of hematophagous insect to reach their hosts.

The description of circadian activity and endo/exophagy of hematophagous insects could have practical implications for the control of diseases induced by transmitted pathogens. A well-known example is stabling horses at night in South Africa where *Culicoides imicola* Kieffer is known to be nocturnal and mainly exophagic [5,6]. This vector-control strategy has proven to be an environmentally-friendly and inexpensive method to prevent African horse sickness (AHS) by reducing bites of the main vector. From 2006 to 2008, Europe faced a huge epizootic of bluetongue virus serotype 8 (BTV8) transmission, leading to disastrous sanitary consequences in domestic ruminant populations and to important disruptions in animal trade [7]. European regulations recommend the stabling of animals during *Culicoides* activity to reduce BTV transmission (EU Council



**Figure 1. Climatic conditions in the study site.** A. Ombrothermic diagram for comparison between 2010 and the 1971–2000 period (data from Météo-France station of Parçay-Meslay); B. Boxplots of temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and relative humidity (%) recorded by data loggers at each location during the 15 collection sessions; C. Boxplots of mean and maximum wind speed (km/h) recorded by the local weather station during each of the 6 summer collections.

doi:10.1371/journal.pone.0048120.g001

Directive 2000/75/EC). The direct costs due to indoor housing of animals in The Netherlands in 2006, which was compulsory in restriction zones, were estimated to 18 million Euros, *i.e.* 55% of total economic impact [8]. However, endo/exophagy of Palearctic *Culicoides* was not precisely described and then benefits of this housing strategy were uncertain. The recent emergence of a novel Orthobunyavirus, named Schmallenberg virus [9], in European ruminant populations highlighted the crucial need of address this issue.

Endophagous behavior of Palearctic species was reported first by Overgaard Nielsen and Christensen [10] in Denmark. In late 2006, comparing UV-light trap collections inside and outside sheds in The Netherlands, Meiswinkel *et al.* [11] collected threefold more *Culicoides* outside than inside, where cattle were kept for the night. The species collected mainly inside, *i.e.* *Culicoides obsoletus* Meigen/*Culicoides scoticus* Downes and Kettle, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer and *Culicoides chiopterus* (Meigen), were suspected to be involved in BTV8 transmission [11]. Using the same method in France at the same period, Baldet *et al.* [12] collected mainly the same species inside stables, but in greater number inside than outside. Authors conceded that the results were difficult to compare and interpret because of the variation in building openings and in cattle abundance close to the trap in the different collection sites [12]. With a standardized approach, Baylis *et al.* [13] highlighted that the presence of animals and the opening of stable increased the indoor number of *Culicoides* collected by UV-light trap. Moreover, authors showed that the decrease of *Culicoides* number between outside and inside traps is greater in summer

(6.5 fold) than in autumn (3 fold) [13]. Unfortunately, all these studies used UV-light traps to assess *Culicoides* abundance, which do not assess correctly the biting rate on animals [14–16]. Indeed, light attraction might lead to an overestimation of the *Culicoides* endophagy, due to an higher trapping efficiency when light traps are set inside stables, rather than outside [17].

Similarly, circadian cycles of Palearctic species are poorly described. It is widely assumed that *Culicoides* are mostly crepuscular and may continue to be active throughout the night. However, many species are also troublesome in the day displaying two biting peaks: one after sunrise and the other close to sunset. Hours of midge attacks can lengthen when low-light overcast conditions prevail, leading to biting throughout the day in both open (*Culicoides impunctatus* Goetghebuer) and forested environments (*C. obsoletus*) [17]. However, only a few studies have described rigorously *Culicoides* nycthemeral cycles with consecutive 24 h collections [18,19], and only one has utilized host-seeking behavior of European *Culicoides* [20]. Using horse-baited collections, the latter found that the largest number of *C. obsoletus* was collected at sunset, far less at sunrise and occasionally in the afternoon and night.

The aim of this study was to describe circadian host-seeking activity and endo/exophagous behavior of Palearctic *Culicoides* using host-baited trap collections. As insect behavior is directly affected by geophysical (sun and moon light cycles) and climatic (temperature, humidity, wind) factors, we carried out collections in three different periods of the year.



## Results

### Climatic Data

Climate at the study site was oceanic, with a mean annual temperature of 11.4°C, thermal amplitude of 14.9°C and annual rainfall of 694 mm (Météo-France data, 1971–2000). In 2010, annual rainfall was lower than for the 1971–2000 period (586 mm), with deficit in rainfall during the first part of the year (179 mm between January and May 2010 versus 298 mm for the reference period). Temperatures were generally close to normal values in 2010, with colder values in January and December and warmer in June and July (Fig. 1A).

During collection sessions, temperatures were higher in summer than in autumn and spring, with smaller amplitude in autumn, whereas humidity was higher in autumn than in summer and spring (Fig. 1B). The temperature decreased gradually from indoors to outdoors, while humidity showed the inverse tendency. In autumn, however, the relative humidity was the highest in the largely-open stable (Fig. 1B). Amplitudes of temperature and humidity were higher outdoors than in other locations, with outlier observations, especially in autumn, probably due to direct exposure of recording devices to the sun. Wind speeds were correlated between locations, with an expected wind gradient from outdoors to indoors, with an intermediate situation for the largely-open stable (Fig. 1C).

### Diversity and Seasonality

During the 18 collection sessions, a total of 986 *Culicoides* (948 females and 38 males) belonging to 13 species was collected in host-baited traps (drop trap and suction trap) and 539 *Culicoides* (451 females and 88 males) belonging to 19 species in the UV-light/suction trap (Table 1). Molecular assays were performed on 407 *Culicoides* females morphologically identified as belonging to the Obsoletus Complex. The sample contained 349 *C. obsoletus*, 25 *C. scoticus*, 6 *C. devulfi* and 1 *C. chiopterus*; 26 individuals were not identified. Only 4% of *Culicoides* collected in host-baited traps were males – mainly the dominant species *Culicoides brunnicans* Edwards collected by the drop trap – whereas 20% of *Culicoides* were males in UV-light/suction trap. A total of 84 gravid females was collected: all in the suction trap mainly in summer (47%) and most were *C. obsoletus* (76%). Blood-fed females were collected by all traps, but mainly by the drop trap (197 versus 4 in suction trap and 9 in the UV-light/suction trap). The majority of blood-fed females (196/210) belonged to the dominant species *C. brunnicans* and *C. obsoletus*; the engorgement rate in the drop trap was 28% for *C. brunnicans* and 65% for *C. obsoletus*.

Diversity and abundance of species varied across seasons and traps. *Culicoides brunnicans* was present almost exclusively in spring (Table 1). *Culicoides obsoletus* was present during the three periods, mainly in summer (Table 1). The abundance of *C. scoticus* decreased progressively from the first to the last collection period (Table 1). *Culicoides brunnicans* was more abundant in host-baited traps than in the UV-light/suction trap, whereas the opposite situation was observed for *C. obsoletus*. Moreover, the UV-light trap collected some species rarely or not collected in host-baited traps, as *Culicoides punctatus* Latreille and *Culicoides festivipennis* Kciffer. On the contrary *C. devulfi* and *C. chiopterus* were found in host-baited traps but not in the UV-light/suction trap (Table 1).

### Endo/exophagy

The best model predicting the observed abundance of *Culicoides* overall (Pearson's product-moment correlation,  $r=0.98$ ) was the complete model including location, season, interactions between both and trap as fixed effects and the session as a random effect,

even though season lacked a clear effect on abundance (Table 2). Most *Culicoides* females were collected outdoors (mean predicted number of *Culicoides* was 8.5 outdoors versus between 0.4 and 1.0 indoors) and more were collected by the drop trap (4.2 versus 2.4).

The best model predicting *C. brunnicans* abundance ( $r=0.99$ ) was the complete model without the interaction term (Table 2). This species was found almost exclusively during the first collection period and outdoors (between 100 and 300 fold more abundant outdoors than indoors) and mainly by the drop trap (1.9 versus 0.5 by the suction trap). Interaction between location and season ( $p<0.001$ ) was needed to obtain the best prediction of *C. obsoletus* abundance ( $r=0.91$ ). *Culicoides obsoletus* was collected more abundantly outdoors (between 8 and 10 fold more abundant outdoors than indoors) and by the suction trap (1.6 versus 0.9 by the drop trap). For *C. scoticus* and *C. devulfi*, only trap and location as fixed effect were needed to obtain parsimonious models with good fit ( $r=0.98$  and  $r=0.72$ ). Both species were collected more abundantly by the suction trap (predicted abundance was 0.22 and 0.26 versus 0.04 and 0.04), and *C. scoticus* was collected more abundantly outdoors (between 9 and 22 fold more abundant outdoor than indoor).

### Circadian Host-seeking Activity

During collections, the time of sunrise ranged from 6h49 (GMT +1) the 26<sup>th</sup> April to 8h06 the 8<sup>th</sup> October, when the sunset ranged from 21h01 to 19h24 between the same dates.

In spring, *C. brunnicans* exhibited two peaks of diel activity. Host-seeking activity increased rapidly just after sunrise, and then slowly decreased during the next 5 hours. Host-seeking activity started again 5 hours before the sunset, reaching a peak just after sunset and then decreasing rapidly (Fig. 2).

Host-seeking activity of *C. obsoletus* was recorded mainly around sunset. In spring and autumn, host-seeking activity started slowly 2 hours before sunset, peaked just before sunset and then decreased rapidly (Fig. 2). In summer, we observed a similar pattern of host-seeking activity except that the peak occurred just after sunset. Minor host-seeking activity was recorded around sunrise, especially in autumn. Outside these 2 periods, host-seeking activity ceased. The surprising peak observed in the middle of the afternoon (15h20) was the result of a single collection with the drop trap.

The same pattern, i.e. host-seeking activity mainly around sunset and a small amount around sunrise, was observed for *C. devulfi*, *C. chiopterus* and *C. scoticus*, even if the low number of females collected did not provide details of the daily host-seeking activity for these 3 species.

Almost all the collections were carried out without any rainfall. Comparing *Culicoides* abundance with data logger records, we noted that *Culicoides* were collected across a large range of temperature (Fig. 3): single individuals were collected at temperatures as lowest as 4.8°C and the first substantial catch (60 *Culicoides*) with low temperatures was recorded at temperatures between 8.4 and 10.4°C. Low relative humidity did not seem to inhibit host-seeking activity (Fig. 3) as 47 *Culicoides* were collected between 32 and 52% relative humidity. Moreover, we noted that the first significant catch (16 *Culicoides*) with strong wind was recorded with a wind speed of 5 m/s, but only 2/3 of collection sessions could be analyzed. Indeed, due to technical problems, local meteorological parameters were missing for some collection sessions.

*Culicoides brunnicans* biting rates in spring assessed by drop trap or suction trap were linearly and positively correlated with the abundance in the UV-light/suction trap ( $R^2=0.55$ ,  $p<0.001$ ), but some collections were positive in host-baited traps but not in UV-

**Table 1.** Numbers of *Culicoides* collected over 18 sessions in spring, summer and autumn by host-baited traps and UV-light/suction trap.

Location	R <sup>1</sup>	Species	Host-baited traps												UV-light/suction trap														
			Total						Suction Trap						Drop Trap						Total								
			F	M	F	P	F	P	Spring	Summer	Autumn	Total	Spring	Summer	Autumn	Total	Spring	Summer	Autumn	Total									
OUTDOORS	Field	<i>C. brunnicans</i>	592	24	111	17	475	50	24	6	67	140	62	126	5	62	14	93	140	62	126	5	62	14	93				
		<i>C. obsoletus</i>	193	3	31	55	61	54	27	63	2	17	65	42	60	1	15	40	186	16	17	59	95	43	3	74	38	13	
		<i>C. scoticus</i>	43		29	81	5	40	2		2	6	83				1		29	2	18	33	8	75		3	2		
		<i>C. punctatus</i>	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	27	4				7	57	20	80	4		
		<i>C. festivipennis</i>															22					11	100	11	91				
		<i>C. pulicaris</i>	8	2	1	1	1	1	5	40							12	1				12	50	1					
		<i>C. dewulfi</i>	16	5	3	3	6	33	1	1																			
		<i>C. chiptenus</i>	10	4	5	100			1																				
		<i>C. poperinghensis</i>	2						2								6	6											
		<i>C. ochyai</i>														4													
		<i>C. lupicaris</i>	1		1											3	2												
		<i>C. vexans</i>	3	2					1							1	1												
		<i>C. nubeculosus</i>	3						1							1													
		<i>C. simulator</i>														3													
		<i>C. kibunensis</i>														2													
		<i>C. santonicus</i>	1	1												1	2	1											
		<i>C. fascipennis</i>														1													
		<i>C. pictipennis</i>														1	1												
		<i>C. salinarius</i>														1													
		<i>C. punctifollis</i>														1													
		Obsoletus Complex	24	3	9	67	2	9	55	1					10	1													
		Pulicaris Group	1						1																				
<b>Total Field</b>			<b>900</b>	<b>29</b>	<b>189</b>	<b>86</b>	<b>38</b>	<b>4</b>	<b>514</b>	<b>24</b>	<b>55</b>	<b>1</b>	<b>18</b>	<b>451</b>	<b>88</b>	<b>174</b>	<b>64</b>	<b>164</b>	<b>4</b>	<b>113</b>	<b>20</b>								
INDOORS	Largely open stable	<i>C. brunnicans</i>	1	1																									
		<i>C. obsoletus</i>	13	2	1	3	9	56	2																				
		<i>C. scoticus</i>	4	2																									
		<i>C. dewulfi</i>	1																										
		<i>C. newsteadii</i>	1																										
		Obsoletus Complex	1																										
<b>Total Largely open stable</b>			<b>21</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	
Closed stable		<i>C. brunnicans</i>	2	1																									
		<i>C. obsoletus</i>	18	4	8	25	1	1	1	7																			

Table 1. Cont.

Location	R <sup>1</sup>	Species	Host-baited traps						UV-light/suction trap											
			Suction Trap			Drop Trap			Total			Spring			Summer			Autumn		
			Spring	Summer	Autumn	Spring	Summer	Autumn	Spring	Summer	Autumn	Spring	Summer	Autumn	Spring	Summer	Autumn			
3		<i>C. scoticus</i>	2	2	1	1	1	1												
4		<i>C. parvicollis</i>	1																	
8		<i>C. chloperus</i>	3	1	3															
		Obsoletus Complex	1																	
		<b>Total Closed stable</b>	<b>27</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>56</b>	<b>6</b>	<b>516</b>	<b>24</b>	<b>56</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>6</b>	<b>20</b>
		<b>TOTAL</b>	<b>948</b>	<b>38</b>	<b>203</b>	<b>95</b>	<b>2</b>	<b>58</b>	<b>2</b>	<b>516</b>	<b>6</b>	<b>516</b>	<b>24</b>	<b>56</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>64</b>	<b>164</b>	<b>4</b>	<b>113</b>

<sup>1</sup>R: species rank calculated with the total number of individuals whatever the trap and the season.

<sup>2</sup>F: females; (P): parity rate as No. parous/No. females (given in percentage if F > 5); M: males. For the sake of clarity, 0 were not quoted.

<sup>3</sup>ND: not done. The drop trap was not used in the largely open stable, and only one UV-light/suction trap was used outdoors.

doi:10.1371/journal.pone.0048120.t001

light/suction trap, or conversely (Fig. 4). Correlation was much lower for *C. obsoletus* ( $R^2 = 0.13$ ,  $p = 0.032$ ), although it seemed that UV-light/suction trap tended to over-estimate biting rates.

## Discussion

We described endo/exophagy and circadian host-seeking activity of Palaearctic *Culicoides* species using drop trap and suction trap collections. The mean number of *Culicoides* per collection was rather low. It illustrated the highly variable *Culicoides* abundance in space and time. Indeed, up to 3,000 *Culicoides* were collected at this site by single UV-light trap night-collections, carried out independently of these collections. The trap, as a fixed effect, was necessary to model abundances of all *Culicoides* species. The drop trap collected more *C. brunnicans* than the suction trap – Viennet *et al.* [16] showed that drop trap collected more *C. brunnicans* than other host-baited trap methods – but abundances assessed by both methods were highly correlated (Pearson's  $r = 0.99$ ). The suction trap collected more individuals of other species than the drop trap, and presence of gravid females suggested that this trap may have collected non host-seeking females. Moreover, differences between traps may reflect spatial variations of *Culicoides* populations. However, satisfactory concordance of abundance ( $r = 0.67$ ) for *C. obsoletus* in both traps suggested that the suction trap could be used as an efficient and easy alternative to drop trap for this species.

To date, investigations of *Culicoides* endo/exophagy had been carried out always with UV-light/suction traps [5,6,11–13,21,22], with the exception of one study [23] on ornithophilic *Culicoides* species. But UV-light/suction trap collections were greatly dependent on local conditions, such as presence and number of animals in the vicinity of trap [24], leading to complicated interpretations. For instance, *C. imicola* was collected in greater numbers by indoor animal-baited light traps than by outdoor unbaited light traps in Spain [21], in apparent contradiction with South-African descriptions, where this species exhibited exophagic behavior [5,6]. In our study, host-baited collections in outdoor and indoor (with two degrees of opening for the host-baited suction trap) conditions highlighted that Palaearctic *Culicoides* are primary exophagous insects. Some species are strictly exophagous, such as *C. brunnicans*, some others show some degree of endophagy, such as *C. obsoletus* or *C. scoticus*. Baylis *et al.* [13] showed that differences between outdoor and indoor catches decreased from summer to autumn. To explain these differences, authors suggested factors difficult to untangle. Colder temperatures and stronger wind in autumn could suppress outdoor *Culicoides* host-seeking activity – overcast conditions have been shown to decrease outdoor UV-light/suction collections [6,11]. On the other hand, autumnal conditions could also interfere in light trap efficiency – wind could modify the trap suction efficiency – or host-seeking activity could occur mainly before sunset late in the year, decreasing part of the *Culicoides* which otherwise would be collected [25,26]. Even though interaction between season and location was necessary to model *C. obsoletus* abundance, our data did not allow to clearly confirm this observation. Finally, most of *Culicoides* females collected indoors in host-baited traps may have been host-seeking females. However, the low number of gravid *C. obsoletus* indoors suggest that some females may enter into sheds to oviposit, as illustrated by the possibility to find *Culicoides* larvae indoors [27,28].

It is widely assumed that *Culicoides* are mostly crepuscular [29]. However, only few studies have described rigorously *Culicoides* circadian cycles with consecutive 24 h collections [18,19,30], and only one has considered host-seeking behavior of European *Culicoides* using horse-baited collections [20]. Two patterns of host-

**Table 2.** Mean No. observed (max) and predicted *Culicoides* for all species and the most abundant species depending on the trap, the location and the season.

Effect	Value	All species		<i>C. brunnicans</i>		<i>C. obsoletus</i>		<i>C. scoticus</i>		<i>C. dewulfi</i>	
		Observed	Pred <sup>2</sup>	Observed	Pred	Observed	Pred	Observed	Pred	Observed	Pred
Trap	Drop trap	16.4(249)	<b>4.18</b> <sup>***</sup>	13.4(237)	<b>1.94</b> <sup>***</sup>	2.1(19)	<b>0.91</b> <sup>***</sup>	0.2(4)	<b>0.04</b> <sup>***</sup>	0.1(1)	<b>0.04</b> <sup>*</sup>
	Suction trap	6.6(99)	<b>2.37</b>	2.1(63)	<b>0.45</b>	2.7(28)	<b>1.62</b>	0.8(25)	<b>0.22</b>	0.3(3)	<b>0.26</b>
Location	Outdoor	25.0(249)	<b>8.46</b> <sup>***</sup>	16.4(237)	<b>3.55</b> <sup>***</sup>	5.4(28)	<b>3.09</b> <sup>***</sup>	1.2(25)	<b>0.34</b> <sup>***</sup>	0.4(3)	<b>0.41</b>
	LOS <sup>2</sup>	1.2(6)	<b>0.99</b> <sup>**</sup>	0.1(1)	<b>0.03</b>	0.7(4)	<b>0.39</b>	0.2(2)	<b>0.04</b>	0.1(1)	<b>0.03</b>
	Indoor	0.8(6)	<b>0.38</b>	0.1(1)	<b>0.01</b>	0.5(5)	<b>0.32</b>	0.1(1)	<b>0.02</b>	0.0	<b>0.00</b>
Season	Spring	24.0(249)	5.62	19.6(237)	<b>3.55</b>	1.9(14)	<b>0.89</b>	1.3(25)	-	0.2(3)	-
	Summer	5.0(34)	2.03	0.2(3)	<b>0.04</b>	3.6(28)	<b>1.53</b> <sup>*</sup>	0.2(2)	-	0.1(0)	-
	Autumn	2.6(18)	2.17	0.0	<b>0.00</b>	2.0(14)	<b>1.38</b>	0.2(1)	-	0.2(2)	-
Sea*loc <sup>1</sup>	-	p<0.001	-	-	p<0.001	-	-	-	-	-	-

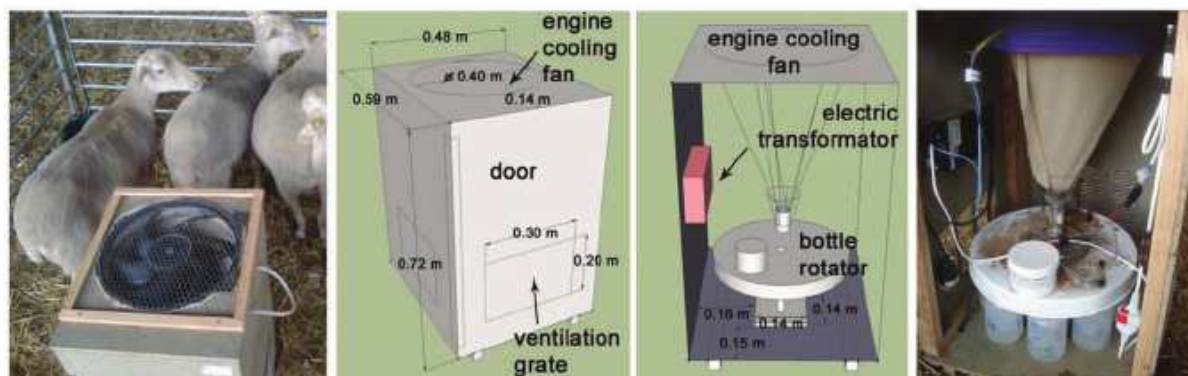
<sup>1</sup>Interaction between season and location.

<sup>2</sup>LOS: largely open stable; Pred: predicted values; NS: not significant.

<sup>3</sup>Predicted values (Pred) are in bold and underlined if analyze of variance between models with and without that effect showed significant differences with for  $\alpha = 0.05$ . P-values were given for effect modalities compared to a reference value, i.e. "suction trap" for trap, "indoor" for location and "autumn" for season ("\*\*\*" p<0.001; "\*\*" p<0.01; "\*" p<0.05; "°" p<0.1, no indication p>0.1).

seeking activity were observed during our 24 consecutive hours of collection. *Culicoides brunnicans* showed a bimodal pattern of host-seeking activity with peaks at dawn and dusk, as found by Blackwell *et al.* [31] for flight activity of *C. imbricatus*. Other species, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*, showed a main activity peak around sunset, even if some individuals could be collected around sunrise. We cannot exclude that in context of higher *Culicoides* abundance, these species present a second, but lower peak of host-seeking activity around sunrise, as highlighted by Van der Rijt *et al.* [20] for *C. obsoletus* (84 individuals collected at sunset versus 10 at sunrise). Indeed, Sanders *et al.* [32] observed two peaks of flight activity for *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus* around both sunrise and sunset. Meteorological conditions are known to impact adult midge activity [29,33]. It seems clear that windy conditions suppress the flight activity of *Culicoides* [6,31,33]. Flight activity is described experimentally as exceptional at temperatures below to 10°C and optimal at temperatures above to 20°C for *Culicoides oxystoma* Kiefler and

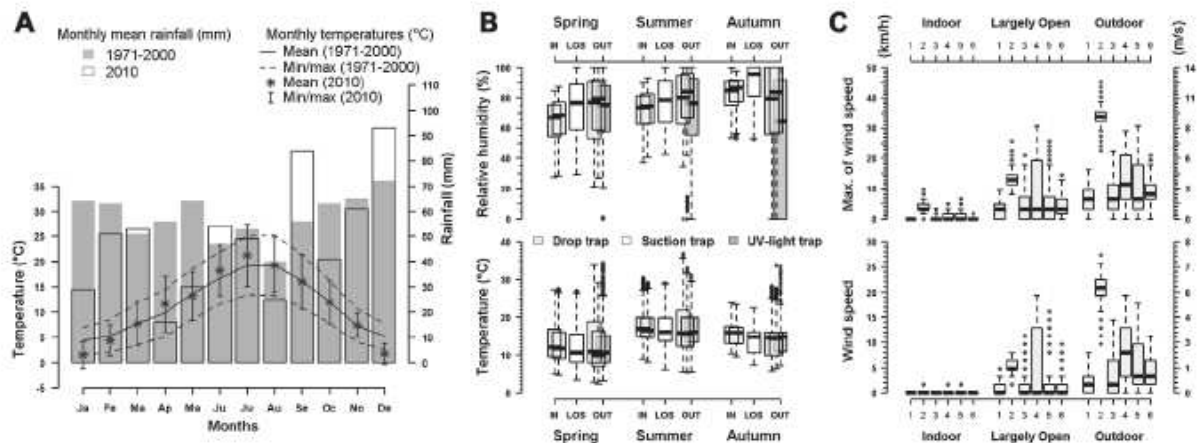
*Culicoides pictipennis* (Staeger) [34]. Finally, Blackwell *et al.* [31] found a positive correlation between flight activity of *C. imbricatus* females and relative humidity and rainfall. During our observations, relative humidity was not found to influence host-seeking activity and minimal temperature required seemed in coherence with that described by Tsutsui *et al.* [34]. We found that the highest host-seeking activity occurred in low sunlight, corresponding to twilight periods. Changes in light intensity during the day could explain "abnormal" host-seeking activity. For instance, 15 *C. obsoletus* were collected in the middle of the afternoon (at 15h20) one day of June (Fig. 2). During this afternoon, sunlight decreased from 120 (14h00) to 77 (15h00) and to 20 J/cm<sup>2</sup> (16h00), compared to means of 226 (14h00), 224 (15h00) and 225 (16h00) the other collection days of June. The first consequence is the possible lengthening of *Culicoides* attack hours when low-light overcast conditions prevail leading to biting throughout the day, as is known in open pastures for *C. imbricatus* or *C. obsoletus* and in forested environments for *C. obsoletus* [17,35]. The other conse-



**Figure 2.** Circadian host-seeking activity of *C. brunnicans* and *C. obsoletus*; total number of females collected outdoor by host-baited traps at each session and day time. Small symbols are single collection and lines with large symbols the means by period. Vertical lines symbolize the time of sunrise and sunset.

doi:10.1371/journal.pone.0048120.g002





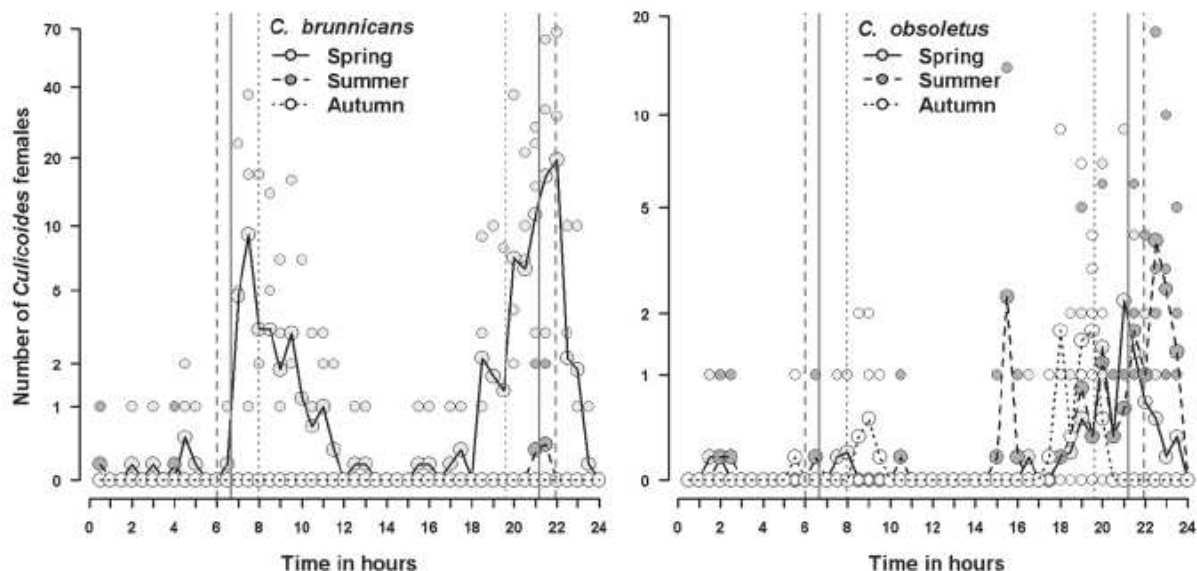
**Figure 3. Number of *Culicoides* collected outdoor in host-baited traps compared to temperature and relative humidity recorded by data loggers.** Lines are the distribution histogram of meteorological parameters recorded during the collections.  
doi:10.1371/journal.pone.0048120.g003

quence is the possible nocturnal host-seeking activity of *Culicoides* due to moon illumination, as observed for North-American *Culicoides* species by Barnard and Jones [18] or Lillie *et al.* [19]. Therefore, it would be interesting to study influence of moon light and moon phases on circadian host-seeking activity of Palaearctic *Culicoides*. Sunset and sunrise times depend on locality and season, leading to a change in host-seeking activity times throughout the year. Moreover, *C. obsoletus* was active before sunset during spring and autumn, and after sunset during summer, illustrating the influence of other parameters than sunlight. This could be an adaptation to temperatures as suggested by Lillie *et al.* [19] who found the same pattern change throughout the year.

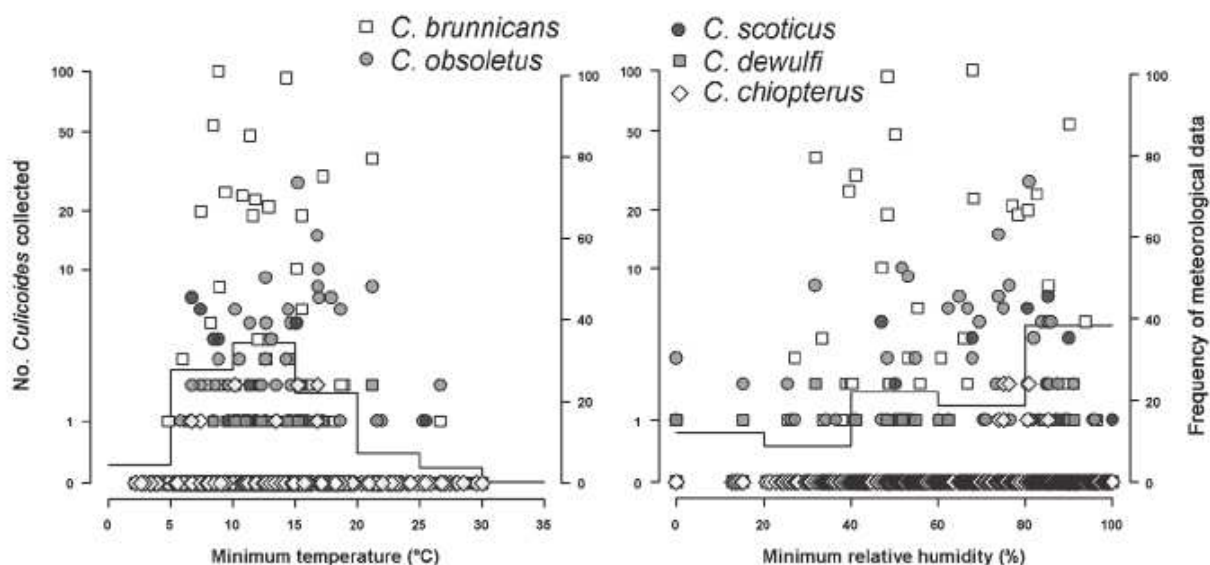
Finally, this work allowed the comparison of biting midge abundance in sheep-baited traps and in UV-light/suction traps,

operated as a standardized method. Due to experimental design, these methods could not be rigorously compared. A positive and high correlation could be established for *C. brunnicans*, showing that UV-light collections may be used without correction to follow changes in biting rates. Correlation was worse for *C. obsoletus*, but the tendency of biting rate over-estimation by the UV-light/suction trap was already recorded by Carpenter *et al.* [14] and Viennet *et al.* [16].

To conclude, in farms with grazing animals, keeping valuable animals in closed stables would limit their risk to be bitten by *Culicoides* and then to be infected by *Culicoides*-borne pathogens, as biting midges seem to be primarily exophagic insects. However, practical recommendations are difficult to provide because of the variation in the degree of endophagy and time of host-seeking



**Figure 4. Correlation between the numbers of *C. brunnicans* and *C. obsoletus* collected outdoor in host-baited traps and in UV-light/suction trap.**  
doi:10.1371/journal.pone.0048120.g004



**Figure 5. Sketch map of the study site at Nouzilly (western France) with the location of the sheep-baited traps (drop trap and suction trap) in the three sites (field, large-open-stable, closed stable) and of the UV-light/suction trap.**  
doi:10.1371/journal.pone.0048120.g005

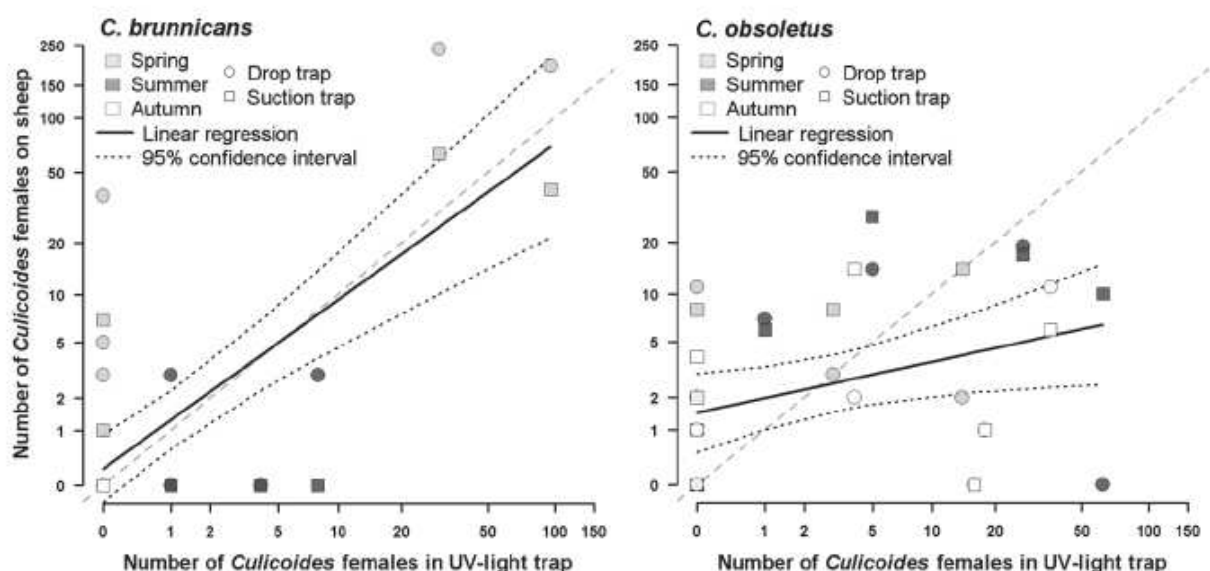
activity. The activity parameters depend on *Culicoides* species, host abundance, season, stabling conditions and weather. This illustrates the consequence of evolutionary processes selecting the ability of hematophagous insects to ensure host encounter in time and space.

**Materials and Methods**

**Study Site and Culicoides Collections**

Indoor and outdoor collections were carried out during six collection periods of 24 hours in April/May, in late June and in

September/October 2010 on an experimental farm (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UE1277 PFIE) breeding sheep and located in Nouzilly (47°33'01''N; 00°47'52''E), western France. Three areas were investigated: a field (61×103 m), a closed stable (17×45 m) and a largely-open stable (30×10 m) (Fig. 5). The closed stable had closed windows (1×0.64 m; 30 windows west side and 12 east side) and two large doors (3.1×3.4 m) half open, thus about 3% of the walls were open surface. The largely open stable was constituted by 3 walls, 1 roof and 1 open side, and openings constituted about 38% of the wall surface. During collections, meteorological conditions (air temper-



**Figure 6. Inside and outside schemes and pictures of the suction trap.**  
doi:10.1371/journal.pone.0048120.g006



ature, relative humidity, wind speed and direction, solar radiation, rainfall and atmospheric pressure) were recorded every five minutes using a weather station Vantage Pro 2 (Davis Instruments France). Temperature and relative humidity were also recorded by a Tiny Tag TGP-4500 data logger at each trap location. Monthly meteorological data recorded by the national weather station (Météo-France) at Parçay-Meslay (47°26'36''N; 00°43'36''E; 13 km from the study site) in 2010 were used to illustrate meteorological conditions during the year of collections.

We collected *Culicoides* using one drop trap and one suction trap in the field and in the closed stable, and one suction trap in the largely-open-stable (Fig. 5). All traps were separated by a minimum of 30 m to minimize interference and to assess the level of endophagy of *Culicoides*. The drop trap is a host-baited trap and consisted of a rectangular cage (2.5 m wide × 3 m long and 2 m high) and made of white cotton netting (<0.25 mm<sup>2</sup> mesh size). Its structure and use was described in detail by Viennet et al. [16]. The suction trap allows *Culicoides* collections without human intervention and consisted of a wooded box (48 cm wide × 58 cm long and 73 cm high) equipped with a engine cooling fan at the top and an inner collection bottle rotator (model 1512, John W. Hock Company, Gainesville, FL) (Fig. 6). *Culicoides* were collected in 0.5 liter plastic collection bottles, which were filled 1/3 full with water and two drops of soap, and then were transferred in 70% ethanol.

Traps were operated during 24 consecutive hours (from 12 pm to 12 pm the next day), giving 48 collections at 30 min intervals, 6 times at each of the three 2-week periods. Each trap was baited with four south-Prealpes sheep females of 3 to 5-years old and 55 to 65 kg weight enclosed in a pen (2.5 m long × 2 m wide × 1.3 m high). There were no horses or cattle within 200 m from the sites during the collection sessions. The protocol was examined internally in the *Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale* (UE1277 PFIE) by an internal group in charge of animal welfare, including veterinary surgeon and animal keepers. The protocol procedure did not cause any pain or stress, *i.e.* no injection, no biological sample, no surgery. Thus, according to the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes in Europe, it was not necessary to submit this protocol to an ethics committee and each step of the protocol was conducted with respect to the standard ethical rules: staff were qualified for animal experimentation and premises were licensed for experimentation.

In parallel, a UV-light/suction trap (manufactured by the Onderstepoort veterinary institute in South Africa) was operated during each collection session to provide an overview of *Culicoides* diversity. It was run with an 8 W UV light tube and on a 12-volt car battery, was placed at 1.5 m height from the ground on a tree and was not visible from the animal baits (Fig. 5). The insects collected with the UV-light/suction trap were stored in 70% ethanol.

## References

- Combes C (2000) Selective pressure in host-parasite systems, *Journal de la Société de Biologie* 194: 19–23.
- Combes C (2010) *L'art d'être parasite: les associations du vivant*; Flammarion, editor, Paris.
- Clements AN (1999) *The biology of mosquitoes. Sensory reception and behaviour*; Oxon, editor, New York: CAB.
- Tauber CA, Tauber MJ (1981) Insect seasonal cycles: genetics and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 201–308.
- Barnard BJH (1997) Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 64: 227–233.
- Meiswinkel R, Baylis M, Labuschagne K (2000) Stabling and the protection of horses from *Culicoides bulbosus* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bulletin of Entomological Research* 90: 509–515.
- Wilson AJ, Mellor PS (2009) Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364: 2669–2681.
- Velthuis AGJ, Saatkamp HW, Mouris MCM (2009) Financial consequences of the dutch bluetongue serotype II epidemics of 2006 & 2007. *Preventive Veterinary Medicine*: 11.

## *Culicoides* Identification

All *Culicoides* were morphologically identified under a stereomicroscope (Stemi 2000 C ZEISS) to species level based on an identification key for the Palaearctic region [36] and sorted by sex. Females were classified as nulliparous, parous [37], freshly blood-fed and gravid. When morphological identification with a stereomicroscope was not possible, individuals were dissected and identified using microscopic slide preparations (ZEISS imager A.1 fluorescence microscope).

Individuals belonging to the *Obsoletus* Complex (*C. obsoletus* and *C. scoticus*) were molecularly identified following the assay developed by Nolan et al. [38]. DNA extraction was done high-throughput using Chelex100<sup>®</sup> resin (200 µL/*Culicoides*) before polymerase chain reaction (PCR) [39]. Primers and PCR amplifications conditions were as described by Nolan et al. [38].

## Statistical Analysis

Outdoor activity of *Culicoides* was compared between periods of the year to highlight influence of day length on circadian activity and was compared with climatic conditions to assess influence of meteorological parameters on host-seeking activity.

Abundance of *Culicoides* species was modeled using a Poisson mixed-effect model fitted with a method providing an adaptive Gauss-Hermite approximation to the log-likelihood. We used the session (1 to 18) as a random effect, and the location (field, closed stable and largely-open-stable), the trap (drop trap, suction trap) and the season (spring, summer and autumn) as fixed effects. We considered also interactions between location and season, as endophagic behavior may change between the different seasons [12,13]. Selection of effects and/or interactions in the abundance model was based on a likelihood ratio test, and Pearson's product-moment correlation was used as an overall test for goodness of fit.

Finally, we tested outdoor biting rates assessed by the host-baited traps with the abundance in UV-light collections using linear models.

All data analyses were performed using the R statistical package [40].

## Acknowledgments

We are particularly grateful to the co-operators on whose premises this work was conducted. From the Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE) Inra Nouzilly, we would like to thank his director Bertrand Schwartz and P. Sarradin and all people who gave assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds, especially Dany Leguéré, Michel Maillon and Pascal Lallier). We thank Frédéric Simard (IRD-MIVEGEC) for his attentive reading.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EV CG CM T. Baldet T. Balenghien. Performed the experiments: EV CG IR XA JL RV DC MR T. Balenghien. Analyzed the data: EV CG RL T. Balenghien. Contributed reagents/materials/analysis tools: LG IF RL. Wrote the paper: EV CG T. Balenghien.

9. Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, et al. (2012) Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 18: 469–472.
10. Overgaard Nielsen B, Christensen O (1975) A mass attack by biting midge *Culicoides nubeculosus* (Mg.) (Diptera, Ceratopogonidae) on grazing cattle in Denmark a new aspect of sewage discharge. *Nordisk Veterinærmedicin* 27: 365–372.
11. Meiswinkel R, Goffredo M, Dijkstra EGM, van der Ven IJK, Baldet T, et al. (2008) Endophily in *Culicoides* associated with BTV-infected cattle in the province of Limburg, South-Eastern Netherlands, 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87: 182–195.
12. Baldet T, Delécolle JC, Cetre-Sossah C, Mathieu B, Meiswinkel R, et al. (2008) Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of Northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87: 84–97.
13. Baylis M, Parkin H, Kreppel K, Carpenter S, Mellor PS, et al. (2010) Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology* 24: 38–45.
14. Carpenter S, Szmarađ C, Barber J, Labuschagne K, Gubbins S, et al. (2008) An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology* 45: 1237–1245.
15. Gerry AC, Monteys VSI, Vidal JOM, Francino O, Mullens BA (2009) Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. *Journal of Medical Entomology* 46: 615–624.
16. Viennet E, Garros C, Lancelot R, Allene X, Gardes L, et al. (2011) Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasites & Vectors* 4: 119.
17. EFSA (2008) Bluetongue Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (Question No EFSA-Q-2007–201) adopted on 19 June 2008. *The EFSA Journal* 735: 1–70.
18. Barnard DR, Jones RH (1980) Diel and seasonal patterns of flight activity of Ceratopogonidae in Northeastern Colorado: *Culicoides*. *Environmental Entomology* 9: 446–451.
19. Lillie TH, Kline DL, Hall DW (1987) Diel and seasonal activity of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Near Yankeetown, Florida, Monitored with a vehicle-mounted insect trap. *Journal of Medical Entomology* 24: 503–511.
20. van der Rijt R, van den Boom R, Jongema Y, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM (2008) *Culicoides* species attracted to horses with and without insect hypersensitivity. *The Veterinary Journal* 178: 91–97.
21. Calvete C, Estrada R, Miranda MA, del Río R, Borrás D, et al. (2009) Entry of bluetongue vector *Culicoides imicola* into livestock premises in Spain. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 202–208.
22. Anderson GS, Belton P, Belton EM (1993) A population study of *Culicoides obsoletus* Meigen (Diptera, Ceratopogonidae), and other *Culicoides* species in the Fraser Valley of British-Columbia. *Canadian Entomologist* 125: 439–447.
23. Votýpka J, Synek P, Svobodová M (2009) Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 277–280.
24. García-Saenz A, McCarter P, Baylis M (2011) The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. *Medical and Veterinary Entomology* 25: 113–115.
25. Murray MD (1987) Local dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Zoology* 35: 559–573.
26. Kettle DS, Edwards PB, Barnes A (1998) Factors affecting numbers of *Culicoides* in truck traps in coastal Queensland. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 367–377.
27. Ninio C, Augot D, Dufour B, Depaquit J (2011) Emergence of *Culicoides obsoletus* from indoor and outdoor breeding sites. *Veterinary parasitology* 183: 125–129.
28. Zimmer J-Y, Saegerman C, Losson B, Haubruge E (2010) Breeding sites of bluetongue virus vectors, Belgium [letter]. *Emerging infectious diseases* 16: 575–576.
29. Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology* 45: 307–340.
30. Kettle DS (1969) The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbatai* Wirth & Blanton. I. The 24-h cycle, with a note on differences between collectors. *Bulletin of entomological research* 59: 21–31.
31. Blackwell A (1997) Diel flight periodicity of the biting midge *Culicoides impunctatus* and the effects of meteorological conditions. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 361–367.
32. Sanders CJ, Gubbins S, Mellor PS, Barber J, Golding N, et al. (2012) Investigation of diel activity of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in the United Kingdom by using a vehicle-mounted trap. *Journal of Medical Entomology* 49: 757–765.
33. Kettle DS (1969) The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbatai* Wirth & Blanton. II. Effects of meteorological conditions. *Bulletin of entomological research* 59: 241–258.
34. Tsutsui T, Hayama Y, Yamakawa M, Shirafuji H, Yanase T (2010) Flight behavior of adult *Culicoides oxystoma* and *Culicoides maculatus* under different temperatures in the laboratory. *Parasitology research* 108: 1575–1578.
35. Balenghien T, Cetre-Sossah C, Grillet C, Delécolle JC, Mathieu B, et al. (2008) Diurnal activity of potential bluetongue vectors in northern Europe. *Veterinary Record* 162: 323–324.
36. 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 de Doctorat d'Université mention Sciences]. Strasbourg, France: Université Louis Pasteur. 238 p.
37. Dyce AL (1969) The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Journal of the Australian Entomological Society* 8: 11–15.
38. Nolan DV, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas JF, et al. (2007) Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology* 124: 82–94.
39. Solano P, Duvallet G, Dumas V, Cuisance D, Cuny G (1997) Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica* 65: 175–180.
40. R Development Core Team (2008) An Introduction to R: Notes on R, A Programming Environment for Data Analysis and Graphics. In: Computing RfIs, editor. 3.2.1 ed. Vienna, Austria.



## **Sensibilité aux insecticides et évaluation préliminaire des méthodes de lutte antivectorielle disponibles contre les *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) paléarctiques, vecteurs de virus émergents d'intérêt en santé animale**

---

Les *Culicoides* sont des petits insectes hématophages vecteurs d'arbovirus responsables d'importantes pertes économiques au niveau mondial dans l'industrie agroalimentaire incluant le virus de la fièvre catarrhale ovine et le virus de Schmallenberg. Afin de réduire le contact entre les *Culicoides* et leur hôte, plusieurs moyens de lutte peuvent être utilisés comme la lutte écologique (modification des habitats larvaires), la lutte biologique (introduction d'un ennemi naturel dans leur environnement), la lutte mécanique (confinement des animaux dans des bâtiments) et la lutte chimique (utilisation d'insecticides). Cette dernière, restant la plus utilisée en Europe, est recommandée par les autorités sanitaires pour réduire la transmission de la maladie, ainsi que la vaccination et la restriction de mouvements des animaux pendant les périodes critiques de circulation du virus. L'utilisation de produits insecticides reste le premier recours en absence de vaccin efficace contre les nouveaux virus et les différentes souches circulantes. Néanmoins, leur efficacité est incertaine et variable selon les études menées jusqu'à présent, visant leur évaluation. Ce travail de thèse tend à **améliorer les connaissances sur les méthodes de lutte antivectorielle disponibles contre les *Culicoides* européens vecteurs de virus émergents d'intérêt en santé animale** et de proposer des procédures standardisées qui nous ont permis d'obtenir des valeurs de références, inexistantes jusqu'à présent, mais indispensables dans la lutte antivectorielle contre les *Culicoides*.

**Mots clés :** *Culicoides*, vecteurs, virus émergents, lutte antivectorielle

## **Insecticide susceptibility and preliminary evaluation of vector control methods available against Palearctic *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors of emerging viruses with interest in animal health**

---

*Culicoides* are small haematophagous insect, vectors of arboviruses responsible for significant economic losses worldwide in the food industry including the Bluetongue virus and Schmallenberg virus. In order to reduce contact between *Culicoides* and their host, several control methods can be used as the ecological control (reduction / destruction of larval habitats), biological control (introduction of a natural enemy in their environment), mechanical control (confinement of animals in buildings) and chemical control (use of insecticides). The latter remains the most widely used in Europe, is recommended by health authorities to reduce transmission of the disease, as well the vaccination and restriction of movement of animals during critical periods of virus circulation. The use of insecticides is the first resort in the absence of an effective vaccine against the new virus and different circulating strains. However, their efficacy has been evaluated in previous studies and is still uncertain and variable. This thesis aims to **improve the knowledge of vector control methods available against European *Culicoides* vectors of viruses emerging with animal health interest** and propose standardized procedures that allowed us to obtain reference values, scarce to date, but necessary for vector control against *Culicoides*.

**Keywords:** *Culicoides*, vectors, emerging viruses, vector control