

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2016

N° d'ordre : 177



THESE DE DOCTORAT

Spécialité **PARASITOLOGIE**

Présentée par : **Masse SAMBOU**

***CERATOPOGONIDAE* DU GENRE *CULICOIDES* AU SENEGAL :
IDENTIFICATION PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE, PAR MALDI-
TOF ET RECHERCHE DE PATHOGENES**

Soutenue le 31 Mars 2016, devant le jury composé de :

Président	Professeur	Ben Sikina TOGUEBAYE	FST/UCAD
	Professeur	Mbacke SEMBENE	FST/UCAD
Rapporteurs	Docteur	Lionel ALMERAS	IRD/ AMU
	Professeur	Jérôme DEPAQUIT	URCA
Examineurs	Professeur	Ousmane FAYE	FST/UCAD
	Docteur	Cheikh SOKHNA	IRD/ AMU
Co-directeur	Docteur	Oleg MEDIANNIKOV	IRD/ AMU
Directeur de thèse	Professeur	Ngor FAYE	FST/UCAD

Dédicaces

Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire de thèse:

À notre cher Papa (**PAIX A SON AME**) pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts. Tu as été pour nous un ami, un papa extraordinaire. Tu avais attendu ce jour, mais Dieu a décidé autrement.

Que le tout Puissant t'accorde la vie éternelle.

Amen.

A notre Maman, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. 'emit essen bulong baa bakee'.

A ma grande sœur Diminga Ango Sambou, c'est avec un cœur ému que je rédige ces quelques lignes pour exprimer mes sentiments pour toi. Tu as été une confidente pour moi et un exemple de persévérance, de courage et de générosité. A vrai dire je ne saurais exprimer exactement ma reconnaissance tellement elle est grande. Que le tout puissant t'accorde la santé et un très bon succès dans tous tes projets.

A mon fils Oleg Elisse Sambou et à sa maman Flora Djambonie Sambou qui a fait preuve de patience, de confiance et surtout d'amour malgré la distance qui nous éloigne et l'influence de notre société. Que la bénédiction de nos parents et du Tout Puissant soit toujours avec nous.

AMEN

Ce travail de thèse a été réalisé à
l'Institut de Recherche pour le Développement
– (IRD) UMR 198 Dakar –

Dans l'Unité de Recherche des Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes
(URMITE) et plus particulièrement au sein de l'équipe Maladies infectieuses
émergentes (MIE).

Sous la direction du Docteur Oleg MEDIANNIKOV

Avec la collaboration du laboratoire de Parasitologie Générale du Département
de Biologie animale de la faculté des sciences et techniques / UCAD

Sous la supervision du Professeur Ngor FAYE

En cet effet, je tiens à présenter mes sincères remerciements :

Au Docteur Oleg MEDIANNIKOV, tu as bien voulu assurer l'encadrement de mes travaux de recherches depuis mon master à la thèse. Je ne saurais, à vrai dire, exprimer suffisamment ma reconnaissance tellement elle est grande, profonde et risquerait d'être limitée par ces maigres mots. Il va de soi que de travailler et d'évoluer sous ton aile n'a été que bénéfique.

Au Professeur Ngor FAYE (Chef du Département de Biologie Animale), personnalité au combien attachante et surprenante par son savoir. Tu as su faire preuve d'une extrême patience, d'une très bonne pédagogie, de beaucoup de compréhension et de bienveillance qui, à mon avis, sont rares et vraiment très chères à mes yeux.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à l'unité de recherche des maladies infectieuses et tropicales émergentes, au sein de laquelle j'ai réalisé ce travail, pour son accueil chaleureux et son soutien.

Je remercie plus particulièrement :

Au Docteur Cheikh SOKHNA, responsable de l'URMITE à Dakar, pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe depuis mon master à la thèse et pour m'avoir soutenu durant ces périodes. Votre modestie m'a surtout marqué durant ces années de partage scientifique et social. Vous avez toujours répondu à mes demandes et disponible malgré vos multiples fonctions au sein de l'URMITE.

A Monsieur le président de l'IRD, Michel LAURENT, pour m'avoir accueilli au sein de votre prestigieux institut.

Au Professeur Didier RAOULT, Directeur de l'URMITE Marseille, pour avoir accepté de nous accueillir dans votre laboratoire, durant nos séjours de recherche en France et pour avoir mis à notre disposition les conditions idéales à la réalisation de ces travaux. Ainsi qu'à toute l'équipe URMITE de Marseille pour le soutien moral, matériel et pour les moments de partages.

A Monsieur le Professeur TOGUEBAYE B. Sikina, Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury, et pour nous avoir accueilli dans la formation doctorale de Parasitologie.

Hommages respectueux,

Ce travail, ne serait présenté sans l'avis considérable des rapporteurs ; ainsi :

Je tiens aussi, à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche. Je remercie, particulièrement, Monsieur Lionel ALMERAS, Monsieur Mbacké SEMBENE (Responsable de la Formation Doctorale « Génétique des Populations » SEV/UCAD), Monsieur Géromé DEPAQUIT (Directeur de l'équipe « transmission vectorielle et épidémiosurveillance de maladies parasitaires » URCA), d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je suis également reconnaissant envers Monsieur le Professeur Ousmane FAYE, pour avoir bien voulu faire partie de mon jury.

Hommages respectueux,

Ce travail porté à mon nom a été le fruit de l'équipe Malades Infectieuses Emergentes (MIE). En outre, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'ensemble de l'équipe MIE de l'URMITE et plus particulièrement à :

Maxence LADRIX-AUBADIE, tu as pris tes fonctions au démarrage de cette recherche et tout naturellement tu t'es intéressé à ces travaux. Efficace et rapide, tu m'as apporté beaucoup d'aide pour la collecte et à l'analyse des spécimens, de précieux conseils dans tous les domaines et pour la rédaction du manuscrit. Cher Binôme Maxence, je te remercie très sincèrement.

Monsieur Hubert BASSENE pour la confiance qu'il m'a accordée pendant la réalisation de ces travaux, pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, et sa réactivité pour toujours trouver des solutions,

Monsieur le Docteur Alpha K KEITA, pour avoir encadré une partie de mes travaux de thèse. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup aimé travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils.

Monsieur le Docteur Georges DIATTA pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche et pour la confiance qu'il m'a accordée durant la réalisation de ces travaux.

Monsieur le Docteur Bruno SENHOR pour les corrections, son soutien et pour sa collaboration.

Un merci spécial aux techniciens Omar BALDE, Louis BARBOZA, Goumbala, Amy THIOUNE et Sawoudiatou DJIBA.

Je remercie également toutes les personnes (Dr. Moussa Fall, Dr Assane G Fall, ...) du Laboratoire LNERV/ISRA que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces années de recherche.

Merci à tous nos camarades Etudiants et Doctorants de l'URMITE (Sénégal/Marseille) ainsi que ceux qui ont le grade de Docteur pour ces années de partages scientifiques. Mais également à tous mes camarades de promotions.

Un merci à mon grand frère **Jonas Sambou** pour m'avoir soutenu et aussi à Noël Sambou ainsi que toute sa famille ; à mes cousins et neveux : **Paulin Sambou, César Bassene, Baudoin Sambou, Enry Sambou, Jean Paul et Paul Jules Sambou**

Je tiens à remercier aussi **Albert Samboukho Sambou, Diadia Sambou, Marcel B Sambou, Abdoulaye Diallo Thomas N Manga et Jeannot Sambou** ainsi que mes Tantes Pascaline Sambou (**PAIX A SON AME**), Léontine Sambou et oncles qui m'ont toujours soutenu et encouragé à poursuivre dans cette voie.

Merci aussi à mes amis pour leur compréhension et leurs encouragements. Un merci tout particulier à **Cheik I LO, Basile S Sambou «ZEUM », Séga Manga, Djanta Paulin Manga, Boubacar Keita et Dady Manga** pour les moments difficiles partagés. J'espère n'oublier personne mais dans le doute : Merci à tous ceux qui ont croisé ma route pendant ces années de thèse et qui directement ou indirectement ont apporté leur pierre à l'édifice!

J'aimerais de plus remercier le Programme « Robert S. McNamara Fellowship Program » de la Banque mondiale pour avoir financé une partie du développement de nos travaux.

And, last but not least, je remercie **Flora Djambonie SAMBOU**, pour son aide, sa patience et son soutien! Merci d'avoir été présente pour moi. Merci (et bravo) de m'avoir supporté pendant les moments de doute. Maintenant, je suis prêt : place à de nouvelles aventures...

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
PREMIER CHAPITRE : TRAVAUX DE SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES CERATOPOGONIDAE DU GENRE CULICOIDES	9
Introduction	11
I.1. Taxonomie	12
I.2. Biologie des <i>Culicoides</i>	13
I.2.1. Morphologie des <i>Culicoides</i>	13
I.2.2. Cycle biologique et écologie des <i>Culicoides</i>	17
I.2.2.1. Cycle biologique des <i>Culicoides</i>	17
I.2.2.2. Ecologie des <i>Culicoides</i>	19
I.2.2.3. Facteurs influençant la biologie	20
I.3. Méthodes d'identification	21
I.3.1. Identification morphologique	21
I.3.2. Identification par biologie moléculaire	22
I.3.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF	25
I.4. Pathogènes transmis ou associés au <i>Culicoides</i>	28
I.4.1. Virus	28
I.4.1.1. Fièvre catarrhale ovine ou Maladie de la langue bleue	29
I.4.1.2. Maladie hémorragique épizootique ou "Epizootic hemorrhagic disease (EHD)	30
I.4.1.3. Virus Schmallenberg ou "Schmallenberg virus (SBV)"	31
I.4.1.4. Virus Oropouche ou "Oropouche virus (OROV)	32

I.4.1.5. Virus du Nil occidental (VNO) ou "West Nile Virus (WNV)"	32
I.4.1.6. La peste équine ou "African Horse Sickness Virus (AHSV)"	33
I.4.1.7. Virus de l'encéphalose équine ou "Equine encephalosis virus (EEV)"	33
I.4.1.8. Virus Akabane ou "Akabane Virus (AKAV)"	33
I.4.1.9. Fièvre éphémère bovine ou "Bovine ephemeral fever virus (BEFV)"	34
I.4.1.10. Fièvre de la Vallée du Rift (FVR)	34
I.4.2. Protozoaires	35
I.4.2.1. <i>Leishmania</i> spp	35
I.4.2.2. <i>Leucocytozoon caulleryi</i>	35
I.4.2.3. Autres protozoaires	36
I.4.3. Les helminthes	36
I.4.3.1. <i>Mansonella perstans</i>	36
I.4.3.2. <i>Mansonella ozzardi</i>	37
I.4.4. Bactéries	37
I.5. Relations hôtes vecteurs	38
Discussion du chapitre 1	41
DEUXIEME CHAPITRE : TRAVAUX DE THESE	43
II.1. Matériel et Méthodes d'étude	45
II.1.1. Zones d'étude	45
II.1.1.1. Mlomp (Basse Casamance)	45
II.1.1.2. Toubacouta (Sine Saloum)	47
II.1.1.3. Kédougou (Sénégal oriental)	48

II.1.2. Collecte et traitement des échantillons sur le terrain	49
II.1.2.1. Piégeages lumineux	49
II.2.2. Traitement au laboratoire	52
II.2.2.1. Identification morphologique	52
II.2.2.2. Identifications par MALDI-TOF MS	52
II.2.2.2.1. Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF	52
La source d'ionisation (MALDI)	53
L'analyseur temps de vol de masse	54
Le détecteur	55
II.2.2.2.2. Méthode d'identification	56
II.2.2.2.2.1. Préparation des échantillons pour le MALDI-TOF MS	57
II.2.2.2.2.2. Analyse des résultats	57
II.2.2.2.3. Culture et isolement	59
II.2.2.3. Biologie Moléculaires (amplification PCR et séquençage)	59
II.2.2.3.1. Extraction d'ADN	59
II.2.2.3.2. Amplification par PCR classique	61
II.2.2.3.3. L'amplification de gènes cible en temps réel (QPCR)	61
II.2.2.3.4. Séquençage (Sanger)	63
II.2.2.3.5. Analyse des séquences	63
II.2.2.4. Identification des espèces <i>Culicoides</i> par la biologie moléculaire	65
II.2.2.5. Identifications de filaire par la biologie moléculaire	65
II.2.2.5.1. Etude rétrospective des lames de goutte épaisse	65

II.2.2.5.2. Recherche de filaires du genre <i>Mansonella</i> chez les <i>Culicoides</i>	65
II.2.2.5.3. L'analyse statistique	66
II.2. RESULTATS OBTENUS	69
Etude n°1 : Identification des <i>Culicoides</i> par Maldi-Tof et par Biologie Moléculaire	71
Introduction	71
Résumé de l'étude n°1	74
 Article: Comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for the identification of <i>Culicoides</i> (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal	75
Résultats hors de l'article	85
Echantillonnage et détermination morphologique des culicoïdes	85
Discussion de l'étude n°1	86
Etude n°2 : Identification de Pathogènes chez les <i>Culicoides</i>	89
Introduction	91
Résumé de l'étude n°2 (Partie A)	93
Article: High Prevalence of <i>Mansonella perstans</i> Filariasis in Rural Senegal	95
Résultats hors article	107
Détection de bactéries par PCR	107
Isolement de bactéries par culture bactérienne	107
Détection de filaires	107
Discussion de l'étude n°2 (Partie A)	113

Résumé de l'étude n°2 (Partie B): Identification de « virus géants » chez les <i>Culicoides</i> par la métagénomique virale.....	115
Article : Faustovirus-Like Asfarvirus in Hematophagous Biting Midges and Their Vertebrate Hosts.	117
DISCUSSION GENERALE	131
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	147
ANNEXES	175
Annexe 1 : Revue <i>Ceratopogonidae</i>	177
Annexe 2 : Article New species <i>Mansonella</i>	211

Abréviations

ADN / DNA	: Acide DésoxyriboNucléique / Deoxyribonucleic acid
AHSV /PE	: African Horse Sickness / Peste Équine
AKAV	: Akabane virus
ANOFEL	: Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie
ANSD	: Agence Nationale de Statistique et de la Démographie
ARC-OVI	: Agricultural Research Council- Onderstepoort Veterinary Institute
BEFV	: Bovine Ephemeral Fever Virus
BT / FCO	: Bluetongue / Fièvre Catarrhale Ovine
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
COI	: Première sous-unité du cytochrome oxydase / Cytochrome oxidase subunit I
Da/ kDa	: dalton/kilodalton
dATP,	: désoxyadénosine triphosphate
dCTP,	: désoxycytidine triphosphate
dGTP,	: désoxyguanosine triphosphate
dTTP	: désoxythymidine triphosphate
ddATP,	: didésoxy-adénine tri-phosphate
ddCTP,	: didésoxy-cytosine tri-phosphate
ddGTP,	: didésoxy-guanine tri-phosphate
ddTTP	: didésoxy-thymine tri-phosphate
ddNTP	: didésoxyribonucléotides
dNTP	: désoxyNucléotide TriPhosphate
EEV	: Equine Encephalitis Virus
EHDV	: Epizootic Hemorrhagic Disease Virus
FVR	: Fièvre de la vallée du Rift
HPD	: Hôpital Principal de Dakar
α-HCCA	: α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid
ITSI	: Internal transcribed spacer 1 / espace intergénique transcrit
ITSII	: Internal transcribed spacer 2 / espace intergénique transcrit
km²	: Kilomètre carré
MALDI-TOF	: Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation Time-Of-Flight
MS	: Mass spectrometry / Spectrométrie de Masse

Mg²⁺	: Ion Magnésium
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
OROV	: Oropouche virus
OVI	: Onderstepoort Veterinary Institute
PCR	: Polymerase Chain Reaction / amplification en chaîne par polymérisation
POC	: Point-of-Care
qPCR	: PCR quantitative ou PCR en temps réel
SARAMISTM	: Spectral Archive And Microbial Identification System
SB/SBV	: Virus de Schmallenberg / Schmallenberg Virus
5S	: Gène codant pour la sous-unité 5 du ribosome
TDR	: Test de Diagnostic rapide
VNO/WNV	: Virus du Nil Occidental / West Nile Virus
URMITE	: Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes

Liste des figures

Figures hors articles.

Figure 1:	Photo de <i>Culicoides kingi</i>	p11
Figure 2:	Palpe de <i>C. milnei</i> (Cornet <i>et al.</i> , 1974)	p11
Figure 3:	Aile de <i>C. milnei</i> femelle du Kenya (Cornet <i>et al.</i> , 1974)	p12
Figure 4:	Armature génitale d'une femelle (A) et mâle (B) de <i>Culicoides</i> Ae et Ai : apodème externe et interne du coxite ; As : anneau sclérifié du conduit des spermathèques ; C : cerque; Cx : coxite ; E : édéage ; Og : orifice génital; P : paramère; Sp : spermathèque ; St VII, St VIII, St IX, St X : septième, huitième, neuvième et dixième sternites; St IX : neuvième sternite; T IX : neuvième tergite ; St : style.	p12
Figure 5:	Larves de <i>Culicoides</i> (Zimmer <i>et al.</i> , 2014)	p13
Figure 6:	Nymphes de <i>Culicoides</i> (Zimmer <i>et al.</i> , 2014)	p14
Figure 7:	Cycle de vie des espèces de <i>Culicoides</i>	p16
Figure 8 :	Critères utilisés pour l'identification morphologique des <i>Culicoides</i> .	P19
Figure 9:	Relations phylogénétiques des espèces du genre <i>Culicoides</i> , basées sur les séquences COI.	p20
Figure 10:	Spectres de masses obtenues par MALDI-TOF de <i>C. nubeculosus</i> (Kaufmann <i>et al.</i> , 2011). A, non gorgés male (A1) et A2 (femelle). B, spectres de femelles obtenus dans les premiers jours après un repas sanguin (B1: immédiatement après, B2: 2 jours après, et B3: 5 jours après)	p23
Figure 11:	Représentation schématique d'un système vectoriel.	p24
Figure 12:	Répartition géographique des vecteurs du virus de la FCO	p26
Figure 13:	Dispensaire de Mlomp	p41
Figure 14:	Station de Dielmo (S) et le POC (P)	p43
Figure 15:	Piège OVI	p45
Figure 16:	Pose d'un piège OVI dans une case A ; piège OVI en marche pendant la nuit B	p46

Figure 17:	Photo de la glacière électrique	p46
Figure 18:	Schéma du principe d'un spectromètre de masse	p48
Figure 19:	Schéma récapitulatif du principe MALD-TOF	p51
Figure 20:	Schéma du principe de la source d'ionisation MALDI	p49
Figure 21:	Prise de photo d'aile de <i>Culicoides</i> par le Dino-Lite	p52
Figure 22:	Photo d'écran SARAMIS Premium	p53
Figure 23:	Applied Biosystems (AB)/ HITACHI 3130X/ Genetic Analyser ABI PRISM	p57
Figure 24:	Exemple de photo d'écran ChromasPro	p58
Figure 25:	Photo du BIO-RAD CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	p61
Figure 26:	Arbre phylogénétique montrant les relations entre la filaire étudiée et les espèces de la famille des <i>Onchocercidae</i> , se basant sur la comparaison des séquences du gène 5S.	P98
Figure 27:	Arbre phylogénétique montrant les relations entre la filaire étudiée et les espèces de la famille des <i>Onchocercidae</i> , se basant sur la comparaison des séquences du gène ITS1.	p100
Figure 28:	Comparaison de l'arbre phylogénétique A et du dendrogramme B Ma, <i>C. magnus</i> ; Fu, <i>C. fulvithorax</i> ; En, <i>C. enderleini</i> ; Ki, <i>C. kingi</i> ; Ne, <i>C. nevillei</i> ; Mo, <i>C. moreli</i> ; Wa, <i>C. wansonii</i> ; Mi, <i>C. milnei</i> ; Im, <i>C. imicola</i> .	p124

Liste des figures des articles publiés

Article 1 Comparison of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and Molecular Biology Techniques for Identification of *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) Biting Midges in Senegal.

Figure 1 Map of the villages where *Culicoides* spp. were collected during the study. In the Sine-Saloum, inspected villages were Dielmo, Ndiop, Toubacouta, Sourou, and Nema Bah; in Casamance, Mlomp, Kagnoute, and Elinkine were inspected; and in Kédougou, Bandafassi, Mbaning, Ibel, and Tiabéji were inspected.

Figure 2 Photographs of wings of slide-mounted representatives of *Culicoides* specimens viewed under a light microscope. The same individuals were used for molecular and MALDI-TOF identification. p72

Figure 3 A consensus phylogenetic tree showing the relationships of the studied species of *Culicoides* based on COI sequence comparisons. GenBank accession numbers are indicated. p73

Figure 4 MALDI-TOF Vitek mass spectra in the range of 2 to 14 kDa of 10 field-caught *Culicoides* insects (*C. kingi*, *C. imicola*, *C. nevillei*, *C. moreli*, *C. magnus*, *C. wansoni*, *C. fulvithorax*, *C. enderleini*, *C. milnei*, and *C. oxystoma*).

Six SuperSpectra (in green), *C. kingi*, *C. imicola*, *C. magnus*, *C. fulvithorax*, *C. enderleini*, and *C. oxystoma*, were created. The most remarkable specific peaks are indicated by the arrows. p74

Figure 5 Dendrogram of MALDI-TOF Vitek mass spectra in the range of 3 to 20 kDa of thoraxes from 2 to 4 individuals of 10 species of field-caught *Culicoides* biting midges.

Ma, *C. magnus*; Fu, *C. fulvithorax*; En, *C. enderleini*; Ki, *C. kingi*; Ne, *C. nevillei*; Mo, *C. moreli*; Wa, *C. wansoni*; Mi, *C. milnei*; Im, *C. imicola*. p75

Article 2: High Prevalence of *Mansonella perstans* Filariasis in Rural Senegal.

Figure 1: Study site in Senegal, with the prevalence of *Mansonella perstans* among the population in parentheses when available. p96

Article 3: Faustovirus-Like Asfarvirus in Hematophagous Biting Midges and Their Vertebrate Hosts.

FIGURE1 Sampling sites. 106

FIGURE2 Phylogenetic reconstruction of Faustovirus detected in biting midges' viromes based on the (A) nucleotide sequence of the sub-unit common to RNA polymerase I–II–III (substitution model: Kimura-2-parameters) (B) amino-acid sequence of the RNA diphosphate reductase large sub- 112

unit (substitution model: JTT+G, G = 3).

- FIGURE3** Negative staining electron microscopy imaging of viral particles from *Culicoides* sp. biting midges' samples. Scale bars are indicated under the images. 113
- FIGURE4** Western blot analysis. (A) Silver staining. (B) Staining with anti-Faustovirus polyclonal antibodies on arthropods sample. (C) Positive control of Faustovirus western blot with a loading of 5 µg of proteins. 114
- FIGURE5** Quantification of Faustovirus viral loads according to (A) tissue samples (B) animal species. Viral loads are expressed in log10 VLP/mL. 114

Liste des tableaux

Tableaux hors articles

Tableau 1 :	Pathogènes transmis ou associés avec les <i>Ceratopogonidae</i> .	p35
Tableau 3 :	Les différents couples d'amorces utilisés pour l'amplification spécifique des organismes ciblés.	p68
Tableau 4 :	Résultats des identifications morphologiques.	p78
Tableau 5 :	Tableau comparatif de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la Méthode d'identification par biologie Moléculaire.	p80

Tableau dans les articles

Article 1 Comparison of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and Molecular Biology Techniques for Identification of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Biting Midges in Senegal.

TABLE 1	Villages where <i>Culicoides</i> spp. were collected during this study.	p70
TABLE 2	<i>Culicoides</i> species COI sequences used for phylogenetic analyses ^a	
	^a Sequences from GenBank for 26 <i>Culicoides</i> spp. are shown.	p71
TABLE 3	Validation of Vitek MS results for 76 <i>Culicoides</i> spp.	
	^a One individual was morphologically identified as <i>C. enderleini</i> . The sequenced COI and MALDI-TOF spectra corresponded to <i>C. oxystoma</i> .	
	^b All 16 specimens that were morphologically identified as <i>C. oxystoma</i> were confirmed using sequencing, but the MALDI-TOF spectra of 3 individuals were closer to those of <i>C. enderleini</i> than to those of other <i>C. oxystoma</i> .	p75

Article 2: High Prevalence of *Mansonella perstans* Filariasis in Rural Senegal.

Table 1.	Biting midges diversity in the Kedougou region.	p94
Table 2.	<i>Mansonella perstans</i> prevalence rates for age groups	p95

Article 2: Faustovirus-Like Asfarvirus in Hematophagous Biting Midges and Their Vertebrate Hosts.

Table 1.	Sequencing data of the virome datasets.	110
-----------------	---	-----

Table 2.	Search for the presence of amoeba-infecting giant viral sequences in the metagenomes of other arthropods.	111
Table 3	Predicted ORFs for <i>Faustovirus</i> detected in the three metagenomes.	111

Liste des résumés publiés congrès, journées scientifiques.

1. 7^{ème} journée Dakaroise de l'Unité de Recherche sur les Maladies infectieuses et Tropicales Emergentes (UMR 198) : *Ceratopogonidae* du genre *Culicoides* au Sénégal : identification par MALDI-TOF, biologie moléculaire et recherche de pathogènes. Mardi 11 novembre 2014.
2. 5^{ème} édition de l'école Doctorale des Sciences de la vie, de la santé et de l'environnement : *Ceratopogonidae* du genre *Culicoides* au Sénégal : identification par MALDI-TOF, biologie moléculaire et recherche de bactéries pathogènes. UCAD, 16-17 juin 2014.
3. 6^{ème} journée Dakaroise de l'Unité de Recherche sur les Maladies infectieuses et Tropicales Emergentes (UMR 198) : *Ceratopogonidae* du genre *Culicoides* au Sénégal : identification par MALDI-TOF, biologie moléculaire et recherche de bactéries pathogènes. Lundi 11 novembre 2013, Dakar, Sénégal.
4. 9^{ème} Congrès International Francophone de la Société de Pathologie Exotique, en partenariat avec la Société Médicale d'Afrique Noire de Langue Française, Dakar, Sénégal, 12-14 novembre 2013.
5. 5^{ème} journée Dakaroise de l'Unité de Recherche sur les Maladies infectieuses et Tropicales Emergentes (UMR 198) : *Ceratopogonidae* du genre *Culicoides* au Sénégal : identification par MALDI-TOF, biologie moléculaire et recherche de bactéries pathogènes.
6. 6^{ème} Congrès de la Société Ouest Africaine de parasitologie, identification de rickettsies pathogènes chez des tiques ixodides de la zone de Keur Momar Sarr (Louga) Sénégal. UCAD, Dakar, Sénégal, 12-14 novembre 2012.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les *Ceratopogonidae* sont des insectes de l'ordre des *Diptera* (*Arthropoda*). La famille des *Ceratopogonidae* constitue une des familles de diptères les plus répandues sur terre. Borkent (2014), fait état de 6180 espèces existantes et 274 espèces fossiles de *Ceratopogonidae* dans le monde (Borkent, 2014). De nombreux insectes sont susceptibles de jouer un rôle dans la transmission de divers pathogènes responsables de maladies animales et humaines. Les diptères hématophages constituent une part importante de ces vecteurs. Parmi ceux-ci figurent les *Ceratopogonidae* des genres *Austroconops*, *Leptoconops*, *Forcipomyia* et *Culicoides*. Ces moucheron hématophages, en particulier les espèces du genre *Culicoides* Latreille, sont les plus connus dans la transmission de parasites et de virus chez les animaux et l'être humain (Mellor *et al.*, 2000). Ils sont ainsi responsables de la transmission de protozoaires et filaires, mais aussi de plus de cinquante virus appartenant aux familles des *Reoviridae*, *Bunyaviridae* et *Rhabdoviridae* (Mellor *et al.*, 2000). Certains de ces virus présentent un intérêt en santé animale et humaine, tels que les virus Oropouche (OROV), de la Peste équine (PE), de la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) (Du Toit, 1944; Mellor *et al.*, 1979) et plus récemment de la maladie de Schmollenberg (SB) (Hoffmann *et al.*, 2012). Au Sénégal, les travaux de Akakpo et collaborateurs, ont montré l'impact économique et sur la santé animale de la peste équine (Akakpo *et al.*, 2011).

Les récents travaux de Mediannikov *et al.* (2013) chez des patients fébriles ont montré une forte prévalence des maladies zoonotiques dans les zones rurales du Sénégal. Il est établi au Sénégal, que l'évaluation de la morbidité due au paludisme a permis de mesurer la part considérable des étiologies de fièvre non palustre dans les motifs de consultation en dispensaire. Pour cette raison, les autorités du Ministère de la Santé et de la Prévention, en accord avec l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ont adopté de nouvelles stratégies consistant à généraliser sur le plan national l'usage des tests de diagnostic rapide (TDR) pour le dépistage du paludisme dans les structures sanitaires. Cette utilisation des TDR pour le diagnostic présomptif du paludisme a permis de révéler aux personnels de santé que le paludisme représente aujourd'hui une part réduite des motifs de consultations dans les dispensaires. Devant une situation de TDR négatif pour le paludisme, une incertitude et un questionnement sans réponse se posent chez beaucoup d'infirmiers et médecins dans la prise en charge des fièvres non palustres devenues plus fréquentes.

Parmi les maladies fébriles d'origine non-palustre plus fréquentes au Sénégal on note la borreliose (Mediannikov *et al.*, 2014), l'infection à *Tropheryma whipplei* (Keita *et al.*, 2013),

l'infection à *Rickettsia felis* (Mediannikov O *et al.*, 2013), les fièvres boutonneuses (Mediannikov *et al.*, 2010a) et la fièvre Q (Mediannikov *et al.*, 2010b). Pour certaines de ces maladies (infection à *R. felis*, infections à *T. whipplei*) l'épidémiologie reste vague et méconnue. A ce jour, les modalités de transmission de *R. felis* à l'homme restent encore inconnues. Des analyses de biologie moléculaire ont montré que les puces, les tiques et les glossines ne jouent pas un rôle important dans la transmission de *R. felis* au Sénégal (Roucher *et al.*, 2012; Mediannikov *et al.*, 2013; Sambou *et al.*, 2014). L'hypothèse émise est que la transmission de cette bactérie s'effectuerait par les *Culicoides*.

Le genre *Culicoides* Latreille comprend près de 1400 espèces réparties dans le monde entier (Borkent, 2014). Cependant, certaines espèces du genre *Culicoides* ne sont pas hématophages et ne sont pas connues dans la transmission de pathogènes (Vigil *et al.*, 2014). Les *Culicoides* peuvent de plus, être responsables de piqûres provoquant des réactions d'hypersensibilité et d'allergies telles que la dermatite estivale du cheval (Riek, 1954; Nakamura *et al.*, 1956). L'abondance de ces moucheron peut finalement constituer une véritable nuisance, suite au désagrément causé par les piqûres des femelles. Leur présence peut donc gêner l'essor économique de certaines régions en entravant les activités agricoles et forestières, ainsi que le développement du tourisme (Hendry and Godwin, 1988).

En Afrique tropicale peu de chercheurs se sont intéressés aux maladies transmises par les *Culicoides* et bien moins encore à leur systématique, biologie, physiologie, etc. De nombreuses questions sur ces diptères persistent, en particulier celles concernant leur identification spécifique et les habitats favorables au développement de nombreuses espèces.

L'identification des vecteurs est une étape capitale dans l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle (Carpenter *et al.*, 2006; Pagès *et al.*, 2009). Cependant la détermination des espèces de *Culicoides* est un challenge en Afrique de l'ouest, car leur identification morphologique est fastidieuse (Goffredo and Meiswinkel, 2004; Meiswinkel *et al.*, 2008) et nécessite une certaine expertise (Delécolle, 1985; Kaufmann *et al.*, 2012b). Les approches moléculaires, basées sur la PCR et le séquençage, sont une alternative à l'identification morphologique des arthropodes, y compris ces moucheron. Plusieurs PCR conventionnelles et en temps réel ont été développées pour l'identification spécifique d'un certain nombre d'espèces (résumé dans (Wenk *et al.*, 2012)). Cependant, la méthode présente des inconvénients techniques et logistiques, elle est limitée par la disponibilité de séquences de gènes dans la base de données GenBank. Ainsi, l'entomologie s'est longtemps tourné vers la recherche de possibilités d'automatisation des diverses étapes analytiques. De nouvelles technologies appliquées à la problématique taxonomique, suggèrent désormais la possibilité

de réelles avancées en termes d'unicité des méthodes, de maîtrise des coûts et de rapidité du diagnostic. Parmi les applications récentes de technologies émergentes figure la spectrométrie de masse. Cette technique permet de définir des masses différentes avec une précision moléculaire de 0,2 Da. Sa sensibilité en termes de quantité de produits permet d'identifier rapidement les arthropodes difficiles à identifier morphologiquement (Kaufmann *et al.*, 2011; 2012a; 2012b; Steinmann *et al.*, 2013; Yssouf *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

Problématique

La détermination et la répartition des espèces vectrices de *Culicoides*, conditionnent en grande partie la distribution et la transmission des pathogènes. Nous nous sommes intéressés dans cette thèse à l'identification des espèces tropicales et à leurs rôles dans la transmission de pathogènes émergents.

Les implications de ce travail de thèse sont triples. Dans un premier temps, il répond à un problème scientifique, qui est l'identification des espèces de *Culicoides* par de nouveaux outils d'identifications, alternatifs à la morphologie. Ces nouvelles techniques permettront : de procéder à des identifications rapides, fiables, reproductibles et à moindre coût ; de mieux comprendre la répartition des espèces de *Culicoides* ; d'appréhender les maladies vectorielles et leurs agents pathogènes transmis par les *Culicoides*.

De plus, l'étude des *Culicoides*, et plus particulièrement leur détermination (paramètre rentrant dans la caractérisation de la transmission), a nécessité l'utilisation et le développement d'outils adaptés aux difficultés de la tâche, répondant ainsi à un important défi technologique.

En définitive, cette étude peut avoir des implications dans la transmission, le contrôle et la surveillance de maladies à transmission vectorielle. En effet, elle peut permettre, grâce à une meilleure connaissance de la répartition des vecteurs potentiels de pathogènes, de proposer des méthodes d'identification rapides et fiables, des stratégies de lutte anti-vectorielle et une optimisation de la surveillance de ces insectes.

Objectif principal

C'est dans un contexte de prospection de nouvelles méthodes d'identification de vecteurs que s'inscrit notre thèse de doctorat avec, comme objectif général, l'utilisation de technologies de biologie moléculaire et/ou de la Spectrométrie de Masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) dans la

détermination des *Cératopogonidés* et de leur implication dans la transmission d'agents pathogènes.

Objectifs spécifiques et Structure de la thèse

Le caractère récent de l'intérêt suscité par les *Culicoides* en région tropicale explique le faible nombre d'articles de synthèse et le manque de standardisation entre les différentes études sur la détermination des espèces d'intérêt dans cette région. C'est ce travail que nous proposons à travers une synthèse bibliographique axée sur les *Ceratopogonidae*, en particulier le genre *Culicoides* Latreille, en mettant l'accent sur leur biologie, l'état des lieux des outils d'identification, leur rôle vecteur, et en retraçant leur association avec les pathogènes et les relations hôtes/vecteurs (**Chapitres 1**). Comprendre l'épidémiologie des systèmes infectieux et la diffusion des maladies associées, puis développer des méthodes de lutte adaptées nécessite, notamment, l'identification correcte des différents acteurs du cycle de transmission. La détermination et la distribution des espèces de *Culicoides* nécessitent, quant à elles, leur collecte par l'intermédiaire de pièges OVI (Onderstepoort Veterinary Institute), technique de capture la moins couteuse pour étudier la diversité et mesurer l'abondance des insectes. Les collections de référence pour les arthropodes d'intérêt, pour la santé animale ou humaine, sont indispensables pour maintenir le niveau d'expertise taxonomique, pérenniser la formation des chercheurs, progresser dans la compréhension des mécanismes de spéciation et réviser l'état des connaissances taxonomiques et systématiques. Ces collectes permettent le développement d'outils d'aide à l'identification morphologique (clés d'identification interactive informatisée ou sur Internet) ou d'outils d'aide à l'identification moléculaire (tests d'identification par réactions en chaîne par polymérase [PCR]) et à la spectrométrie de masse. La compréhension des cycles de transmission, le développement de modèles permettant la prévision des zones et périodes à risque (et donc prévenir les crises sanitaires), ne sont possibles que si l'identification des espèces vectrices impliquées dans la transmission des pathogènes est correctement établie (**Chapitre 2**). Ainsi, pour mieux comprendre la diversité et l'abondance des *Culicoides* présents au Sénégal, nous avons d'abord comparé les techniques utilisées pour la détermination de ces moucheron. Puis, avec l'aide de la méthode morphologique standardisée, deux techniques alternatives nouvelles ont été comparativement utilisées dans toutes les captures, ce qui a permis d'appréhender les biais liés à chaque méthode (**Etude 1**). Une telle stratégie doit contribuer à une meilleure compréhension de l'épidémiologie des pathogènes qu'ils transmettent. Or l'identification précise des acteurs d'un cycle (pathogènes, vecteurs, réservoirs) est indispensable dans toute étude épidémiologique de santé publique. En

effet, une mauvaise identification des espèces vectrices d'intérêt et du pathogène peut avoir des conséquences désastreuses lors de la mise en place de stratégies de lutte anti-vectorielle ou lors de la surveillance d'espèces exotiques invasives. C'est dans ce contexte d'évaluation de son implication dans la transmission de pathogènes émergents que nous avons recherché la présence de filaires, de bactéries et de virus chez les moucheron du genre *Culicoides* collectés dans les 3 régions prospectées (**Etude 2**). En effet, prévenir l'introduction de maladies vectorielles exotiques exige de connaître l'ennemi et de disposer de moyens rapides et fiables de détection. Cette étude s'articule autour de trois axes incluant le développement d'outils microscopique permettant d'identifier les filaires sur frottis sanguin, la spectrométrie de masse MALDI-TOF permettant d'identifier les bactéries isolées en culture bactérienne, la biologie moléculaire (PCR en temps réel, PCR standard, le séquençage et la métagénomique virale) permettant de quantifier les pathogènes.

L'ensemble des résultats enregistrés au cours de ces investigations ont fait l'objet d'une discussion générale (**chapitre 3**) qui nous a également permis de les mettre en perspective.

**PREMIER CHAPITRE : TRAVAUX DE
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES
CERATOPOGONIDAE DU GENRE *CULICOIDES***

Introduction

Les *Culicoides* sont décrits pour la première fois par le révérend William Derham en 1713 (Mellor *et al.*, 2000). Ces insectes, appelés « mout-mout » au Sénégal, sont fréquemment présents sur les plages et ou pendant les parties de pêche ainsi que dans les zones en bordure de fleuve. Les *Culicoides* ont une mauvaise réputation et vont être reconnus d'abord comme des insectes nuisibles, puis comme des vecteurs de virus et filaires. Depuis le 20^e siècle, les *Culicoides* sont étudiés en Afrique du sud pour leur rôle dans la transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine (Balenghien and Delécolle, 2009). La biologie et la détermination des espèces afro-tropicales ont cependant suscité l'intérêt de peu d'équipes. Au Sénégal, une quarantaine d'espèces ont été répertoriées et décrites morphologiquement (Bakhoun *et al.*, 2013; Diarra *et al.*, 2014).

Les *Culicoides* sont impliqués dans la transmission de divers pathogènes d'importance vétérinaire (virus et filaires) entraînant des pertes économiques considérables. C'est le cas des infections virales dues aux virus Schmallenberg, pestes équine et fièvre catarrhale qui affectent les ruminants domestiques et sauvages (Velthuis *et al.*, 2010; Akakpo *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2012). Les piqûres de *Culicoides* peuvent de plus être responsables de réactions d'hypersensibilité générant des allergies. Leur abondance peut entraver les activités agricoles et forestières, ainsi que le développement du tourisme dans certaines régions et gêner leur essor économique. Les études sur l'aspect vectoriel des *Culicoides* sont rares au Sénégal. Très récemment, le Laboratoire National de L'Elevage et de Recherches Vétérinaires (LNERV) de l'institut Sénégalaise de Recherche Agricole (ISRA) s'est intéressé au rôle vectoriel des *Culicoides* en santé animale. Les vecteurs des virus de la peste équine et la maladie de la langue bleue en sont les principales préoccupations et ont fait l'objet des premières études publiées (Diarra *et al.*, 2014; Fall *et al.*, 2015).

Cependant, peu de travaux synthétiques ont été publiés sur la biologie et les outils de détermination des espèces de *Culicoides*, qu'ils soient seulement nuisibles ou vecteurs avérés en Afrique de l'Ouest à l'exception de la revue de Cornet (1974), portant sur les différents caractères morphologiques pour l'identification des espèces du genre *Culicoides*. Dans ce premier chapitre de notre thèse de doctorat, nous proposons nos travaux de synthèse d'une large revue de la littérature, pour mettre en exergue les parties de la biologie et les outils de détermination des *Culicoides* au stade adulte qui restent peu ou mal décrits, de manière à dégager des axes de recherche.

Notons que cette synthèse bibliographique est déjà rédigée pour publication.

I.1. Taxonomie

Comme pour la plupart des genres d'insectes, l'histoire de la description des *Culicoides* est aussi riche et modifiée par le développement des techniques nouvelles. La première description des *Culicoides* est réalisée par le révérent William Derham en 1713 (Mellor *et al.*, 2000). La première espèce décrite est *Culex pulicaris* actuellement appelée *Culicoides pulicaris* déterminé par Linné en 1758. Latreille est le premier auteur qui a décrit le genre *Culicoides* en 1809 avec comme type d'espèce *Culicoides punctatus* (*Ceratopogon punctatus*). Après la description de Linné, plusieurs espèces sont décrites par des entomologistes. De nombreuses descriptions ont été réalisées, en région Paléarctique, par les entomologistes danois Rasmus Carl Staeger (1800-1875) et allemand Johann Winnertz (1800-1896). Dans la région Néarctique, la première espèce décrite est *Culicoides nocivum* réalisée par l'entomologiste et botaniste américain Thaddeus William Harris (1795-1856). Dans cette même région, le diptériste Daniel William Coquillett (1856-1911) a largement contribué à la description de la faune culicoidienne. Au sud de la région Néotropicale, l'espèce *Culicoides furens* (*Oecacta furens*), est décrite par le zoologiste cubain Felipe Poey (1799-1891). Le *C. furens* est une espèce connue agressive et nuisante pour l'homme dans la région. La faune culicoidienne de la région a été inventoriée 43 ans plus tard par le paléontologue et diptériste Samuel Wendell Williston (1852-1918).

La première description d'espèces de *Culicoides*, dans la région afrotropicale, est celle des *Culicoides schultzei* et *C. herero*, réalisée par l'entomologiste allemand Günther Enderlein (1872-1968), en 1908. L'entomologiste britannique Ernest Edouard Austen (1867-1938) découvre dans la même région la faune du Ghana, du Kenya et de l'Ouganda en 1909. L'entomologiste allemand Johannes Cornelis Hendrik de Meijere (1866-1947), découvre la faune de la région de l'Afrique orientale et décrit la première espèce, *Culicoides guttifer* en 1907.

La description de la diversité de la faune culicoidienne en Inde a débuté, en 1910, par les travaux du naturaliste français, l'abbé Jean-Jacques Kieffer (1855-1925).

En 1977, Glokhova a redéfini les espèces du groupe *C. schultzei* et a créé le sous-genre *Remmia* (Glokhova, 1977). La description de ce sous-genre a été remise en cause par de nombreuses études (Cornet and Brunhes, 1994; Wirth and Dye, 1985; Boorman, 1989). Ces dernières ont réhabilité le sous-genre *Remmia* pour certaines espèces du groupe *C. furens* ou du groupe *C. schultzei*.

Les caractéristiques des espèces de *Culicoides* ont permis aux entomologistes de les classer comme suit :

Embranchement :	<i>Arthropoda</i>
Classe :	<i>Insecta</i>
Ordre :	<i>Diptera</i>
Famille :	<i>Ceratopogonidae</i>

Les insectes de l'Ordre des Diptères sont communément classifiés selon certains critères en deux Sous-ordres :

- Les Nématocères dont font partie les *Cératopogonidae*, possèdent des antennes fines, longues et constituées de nombreux segments. Les adultes ont des palpes maxillaires constitués de 3 à 5 articles. Les stades larvaires sont caractérisés par une tête large avec des mandibules pouvant être mobilisées latéralement (Capinera, 2004).
- Les Brachycères sont caractérisés par des antennes courtes, trapues et constituées de peu d'articles, trois en général. Les palpes maxillaires sont constitués de un ou deux articles.

Les *Ceratopogonidae* sont une grande famille qui contient près de 60 genres et environ 4000 espèces. Les insectes de la famille des *Ceratopogonidae* ont un corps élancé de 1 à 3mm, avec des ailes velues et des antennes longues et filiformes, globuleuses vers la base et de 14 à 16 articles. La famille comprend 4 sous-familles : *Leptoconopinae*, *Forcipomyiinae*, *Dasyheleinae* et les *Ceratopogoninae* (Kettle, 1984). Cette dernière sous famille contient le genre *Leptoconops* et bien entendu le genre *Culicoides* à qui nous accordons une importance particulière.

I.2. Biologie des *Culicoides*.

I.2.1. Morphologie des *Culicoides*

Les adultes ont une taille variant de 1 à 3 millimètres (mm) de long (Vigil *et al.*, 2014), ce qui fait d'eux les plus petits diptères hématophages et sont qualifiés de “mouchérons” piqueurs alors qu'ils ont davantage des caractéristiques de moustiques avec un corps fin et une silhouette élancée (**figure 1**).



Figure 1 : Photo de *Culicoides kingi* (Sénégal)

La tête est arrondie avec un aplatissement léger dans le sens antéropostérieur. Elle porte de volumineux yeux composés. Les pièces buccales sont de type piqueur, formant une trompe courte vulnérante. Les mandibules et les maxilles sont munies de petites dents. Les palpes maxillaires sont formés de 5 articles, dont le troisième, souvent renflé, porte une ou plusieurs fossettes sensorielles (**figure 2**).

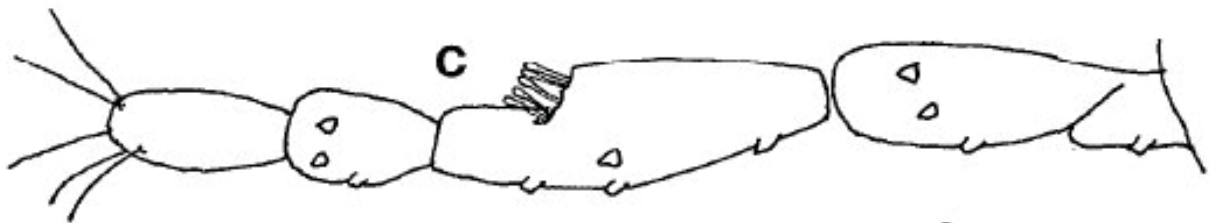


Figure 2 : Palpe de *C. milnei* (Cornet *et al.*, 1974)

La coloration du thorax est un caractère très peu considéré mais qu'il faut noter chaque fois que ceci est possible avant l'immersion dans le liquide de conservation (Cornet *et al.*, 1974). Les ailes portées par le thorax sont ornées de zones claires et de zones sombres dues soit à la teinte de fond de la membrane alaire, soit à celle des microtriches (**figure 3**). Ce sont les nervures ainsi que les cellules alaires qui participeront essentiellement à la classification des différentes espèces. Les pattes sont courtes et constituées de cinq segments qui sont la coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse. Elles constituent un critère important pour la mensuration.

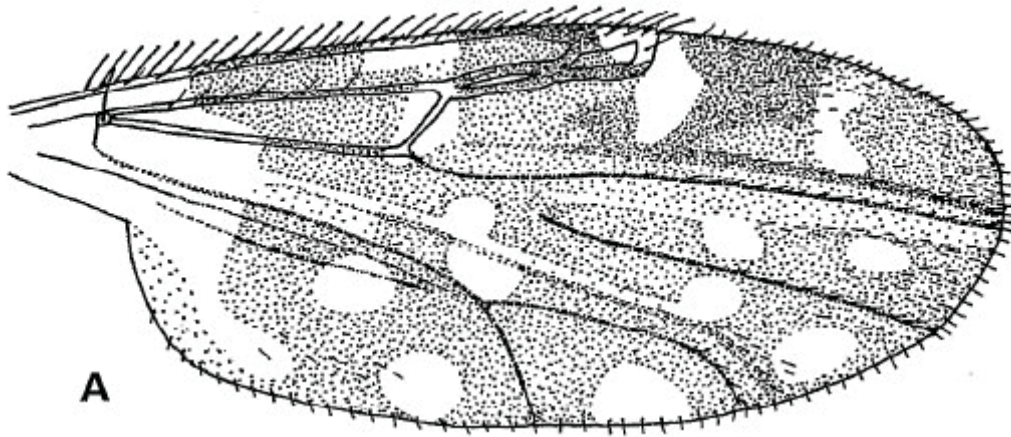


Figure 3. : Aile de *C. milnei* femelle du Kenya (Cornet *et al.*, 1974).

L'abdomen est constitué de 10 segments dont les derniers portent les structures dédiées à la reproduction. Son principal intérêt est la présence des armatures génitales femelles et mâles (**Figure 4**).

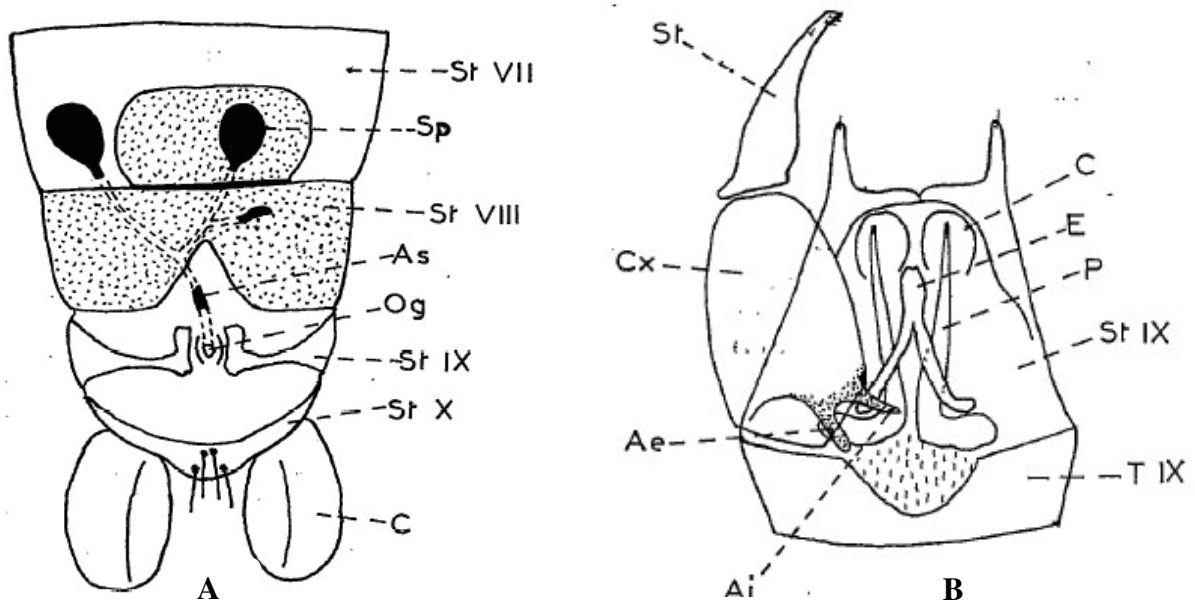


Figure 4 : Armature génitale d'une femelle (A) et mâle (B) de *Culicoides* (Cornet *et al.*, 1974).

Ae et Ai : apodème externe et interne du coxite ; As : anneau sclérifié du conduit des spermathèques ; C : cerque; Cx : coxite ; E : édéage ; Og : orifice génital; P : paramère; Sp : spermathèque ; St VII, St VIII, St IX, St X : septième, huitième, neuvième et dixième sternites; T IX : neuvième tergite ; St : style.

Les œufs sont très allongés et plus ou moins effilés aux extrémités. Ils ont une forme de banane ou de cigare avec une taille comprise entre 200 à 500 micromètres de long (Delecolle and Schaffner , 2003). La longueur est d'environ 6 fois la largeur qui est estimée à une taille moyenne de 50 micromètres de large (Walzer, 2009). Les œufs sont clairs au départ puis brunissent très rapidement au contact de l'air (Walzer, 2009).

Les larves de *Culicoides* sont vermiformes, de couleur claire et dépourvues de pseudopodes (**figure 5**). Elles présentent :

- une tête dominée par une capsule céphalique sclérifiée de couleur brun clair,
- un thorax constitué de trois segments avec une pigmentation variable et,
- un abdomen formé de neuf segments (Zimmer *et al.*, 2014).

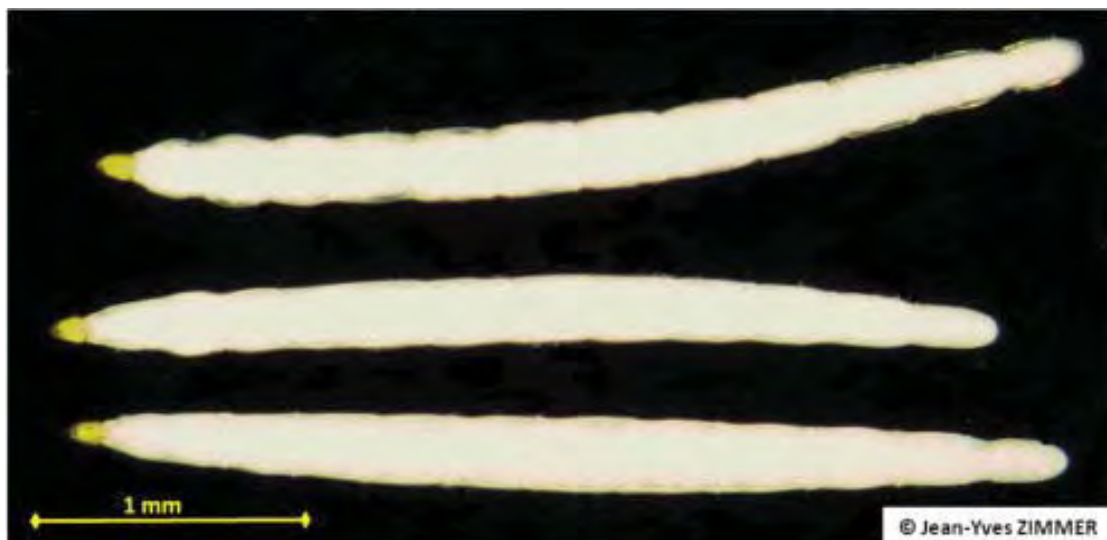


Figure 5 : Larves de *Culicoides* (Zimmer *et al.*, 2014)

La nymphe est du type habituel chez les nématocères. Sa taille est généralement inférieure à 3 mm. Le corps d'une nymphe est caractérisé morphologiquement par deux parties essentielles : le céphalothorax et l'abdomen (**Figure 6**).

- Le céphalothorax porte deux trompettes respiratoires qui assurent leur respiration aérienne. Chaque trompette est munie à son apex de plusieurs stigmates respiratoires (Walzer, 2009).
- L'abdomen est constitué de 9 segments. chaque segment présente des tubercules sur les bords latéraux avec une taille et un nombre plus important au niveau des 5 premiers segments. Le dernier segment se prolonge par des cornes divergentes. Un

renflement triangulaire sur la face ventrale du dernier segment abdominal permet de différencier les futurs mâles et femelles (Walzer, 2009).



Figure 6 : Nymphes de *Culicoides* (Zimmer *et al.*, 2014)

I.2.2. Cycle biologique et écologie des *Culicoides*

I.2.2.1. Cycle biologique des *Culicoides*

Les *Culicoides* adultes se nourrissent en majorité de nectar et seules les femelles (dans un grand nombre d'espèces) sont hématophages. Chez 90% des espèces, le repas sanguin précédant la ponte est obligatoire (Wittmann and Baylis, 2000). Il est réalisé environ deux jours avant la ponte. La majorité des espèces de *Culicoides* sont de nature crépusculaire ou nocturne (Zimmer *et al.*, 2008). Ils piquent rarement en plein jour et en plein soleil, mais plutôt, à l'ombre, à l'aube, ou le soir au coucher du soleil. Durant la journée, ils sont au repos et fréquentent alors la face inférieure des feuilles ou des herbes situées en zone ombragée. Les espèces du genre *Culicoides* exposent un cycle biologique commun à toutes les espèces des *Ceratopogonidae*. Le cycle de vie des *Culicoides* comprend quatre étapes : l'œuf, quatre stades larvaires, un stade nymphal et un stade imaginal (adulte) (**figure 7**). Il s'agit d'un développement holométabole, c'est-à-dire que les larves et nymphes ne ressemblent pas à

l'adulte. La majorité des espèces de *Culicoides* présente en moyenne deux générations par an. L'accouplement a lieu le plus souvent dans de grands espaces et est précédé d'un vol nuptial composé de nombreux mâles et femelles. La parthénogenèse n'est pas présente chez les *Culicoides* (Delecolle and Schaffner, 2003). Chaque ponte survient 2 à 4 jours après le repas sanguin (Wittmann and Baylis, 2000; Zimmer *et al.*, 2014). Les œufs, pondus au sol en milieu généralement humide et riche en substances organiques, éclosent en quelques jours s'ils se trouvent à des températures favorables.

L'éclosion des œufs a lieu en moyenne entre 2 à 8 jours après la ponte selon les conditions plus ou moins favorables du milieu, elle se réalise par une déchirure longitudinale ; les œufs ne sont pas résistants à la dessiccation (Mellor *et al.*, 2000; Delecolle and Schaffner, 2003).

Les larves issus de l'éclosion des œufs, se nourrissent de débris organiques divers ou sont prédatrices de nématodes, protozoaires, bactéries, champignons, algues, etc. voire même de leurs propres congénères (Kettle, 1962). Chez les *Culicoides* on dénombre 4 stades larvaires (stI, stII, stIII, stIV). La durée de développement larvaire dépend des conditions climatiques et des espèces (Chaker, 1983). La durée moyenne entre le développement de la larve à la nymphe est de 5 jours à quelques semaines.

Les nymphes ne se nourrissent pas. Elles sont très peu actives. On les trouve en général à la surface du milieu dans lequel elles se sont développées ou sur un support solide. La durée de ce stade est fonction de la température et de l'espèce de *Culicoides* mais elle est en général courte, en moyenne de 2 à 10 jours (Delecolle and Schaffner, 2003).

À l'émergence, les imagos sont d'abord clairs puis se colorent rapidement. Ces adultes s'accouplent peu après l'éclosion, lors de vols nuptiaux ou au niveau du sol (Chaker, 1983). Les *Culicoides* adultes s'éloignent tout au plus de quelques centaines de mètres de l'endroit où les imagos ont vu le jour.

La durée moyenne entre le développement de l'œuf et l'émergence de l'adulte est variable selon les localisations géographiques et les conditions climatiques.

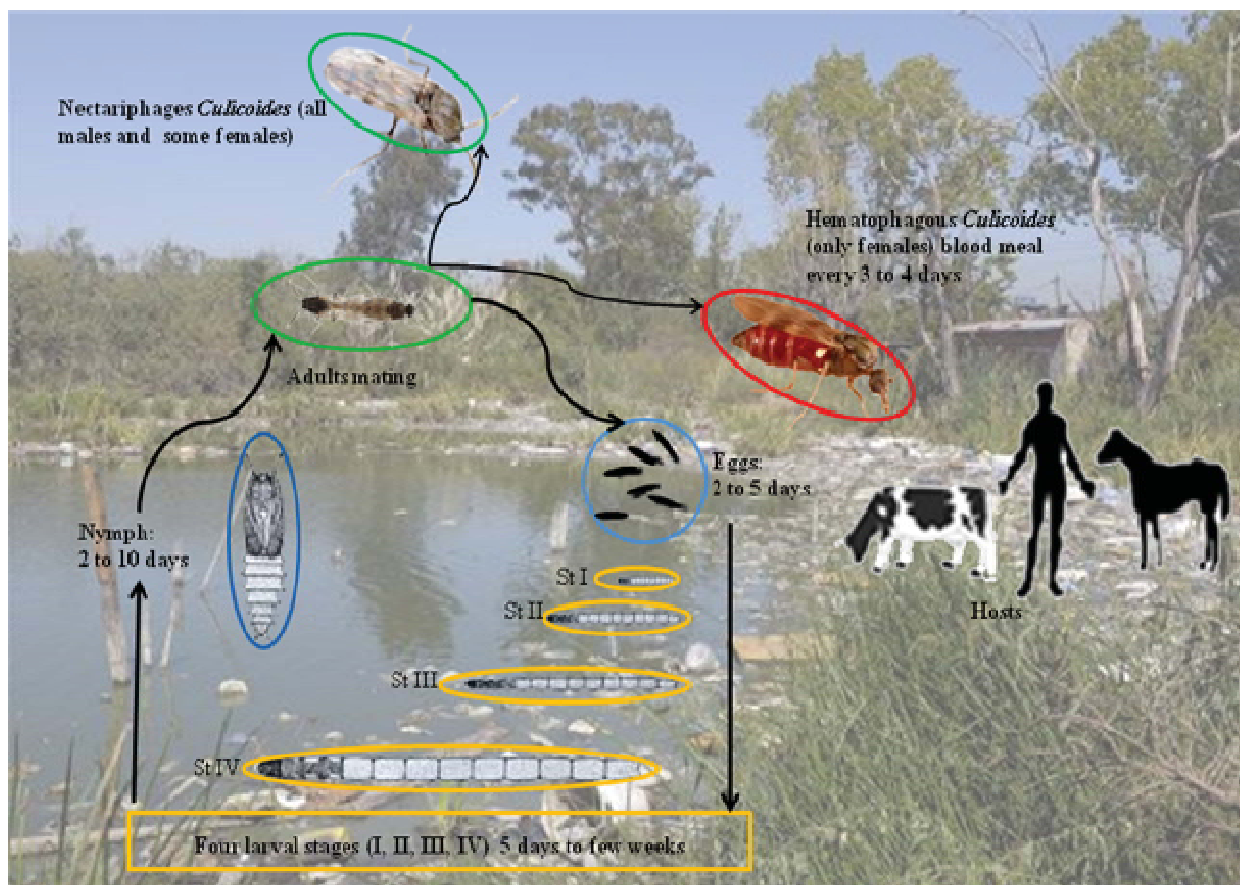


Figure 7. : Cycle de vie des espèces de *Culicoides*

I.2.2.2. Ecologie des *Culicoides*

De nature crépusculaire à nocturne, la plupart des espèces sont inactives durant la journée et fréquentent alors les zones ombragées. Les sites de reproduction sont différents et spécifiques des espèces. Les stades immatures exigent une certaine quantité d'eau libre et/ou d'humidité. Ces critères sont rencontrés dans une large gamme d'habitats : les bords de mares, d'étangs, de lacs voire de mer, les berges de ruisseaux et de sources, les sols marécageux, les tourbières, les trous d'arbres, les excréments d'animaux, des fuites au niveau des systèmes d'irrigation, des fruits en décomposition et des supports végétaux (Zimmer *et al.*, 2008, Chaker, 1983).

I.2.2.3. Facteurs influençant la biologie des *Culicoides*

La survie, l'activité et la dispersion de ces moucheron piqueurs sont fortement influencées par les variables météorologiques telles que la température, l'humidité, l'agitation de l'air etc.

La température est sans doute l'élément jouant le rôle le plus important sur le comportement et la survie de ces insectes. Leur activité est significative entre 13°C et 35°C (Braverman, 1996), même si ces limites varient en fonction des espèces. Les températures trop élevées jouent un rôle néfaste en diminuant la durée de vie des adultes. Elles entraînent une diminution de la fécondité des futures femelles adultes (les œufs sont moins nombreux, leur taille est plus petite), quand elles surviennent pendant le développement larvaire (Wittmann and Baylis, 2000; Périé *et al.*, 2005).

L'humidité et la nutrition sont en effet primordiales à la croissance et au développement des larves. En effet, une humidité élevée joue un rôle important pour la survie des *Culicoides*, principalement les stades larvaires qui sont très sensibles à la dessiccation (Murray, 1991).

La dispersion active des *Culicoides* étant très limitée (Mellor *et al.*, 2000), la direction et la force du vent assurent leur propagation par dispersion passive (Mellor *et al.*, 1983, Braverman and Chechik, 1996).

I.3. Méthodes d'identification

I.3.1. Identification morphologique

L'expertise taxonomique de l'entomologie fondamentale est une préoccupation croissante dans le monde entier et intéressé directement à des disciplines aussi diverses que la conservation de la biodiversité, entomologie médicale et vétérinaire et la lutte antiparasitaire. La taxonomie morphologique est la méthode d'identification la plus couramment utilisée par les biologistes du monde entier (Mathieu *et al.*, 2012).

La taxonomie du genre *Culicoides* est principalement réalisée sur la base des critères morphologique : motifs alaires, longueur et forme des segments des antennes, caractéristiques de l'appareil génital chez les mâles, distribution des sensilles sur les antennes, nombre et taille des spermathèques chez les femelles (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Delécolle, 1985; Wirth and Hubert, 1989; Boorman, 1993; Rawlings, 1996; Boorman and Hagan, 2007) (**figure 8**). L'identification morphologique des *Culicoides* jusqu'au niveau espèces est très difficile même pour les experts entomologistes surtout quand il s'agit des complexes d'espèces difficilement séparables par la morphologie (Meiswinkel *et al.*, 2004; Pagès and Monteys, 2005). Les motifs alaire sont de première importance pour la systématique des insectes et sont utilisés dans l'identification morphologique des espèces de *Culicoides* avec un niveau de discrimination important (Wirth *et al.*, 1985; Wirth *et al.*, 1988). Dans la péninsule ibérique, Rawling a développé une clé d'identification de *Culicoides* en utilisant uniquement les motifs caractéristiques de l'aile (Rawlings, 1996). Plus tard, de nombreux travaux entomologiques rapportaient que la morphométrie est un outil de caractérisation fiable et pas cher pour de nombreux organismes y compris les phlébotomes (Dujardin *et al.*, 2002) ; triatomes (Dujardin *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Dujardin *et al.*, 2007; Feliciangeli *et al.*, 2007) ; mouches tsé-tsé (Camara *et al.*, 2006) et récemment les moucheron (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2011; Henni *et al.*, 2014). Dans la région Paléarctique occidentale, une clé d'identification morphologique multi-entrées regroupant toutes les espèces recensées en France a été développée et est maintenant disponible sur le site IIKC (<http://www.iikculicoides.net/>) (Mathieu *et al.*, 2012).

En Afrique, quelques études ont été réalisées pour l'identification morphologique des *Ceratopogonidae*. De façon générale, les études effectuées concernent seulement le genre *Culicoides* (Cornet, 1974; Cornet *et al.*, 1974; Boorman, 1979; Boorman and Dipeolu, 1979; Glick, 1990). En Afrique de l'Ouest quelques études morphologiques ont été effectuées,

principalement au Sénégal et seulement 30 espèces de *Culicoides* ont été enregistrées (Cornet, 1969; Cornet and Brunhes, 1994). Actuellement, aucune clé de détermination de la faune culicoidienne de l'Afrique de l'Ouest n'existe hormis les rares travaux limités de Cornet et collègues (1994). Par conséquent, l'identification morphologique des espèces de *Culicoides* d'Afrique de l'Ouest nécessite l'utilisation de plusieurs clés dichotomiques.

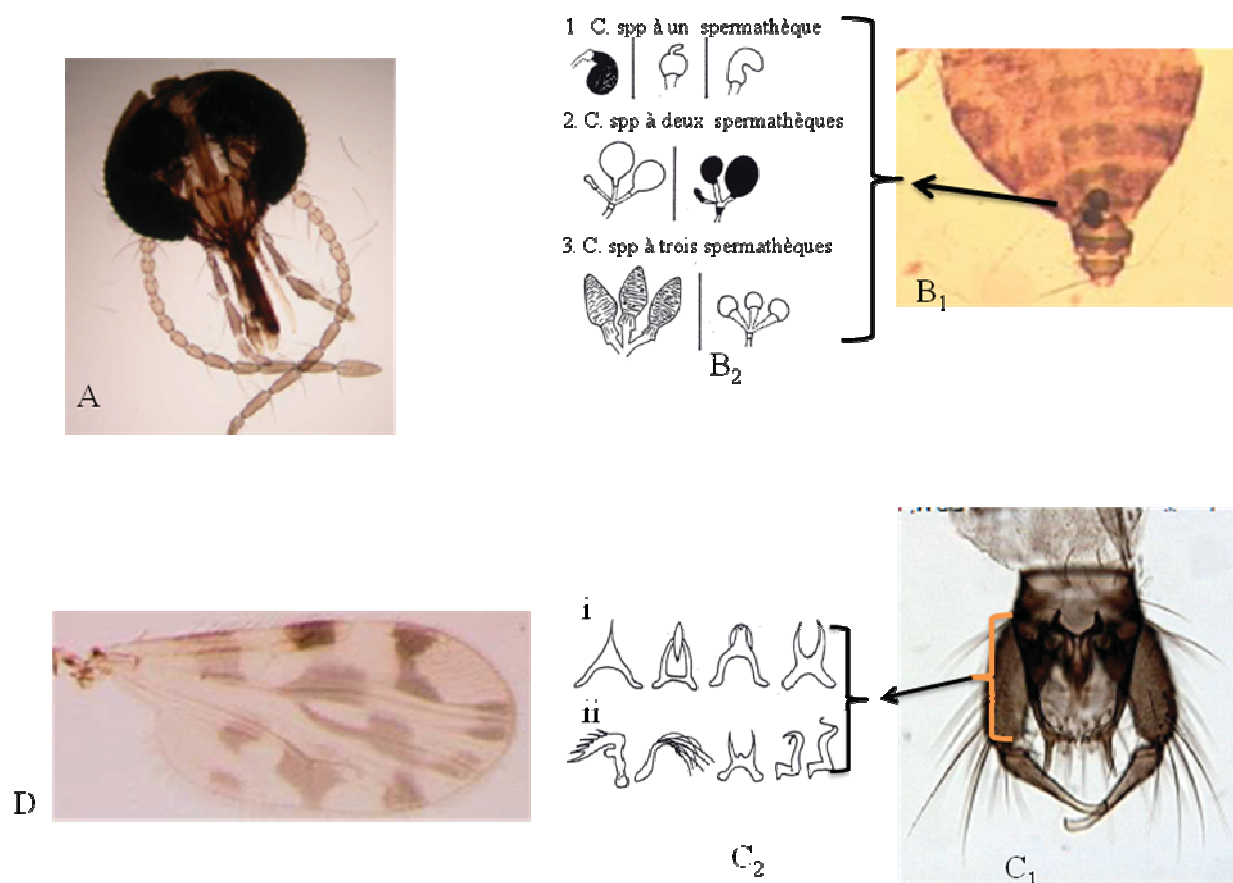


Figure 8: Critères utilisés pour l'identification morphologique des *Culicoides*.

A, tête ; B1, appareil reproducteur femelle ; B2, spermateque ; C1, appareil reproducteur male ; C2 édeages (i) et parameres (ii); D, aile de *C. imicola*.

I.3.2. Identification par biologie moléculaire

Jusqu'à récemment, les échantillons biologiques ont été identifiés à l'aide des caractéristiques morphologiques basant sur la forme, la taille et la couleur des parties du corps. L'outil moléculaire est une approche alternative pour l'identification des espèces de *Culicoides*. Cette approche est plus fiable que l'identification morphologique. Depuis 2013, neuf marqueurs moléculaires des régions génomiques mitochondriale (COI, COII, 28S, 18S

rRNA, 16s rRNA, Cytb), ribosomale (ITS1, ITS2) et nucléaire (CAD) sont disponibles pour l'identification moléculaire des espèces de *Culicoides* (Harrup *et al.*, 2015). Le gène du cytochrome oxydase I (Dallas *et al.*, 2003) de l'ADN mitochondrial (mtDNA) et les "nuclear internal transcribed spacers" I (ITS1) (Perrin *et al.*, 2006) et II (ITS2) (Gomulski *et al.*, 2006) sont les plus couramment utilisés pour l'identification de ces moucheron. L'analyse phyllogénétique des résultats obtenus à partir du gène cible est réalisée par lecture de l'arbre phyllogénétique résultant. Cet arbre permet de représenter la position taxonomique de chaque espèce et de les regrouper sur la base de leur proximité génétique (**figure 9**).

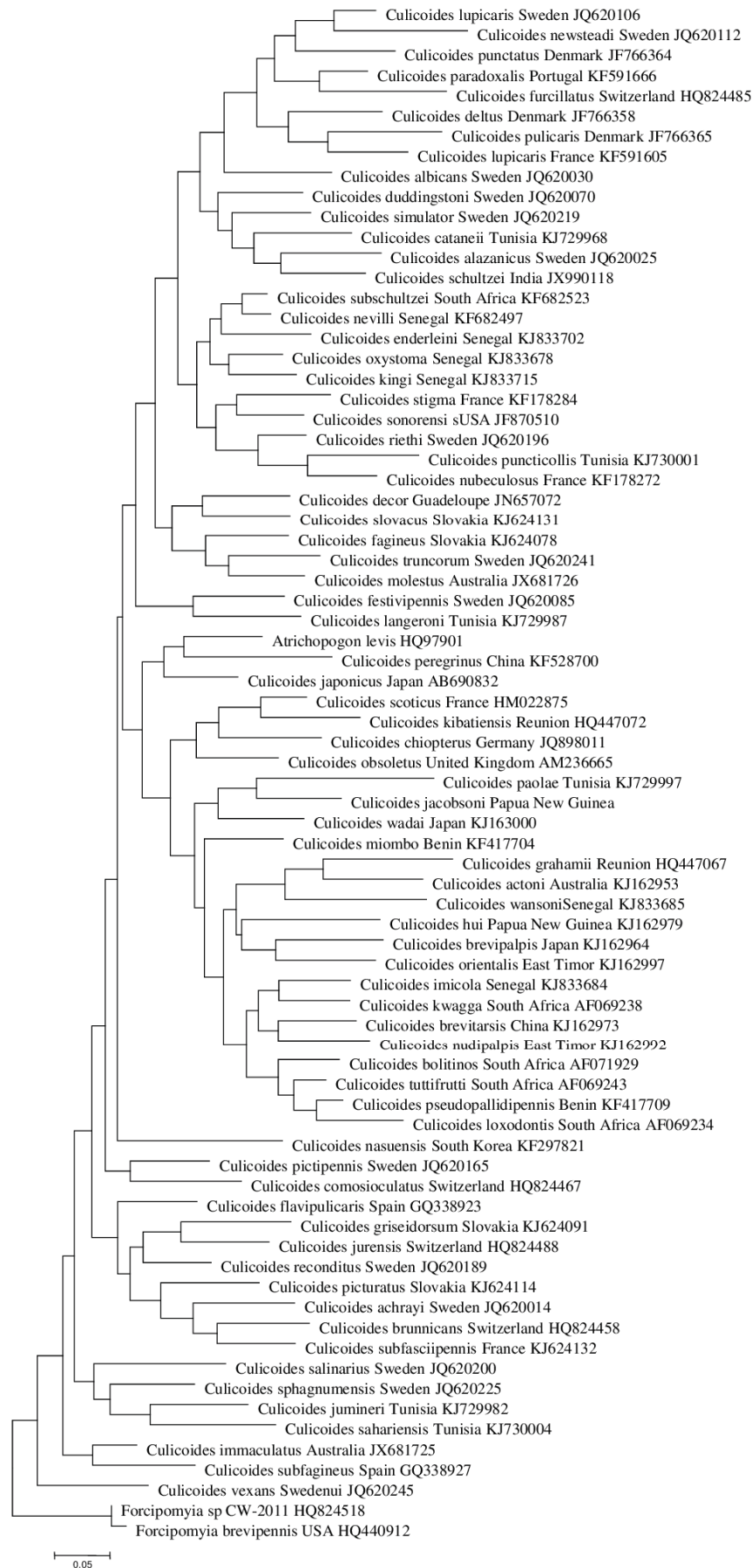


Figure 9 : Relations phylogénétiques des espèces du genre *Culicoides*, basées sur les séquences COI.

En 2008, Baldet *et al.* (2008) ont postulé qu'il est impossible de séparer les femelles de *C. obsoletus* et *C. scoticus* par critères morphologiques. Dans certains rapports, les quatre espèces ou au moins les femelles de *C. obsoletus* et *C. scoticus*, ont été décrites ou groupées comme une seule entité (Meiswinkel *et al.*, 2007; Mehlhorn *et al.*, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008). Par contre, Kiehl *et al.* (2009) considèrent *C. scoticus* comme étant une espèce morphologiquement proche de *C. obsoletus* (Kiehl *et al.*, 2009). D'autres études ont confirmé que, la méthode moléculaire ciblant le gène COI de l'ADN mitochondrial était plus fiable pour la différenciation des espèces de *Culicoides* inter-intrasécifiques (Linto *et al.*, 2002; Pagès and Monteys, 2005; Nolan *et al.*, 2008; Dallas *et al.*, 2003; Nolan *et al.*, 2007). Le développement et la mise en place de la technique moléculaire utilisant les gènes ITS1 et ITS2 de l'ARN ribosomal ont été réalisés pour clarifier la relation phylogénétique dans le genre *Culicoides* (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2007).

Mais en 2011, Nielsen et Kristensen ont montré que les séquences de ITS1 sont généralement de faible qualité. De plus, Matsumoto et ses collègues ont rapporté que les séquences de ITS2 ne sont pas reproductibles (Matsumoto *et al.*, 2009). Par conséquent, ITS1 et ITS2 sont peu utilisées pour l'identification des *Culicoides*. COI a émergé et s'avère très efficace pour identifier les métazoaires (<http://www.barcodeoflife.org>) incluant les *Culicoides*. Plusieurs études d'identification moléculaires utilisant le COI ont été réalisées chez les populations de *Culicoides* européennes et ont montré une haute divergence intra ou intersécifique (Pagès *et al.*, 2009; Muñoz-Muñoz *et al.*, 2011; Lassen *et al.*, 2012; Ander *et al.*, 2013). Garos et ses collaborateurs, se basant à la fois sur les caractères morphologiques et moléculaires ont confirmé l'existence de *C. obsoletus* et *C. scoticus* comme étant deux espèces (Garros *et al.*, 2010). Au Sénégal, Bakhoun *et al.*, (2013) ont utilisé cette approche pour réévaluer le statut des espèces du groupe *C. schultzei*. Cette technique leur a permis de différencier 4 espèces du groupe : *Culicoides kingi*, *C. nevillei*, *C. enderleini* et *C. oxystoma*. Cette dernière (*C. oxystoma*) étant décrite pour la première fois au Sénégal (Bakhoun *et al.*, 2013).

I.3.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'identification morphologique de ces minuscules insectes jusqu'au niveau espèce est très difficile dans certains cas (Goffredo and Meiswinkel, 2004; Meiswinkel *et al.*, 2008) et requiert une préparation microscopique fastidieuse des insectes et une certaine expertise

(Delécolle, 1985). Plusieurs tests basés sur la PCR ont été développés pour l'identification spécifique d'un certain nombre d'espèces, dans des dosages simples ou multiplexes à la fois conventionnel et dans des formats de PCR en temps réel (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Pagès and Monteys, 2005; Mathieu *et al.*, 2007; Cêtre-Sossah *et al.*, 2008; Wenk *et al.*, 2012; Nolan *et al.*, 2007). Ces PCR sont spécifiques pour quelques espèces, coûteuses et réalisables pour un faible échantillon. Une technique innovante : la spectrométrie de masse MALDI-TOF est récemment apparue sur le marché de l'entomologie. Elle permet à un laboratoire de routine d'identifier un grand nombre d'arthropodes de manière rapide, fiable et peu coûteuse. Cette technique a été décrite pour l'identification des métazoaires, principalement chez les espèces de poissons (Mazzeo *et al.*, 2008), les plantes (Caprioli *et al.*, 2010), les acariens (Yssouf *et al.*, 2013a) et les insectes (Campbell, 2005; Perera *et al.*, 2005; Feltens *et al.*, 2010; Yssouf *et al.*, 2013b; 2014a; 2014b). Cependant, Kaufmann *et al.* (2011) ont démontré pour la première fois les opportunités des analyses au MALDI-TOF MS, pour l'identification rapide et fiable de *Culicoides nubeculosus* élevés en laboratoire (**figure 10**). Une seule condition était de retirer l'abdomen du reste du corps parce que le sang de l'hôte chez les moucheron femelles gorgées entraînait une mauvaise lecture des spectres dans les premiers jours après un repas de sang. Dans la même étude, les auteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence entre les analyses du thorax seul, thorax avec les ailes, les pattes et les ailes; laissant ces pièces à d'autres fins, par exemple, identification morphologique et génétique (Kaufmann *et al.*, 2011). Un an plus tard, deux études ont rapporté : i) une référence de base de données des masses de biomarqueurs de moucheron capturés sur le terrain et évalué ce système d'identification à base de MALDI-TOF par un test aveugle (Kaufmann *et al.*, 2012a) et ii) une application de MALDI-TOF MS pour l'identification des espèces d'un grand nombre d'échantillons recueillis sur le terrain (Kaufmann *et al.*, 2012b). En Royaume Uni, Uhlmann et collaborateurs (2014) ont utilisé l'outil MALDI-TOF pour caractériser 6 espèces femelles différentes collectées sur terrain (*C. dewulfi*, *C. pulicaris*, *C. newsteadi*, *C. punctatus*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*) et une espèce de laboratoire (*C. nubeculosus*). En plus de la caractérisation des espèces de *Culicoides* adultes, Steinmann *et al.* (2013), ont établi la première base de référence MALDI-TOF des stades larvaires chez les *Ceratopogonidae* (Steinmann *et al.*, 2013). La détermination des espèces par le MALDI-TOF est une technique alternative rapide, peu coûteuse, fiable pour identifier des stades immatures et adultes des insectes vecteurs collectés sur le terrain (Steinmann *et al.*, 2013).

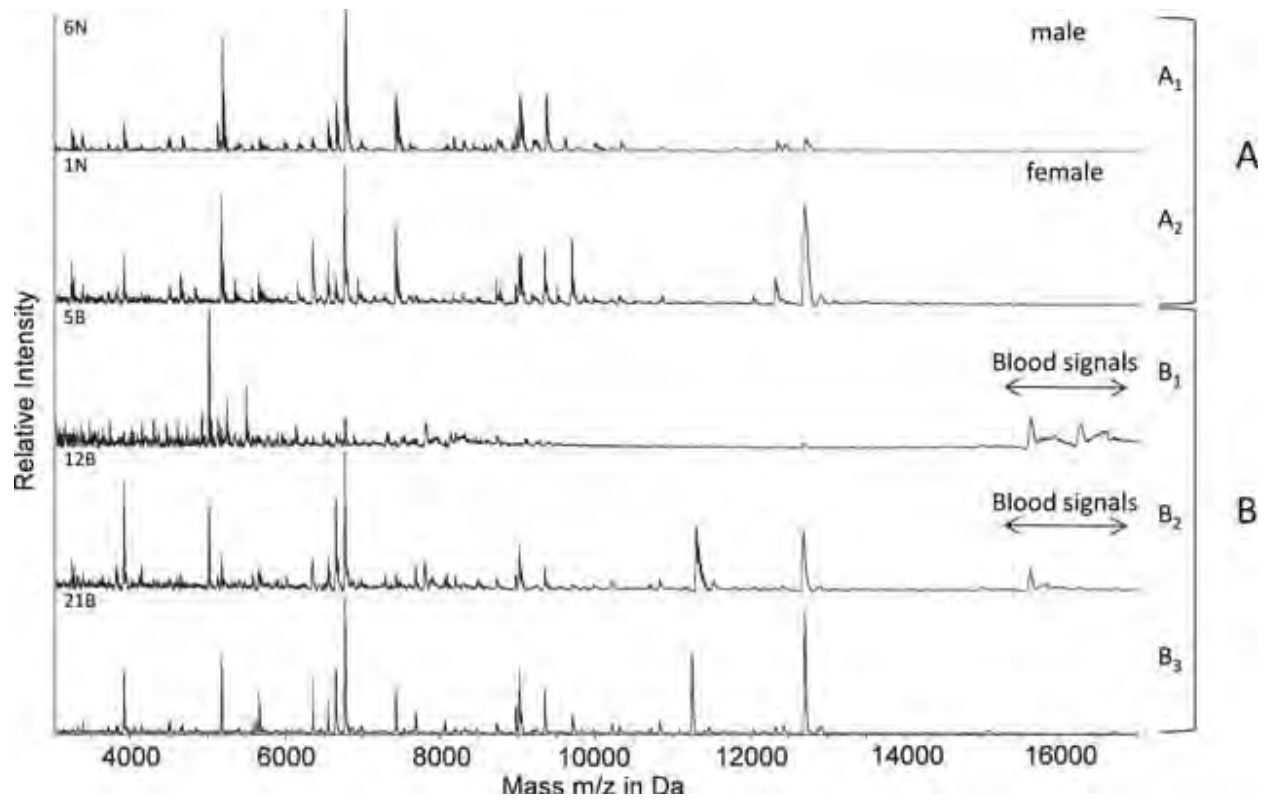


Figure 10 : Spectres de masses obtenues par MALDI-TOF de *C. nubeculosus* (Kaufmann *et al.*, 2011).

A, non gorgés male (A1) et A2 (femelle). B, spectres de femelles obtenus dans les premiers jours après un repas sanguin (B1: immédiatement après, B2: 2 jours après, et B3: 5 jours après)

I.4. Pathogènes transmis ou associés au *Culicoides*

Différentes espèces du genre *Culicoides* sont nuisibles à l'homme, responsables de réactions d'hypersensibilité générant des allergies chez les animaux et sont impliqués dans la transmission de divers parasites (protozoaires et filaires) et virus affectant l'homme, les oiseaux et animaux (**Tableau 1**)

I.4.1. Virus

Plus de 50 arbovirus ont été isolés à partir de *Culicoides* à travers le monde. Ces virus sont maintenus dans la nature par des cycles de réplication alternatifs entre les *Culicoides* vecteurs et les hôtes sensibles et/ou les réservoirs (**figure 11.**).

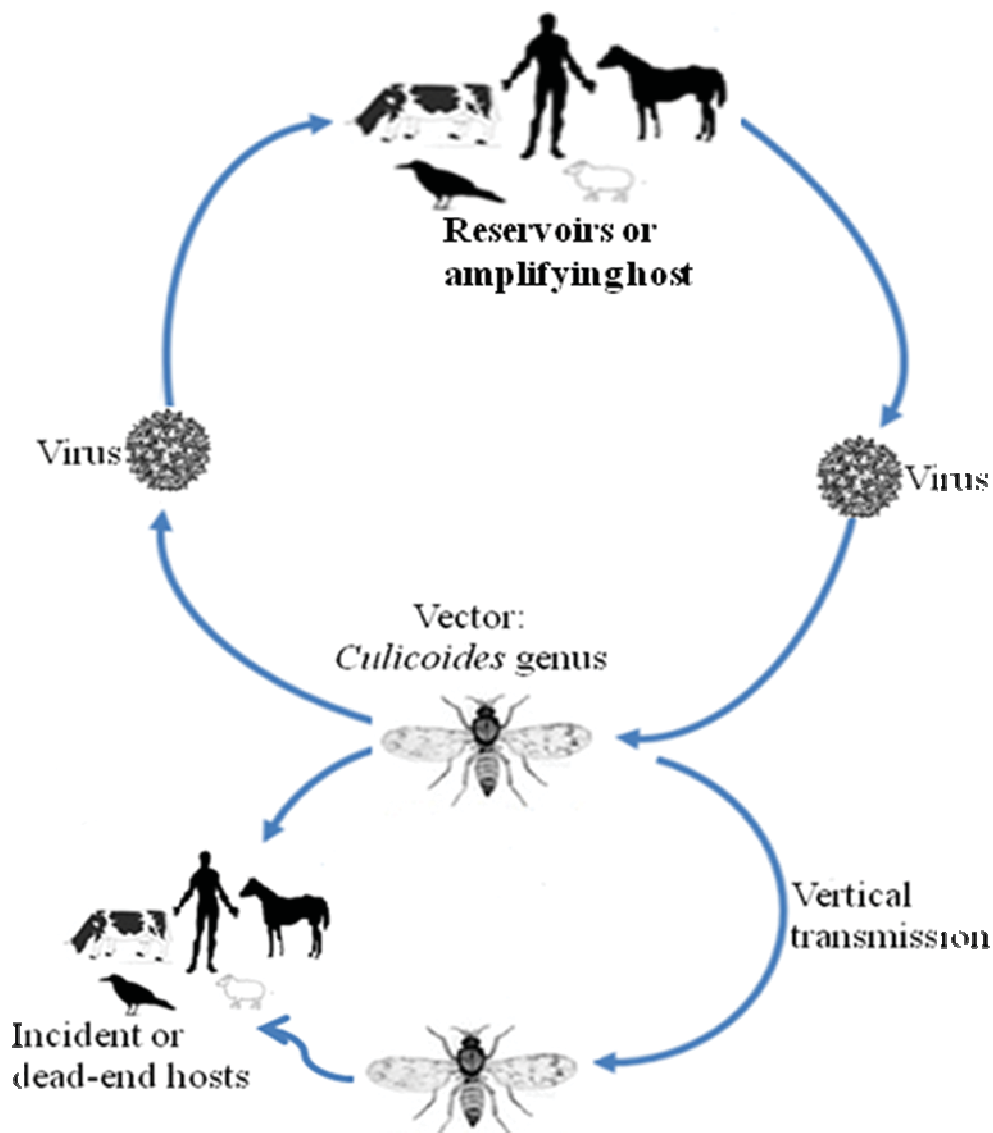


Figure 11 : Représentation schématique d'un système vectoriel.

I.4.1.1. Fièvre catarrhale ovine ou Maladie de la langue bleue

La fièvre catarrhale ovine (FCO) « bluetongue (BT) » est une maladie virale touchant les ruminants domestiques et sauvages. Elle est causée par un *Orbivirus* ou « bluetongue virus (BTV) » appartenant à la famille des *Reoviridae* (Holmes *et al.*, 1995). BTV est l'un des virus les plus étudiés de la famille des *Reoviridae*. Le virus est transmis exclusivement par certaines espèces du genre *Culicoides*. La maladie est endémique dans de nombreuses régions tropicales, subtropicales et tempérées, y compris une grande partie de l'Amérique, Afrique, Asie du Sud et le Nord de l'Australie (Maan *et al.*, 2012). Il existe au moins 26 sérotypes de BTV différents qui ont été identifiés (Hofmann *et al.*, 2008; King *et al.*, 2011; Maan *et al.*, 2011). *Culicoides imicola* est le principal vecteur de la maladie en Afrique, en Asie et en Europe méditerranéenne (Balenghien and Delécolle, 2009; Mellor *et al.*, 2009). Cependant, des dizaines de milliers de foyers de FCO ont été recensés dans des régions où *C. imicola* est absent. Ce qui explique la suspicion de diverses espèces de *Culicoides* autres que *C. imicola* dans ces régions (Mellor and Wittmann, 2002; Torina *et al.*, 2004; Purse *et al.*, 2006). Dans le nord de l'Europe, les principales espèces impliquées appartiennent au sous-genre *Avaritia* (*C. obsoletus*, *C. dewulfi* et *C. chiopterus*); au groupe de *C. pulicaris*, à *C. nubeculosus* et *C. sonorensis* (Carpenter *et al.*, 2006; Carpenter *et al.*, 2009; Veronesi *et al.*, 2013). Ces espèces sont incriminées à cause de leur préférence d'hôte, de l'identification ou de l'isolement du virus à partir d'individus capturés sur le terrain ou d'infections expérimentales (Balenghien and Delécolle, 2009; Mellor *et al.*, 2009). En plus, les espèces *C. bolitinos* (en Afrique), *C. fulvus* et *C. brevitarsis* (en Australie), *C. sonorensis* (en Amérique du Nord), *C. insignis* et *C. brevitarsis* (en Amérique Central et du Sud) sont connues comme des vecteurs majeurs coexistant avec *C. imicola* (Meiswinkel, 1989; Mellor *et al.*, 1990) (**figure 12**).

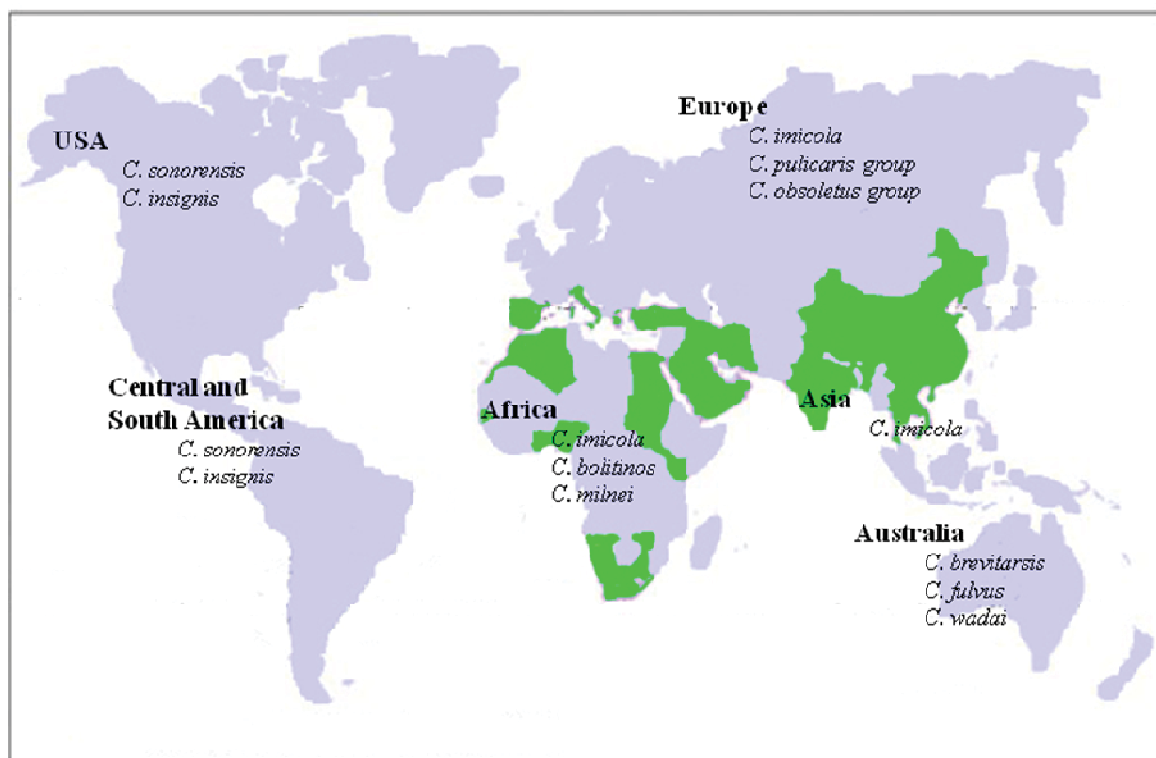


Figure 12 : Répartition géographique des vecteurs du virus de la FCO.

Culicoides imicola est le vecteur de la FCO le plus important en Afrique, en Asie et en Europe (zone de répartition indiqué en vert). D'autres espèces de *Culicoides* impliquées dans la transmission de la FCO sont énumérées suivant leur répartition géographique.

I.4.1.2. Maladie hémorragique épizootique ou "Epizootic hemorrhagic disease (EHD)"

La maladie hémorragique épizootique est une maladie transmise par des arthropodes aux ruminants sauvages et domestiques. Elle est causée par une espèce virale ("*Epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV)*") du genre *Orbivirus* de la famille des *Reoviridae* (Cêtre-Sossah *et al.*, 2014). Le virus de la maladie hémorragique épizootique est l'un des arbovirus pathogènes des Cerfs de Virginie les plus répandus dans le monde (Allison *et al.*, 2010). L'infection se traduit souvent par une maladie hémorragique fatale avec une mortalité élevée qui peut avoir un impact significatif sur l'élevage de cerfs et chevreuil (Sleeman *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). Ce virus est cliniquement indiscernable du virus de la fièvre catarrhale ovine, alors que tous les deux peuvent affecter les cerfs, moutons et bovins (Sun *et al.*, 2014). Kedmi et ses collègues ont montré que la distribution spatiale du virus de la fièvre catarrhale du mouton en Israël était similaire à celle de EHDV et conforme aux caractéristiques épidémiologiques semblables de ces deux virus (Kedmi *et al.*, 2011). Une épidémiologie associée à EHDV a été observée dans le sud de l'Alberta en 1962, où elle a entraîné la mort de

450 cerfs de Virginie, 20 cerfs mulot et 15 antilocapres (antilope d'Amérique) (Ditchfield *et al.*, 1964; Pybus *et al.*, 2014). Le virus est apparu en Israël en 2006, (Yadin *et al.*, 2008) et 2007 en Afrique (Maroc et Algérie) et en Turquie (Temizel *et al.*, 2009). Sept sérotypes (1-7) ont été décrits à travers le monde (Savini *et al.*, 2011). En Amérique du Nord, les femelles *Culicoides sonorensis* et *C. variipennis* sont les principaux vecteurs de EHDV (Walton, 2004; Schmidtman *et al.*, 2011; Hubálek *et al.*, 2014). Dans l'Europe, les espèces des complexes *Obsoletus* (*C. dewulfi* et *C. chiopterus*) et *Pulicaris* sont les vecteurs majeurs de EHDV (Savini *et al.*, 2011). Les espèces du groupe *C. schultzei* (comme *C. kingi* et *C. schultzei*), ainsi que d'autre *Culicoides* spp ont été impliqués dans la transmission du virus en Afrique (Mellor *et al.*, 1984; Mohammed and Mellor, 1990). En Australie, *Culicoides brevitarsis* est le principal vecteur (Hubálek *et al.*, 2014).

I.4.1.3. Virus Schmallerberg ou "Schmallerberg virus (SBV)"

Le virus *Schmallerberg* est un nouveau *Orthobunyavirus* identifié en Allemagne à la fin de 2011 en utilisant une approche métagénomique (Hoffmann *et al.*, 2012). Il infecte principalement les bovins, les moutons et les chèvres et peut conduire à des infections congénitales, provoquant l'avortement et des anomalies fœtales. De plus, les infections de *SBV* réduisent la quantité de lait qui est produit chez les fermes touchées (Roberts *et al.*, 2014, Veldhuis *et al.*, 2014). L'analyse métagénomique d'échantillons prélevés sur des bovins adultes a permis de rapprocher le *SBV* des virus du séro groupe *Simbu* (*Akabane*, *Aino* et *Shamonda*) (Goller *et al.*, 2012). Un an plus tard, Garigliany et collaborateurs ont démontré l'implication du virus dans la malformation congénitale, comme premier signe clinique de la maladie (Garigliany *et al.*, 2012). En plus, deux études ont confirmé les infections de *SBV* chez les camélidés (Jack *et al.*, 2012) et les cerfs (Barlow *et al.*, 2013). La propagation très rapide et efficace de la maladie en 2011 a été démontrée par le taux élevé de l'infection par l'évaluation sérologique (Veldhuis *et al.*, 2013; Méroc *et al.*, 2014). Le virus a été récemment identifié par PCR en temps réel en France (Ponsart *et al.*, 2014). Plusieurs techniques de diagnostic sont utilisées pour la détection du virus, mais la détection d'anticorps spécifique est beaucoup plus prometteuse (Wernike *et al.*, 2014). Des espèces de *Culicoides* sont impliquées dans de *SBV* par des études réalisées en Europe. Les principaux *Culicoides* incriminés sont *C. scoticus*, *C. obsoletus* s.s., *C. dewulfi*, et *C. chiopterus* (Rasmussen *et al.*, 2012; De Regge *et al.*, 2012; Elbers *et al.*, 2013). Très récemment, Kirkeby et Dominiak rapportaient que *Culicoides gornostaevae* est susceptible d'être un vecteur potentiel de *SBV* en Europe (Kirkeby and Dominiak, 2014).

I.4.1.4. Virus Oropouche ou "*Oropouche virus (OROV)*"

Le virus Oropouche est un pathogène zoonotique émergent de la famille des *Bunyaviridae*, du genre *Orthobunyavirus*, du séroroupe *Simbu*. OROV est l'une des arboviroses les plus importantes en Amérique (Mellor *et al.*, 2000; Schmaljohn and Nichol, 2007). En Amazonie brésilienne, la fièvre d'Oropouche est la deuxième maladie virale la plus fréquente, après la dengue (Pinheiro *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2009; Bastos Mde *et al.*, 2012). Au Brésil, le virus Oropouche provoque de grandes épidémies explosives et des fièvres aiguës dans des villes et villages en Amazonie et sur le Plateau central (Nunes MR *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2007; Bernardes-Terzian *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2009; Bastos Mde *et al.*, 2012). En plus de son association à de grandes épidémies, OROV peut également entraîner des infections humaines sporadiques (Bernardes-Terzian *et al.*, 2009). Le virus Oropouche est fréquemment isolé chez *Culicoides paraensis*. Les épidémies d'Oropouche apparaissent dans les régions où la population de *C. paraensis* est trouvée à une densité élevée, en piquant les humains aussi bien à l'intérieur des maisons qu'à l'extérieur (Hoch *et al.*, 1990). La transmission biologique d'OROV par *C. paraensis* à l'homme et aux hamsters a été démontrée expérimentalement, avec des taux de transmission élevés (Pinheiro *et al.*, 1982). Mellor *et al.*, (2000), ont rapporté que *C. paraensis* est le principal vecteur biologique d'OROV chez l'homme durant les épidémies urbaines. Cependant, le ou les vecteur(s) du virus dans son cycle "silencieux" sylatique reste inconnu. Des études ont montré l'existence de 3 génotypes circulant au Brésil : génotype I et II dans le bassin amazonien et génotype III dans le Sud-est de la région (Saeed *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2007).

I.4.1.5. Virus du Nil Occidental (VNO) ou "*West Nile Virus (WNV)*"

Le virus du Nil occidental (VNO) appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus* (Calisher and Gould, 2003). WNV est endémique en Europe (Krisztalovics *et al.*, 2008), au centre-est de l'Afrique (Monath *et al.*, 1983), en Asie (King *et al.*, 2007), en Australie (King *et al.*, 2007) et en Amérique du nord. En Amérique du Nord, WNV est apparu à New York en 1999 (Asnis *et al.*, 2001). Depuis lors, le virus s'est propagé très rapidement sur de grandes parties du continent (Noireau *et al.*, 1990). L'atteinte neurologique est la forme sévère du WNV qui est de plus en plus observée chez l'homme depuis son introduction en Amérique (Murray *et al.*, 2008). Entre 1999 et 2005, le WNV a été responsable de plus de 12 000 cas de méningo-encéphalite, dont plus de 1 100 cas de décès humains, et les survivants ont souvent souffert de séquelles neurologiques (Murray *et al.*, 2010). Le virus West Nile est

transmis par plusieurs espèces de moustiques principalement du genre *Culex* (Turell et al, 2008). La réplication et la transmission de virus chez d'autres arthropodes hématophages ont été démontrées dans des conditions expérimentales (Hutcheson *et al.*, 2005), mais le rôle de ces potentiels vecteurs dans un cadre naturel n'a pas été déterminé (Murray *et al.*, 2010). Naugle et al, (2004), rapportaient la première détection de WNV chez les *Culicoides*. Cette première a été réalisée chez des pools de *C. sonorensis*. Un an plus tard, le VNO a été détecté chez *C. arboricola*, *C. biguttatus* et *C. stellifer* (Sabio *et al.*, 2006).

I.4.1.6. La peste équine ou "*African Horse Sickness Virus (AHSV)*"

La peste équine est une maladie des équidés transmise par des arthropodes, due à un orbivirus de la famille des *Reoviridae*. Le virus est transmis par des insectes hématophages. AHS a été observée en Afrique du Sud depuis le XVII^e siècle (MacLachlan and Guthrie, 2010). Les principaux vecteurs sont des espèces de *Culicoides*. Jusqu'à présent, 3 espèces de *Culicoides* ont été identifiées comme vectrices de la maladie. En 1944, Du Toi a confirmé expérimentalement la transmission d'AHSV par *C. imicola*. Mellor et collègues ont démontré expérimentalement la transmission de AHSV par les *Culicoides sonorensis* et *C. obsoletus* (Mellor *et al.*, 1990; Mellor and Hamblin, 2004). Mais le principal vecteur confirmé d'AHSV est *C. imicola*. Cependant, plusieurs espèces de *Culicoides* sont suspectées dans sa transmission (Mellor *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2000). La maladie est considérée comme enzootique en Afrique Sub-saharienne où les 9 sérotypes sont présents. Les zèbres sont vus comme les hôtes vertébrés naturels et réservoirs d'AHSV et sont soupçonnés de jouer un rôle vital dans la persistance du virus en Afrique (Mellor and Hamblin, 2004).

I.4.1.7. Virus de l'encéphalose équine ou "*Equine encephalosis virus (EEV)*"

Le virus de l'encéphalose équine appartient au genre *Orbivirus* de la famille des *Reoviridae*. De nos jours, sept sérotypes EEV sont différenciés (Hubálek *et al.*, 2014). EEV a été identifié en Afrique du Sud, Gambie, Ethiopie, Israël et au Ghana (Mildenberg *et al.*, 2009; Oura *et al.*, 2012). *C. imicola* et *C. bolitinos* sont les principaux vecteurs du virus (Hubálek *et al.*, 2014).

I.4.1.8. Virus Akabane ou "*Akabane Virus (AKAV)*"

AKAV appartient au séro groupe *Simbu* de la famille des *Bunyaviridae*. Le virus infecte une large gamme d'animaux, comprenant les buffles, bovins, chameaux, moutons, chèvres et chevaux (Jennings and Mellor, 1989). Les principaux vecteurs d'AKAV sont les *Culicoides*.

Le virus a été isolé chez *C. brevitarsis*, *C. oxystoma*, *C. imicola*, et *C. milnei* dans diverses régions (Jennings and Mellor, 1989).

I.4.1.9. Fièvre éphémère bovine ou "*Bovine ephemeral fever virus (BEFV)*"

La fièvre éphémère bovine est une maladie virale importante qui peut entraîner des pertes économiques sévères chez les bovines et les buffles. Elle est due à un virus du genre *Rhabdovirus* (Mellor *et al.*, 2000). La maladie est apparue en Afrique, Inde, Indonésie, au sud de la Chine, Sud-est de l'Asie, Japon et au nord-est de l'Australie (St George and Standfast, 1988). Le virus a été isolé chez *C. kingi*, *C. nivosus*, *C. bedfordi*, *C. imicola*, *C. cornutus* au Kenya (Davies and Walker, 1974), au Zimbabwe chez *C. imicola* et *C. coarctatus* (Blackburn *et al.*, 1985) et en Australie chez *C. brevitarsis* (Cybinski and Muller, 1990).

I.4.1.10. Fièvre de la Vallée du Rift (FVR) ou "*Rift Valley Fiver Virus (RVFV)*"

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une zoonose virale aiguë pouvant affecter gravement diverses espèces d'animaux domestiques tels que les buffles, les camélidés, les bovins, les caprins et les ovins ainsi que l'homme (Gerdes, 2002). Elle est due au virus RVF qui est rattaché au genre *Phlebovirus*, de la famille des *Bunyaviridae* (Pépin, 2011). La maladie se traduit chez les ruminants surtout domestiques par de la fièvre, un tableau clinique sévère, des avortements ainsi qu'une morbidité et une mortalité fortes. L'ARN de RVFV a été détecté chez les moucheron du genre *Culicoides* pendant les épizooties, mais leur rôle vectoriel reste à déterminer (Hubálek *et al.*, 2014).

Les moucheron du genre *Culicoides* sont aussi impliqués dans le cycle de divers autres virus tels que le virus de la stomatite vésiculeuse, le virus *Buritirana*, le virus *Utinga* et le virus *Curionópolis*.

I.4.2. Protozoaires

I.4.2.1. *Leishmania*

Les espèces du genre *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) sont des protozoaires parasites entraînant des maladies appelées leishmanioses chez leurs hôtes vertébrés, y compris l'homme (Dostálová and Volf, 2012). Les premières études portant sur des *Leishmania* en Inde, ont incriminées les espèces du genre *Culicoides* dans la transmission de *Leishmania donovani* (Christophers and Barraud, 1925). Cependant, depuis cette date, et jusqu'au début du 20^{ème} siècle, aucune étude n'a été publiée concernant l'implication potentielle de moucheron dans la transmission de ces protozoaires (Slama *et al.*, 2014). Entre 2004 et 2010, certains chercheurs ont signalé l'infection naturelle des *Culicoides* par les protozoaires *Herpetomonas* et *Sergeia* (Podlipaev *et al.*, 2004, Svobodová *et al.*, 2007). En 2011, Dougall *et al.* (2011) ont rapporté l'infection naturelle de *Forcypomyia* par *Leishmania*. L'étude a utilisé à la fois l'approche moléculaire et la microscopie pour la détection des promastigotes dans le tube digestif des moucheron. Les études expérimentales de Seblova et collègues (2012), ont montré que *Culicoides nubeculosus* ne joue pas un rôle important dans la transmission des espèces de *Leishmania*. Cependant, *Leishmania infantum* a été identifié pour la première fois, par la technique de PCR, chez *C. imicola* et *C. circumscriptus* capturés dans la nature (Slama *et al.*, 2014). Une étude récente menée en Amérique du Sud a soupçonné les *Culicoides* d'être des vecteurs potentiels de *Leishmania enriettii* (Seblova *et al.*, 2015).

I.4.2.2. *Leucocytozoon caulleryi*

Les espèces du genre *Leucocytozoon* sont des protozoaires parasites d'oiseaux. Elle appartiennent à la famille des *Leucocytozoidae* de l'ordre des *Haemospororida* (sous-classe des *Haemosporidiasina*, classe : *Aconoidasida* et embrenchement : *Apicomplexa*) et sont transmises par les *Culicoides* (Lee *et al.*, 2014). *Leucocytozoon caulleryi* est le principal protozoaire parasite de poulets (Burmudez, 2008). *Culicoides arakawa* est le principal vecteur de *L. caulleryi* (Morii *et al.*, 1981; Abella *et al.*, 1994). Yu *et al.* avaient montré que la densité de *C. arakawa* est positivement corrélée à des flambées d'infection de *L. caulleryi* dans des poulaillers (Yu *et al.*, 2001). Les espèces de *C. circumscriptus* et *C. odibilis* sont également impliquées dans la transmission de *L. caulleryi* (Lee *et al.*, 2014). Ce protozoaire parasite de poules a été identifié en Asie du Sud et de l'Est chez des poulets de chair (Morii *et al.*, 1981; Abella *et al.*, 1994). Au Japon, des études ont montré des cas de mortalités chez des

poussins et une réduction de la qualité des œufs en couvaison associés à l'infection de *L. caulleryi* (Nakamura *et al.*, 2001). En Corée du Sud, Lee et collaborateurs (2014), ont rapporté un cas de *L. caulleryi* dans un élevage de poulets de chair.

I.4.2.3. Autres protozoaires

Les *Culicoides* sont également impliqués dans la transmission de protozoaires sanguins du genre *Haematoproteus* et *Hepatocystis*. La plupart de ces espèces ont pour hôtes des oiseaux. Dans sa revue, Mullen (2009), rapportait que l'espèce *Haematoproteus meleagridis* est problématique dans les élevages de volailles.

I.4.3. Les helminthes

I.4.3.1. *Mansonella perstans*

Mansonella perstans est un filaire nématode endémique dans les régions tropicales de l'Afrique notamment au Sénégal, à l'Ouganda et au sud du Zimbabwe mais également en Amérique du Sud (Keiser *et al.*, 2008; Simonsen *et al.*, 2011). Les infections à *M. perstans* ont été signalées dans 33 pays en Afrique sub-saharienne, avec des prévalences élevées dans les régions endémiques (Simonsen *et al.*, 2011). *M. perstans* est l'un des parasites de l'homme les plus répandus en Afrique tropicale. En dépit de cela, seules quelques études ont été menées sur l'épidémiologie et la morbidité de cette infection dans les populations endémiques (Asio *et al.*, 2009; Simonsen *et al.*, 2011). En outre, l'infection due à *M. perstans* est l'une des infections tropicales les plus négligées. Elle est dite maladie des pauvres et rencontrée dans les zones rurales, sans signes cliniques spécifiques (Simonsen *et al.*, 2011). *M. perstans* a été identifié dans plusieurs régions d'Afrique (Agbolade *et al.*, 2006). Plusieurs études ont rapporté la présence de *M. perstans* dans toute la région du Nigéria, avec des prévalences élevées (Oyerinde *et al.*, 1988; Udonsi, 1988; Ufomadu *et al.*, 1990; Anosike, 1994; Agbolade and Akinboye, 2001). Uttah (1998) avait rapporté que la transmission de *M. perstans* est assurée par les moucheron du genre *Culicoides* au Nigéria. Au Cameroun, les études intensives sur les vecteurs de *M. perstans* ont été menées, notamment sur *C. grahamii*, *C. austeni* et *C. inornatipennis* (résumé dans (Simonsen *et al.*, 2011)). Au Brésil, *M. perstans* a été identifié dans le territoire fédéral d'Amazonie du Venezuela (Kozek *et al.*, 1983; Formica and Botto, 1990) ; mais sans effet significative sur la santé humaine dans la région (Tang *et al.*, 2010). Peu de pathologies comme de l'angioedème transitoire, des douleurs abdominales

et la péricardite ont été directement attribuées à l'infection de *M. perstans* (Adolph *et al.*, 1962; Bourgeade *et al.*, 1989).

I.4.3.2. *Mansonella ozzardi*

Mansonella ozzardi est une filaire de pathogénicité ignoré par la santé publique (Raccurt *et al.*, 2014). Il est rencontré dans toute l'Amérique intertropicale, du Mexique au Nord de l'Argentine. Le prurit, des céphalées, des douleurs articulaires, des lésions oculaires, y compris la kératite et la fièvre sont les signes cliniques non spécifiques qui ont été rapportés chez les patients (Vianna *et al.*, 2012; Raccurt *et al.*, 2014). Le principal vecteur de *M. ozzardi* est *C. furens* (Lowrie and Raccurt, 1981). En Haïti, *C. barbosai* est également impliqué dans la transmission de *M. ozzardi* (Raccurt *et al.*, 2014).

D'autres filaires comme *Onchocerca gutturosa*, *Onchocerca cervicalis*, *Icosiella neglecta*, *Mansonella gracile* et *Mansonella caudispina* ont été suspectés pour être transmis aux animaux par les *Culicoides*.

I.4.4. Bactéries

Les moucheron du genre *Culicoides* font partis des insectes hématophages les plus abondants et sont des vecteurs importants d'agents pathogènes affectant les humains et le bétail. Leur association avec les bactéries est très peu connue, y compris les composants de leur système immunitaire. Seulement quelques études, ont été réalisées chez les *Culicoides* pour l'identification des bactéries.

En Allemagne, 8 spécimens de *Culicoides* ont été testés pour la détection de 5 genres bactériens endosymbiotiques : *Cardinium* (*Bacteroidales*: *Bacteroidaceae*); *Wolbachia* et *Rickettsia* (*Rickettsiales*); *Spiroplasma* (*Entomoplasmatales*: *Spiroplasmataceae*); et *Arsenophonus* (*Enterobacteriales*: *Enterobacteriaceae*) (Lewis *et al.*, 2014). Les résultats de leur étude, ont montré seulement la présence de *Candidatus Cardinium hertigii* group C, chez les *C. pulicaris* et *C. punctatus*.

Nakamura *et al.* (2009), ont signalé dans un rapport la présence d'espèces de *Cardinium* chez un certain nombre de *Culicoides* spp. Cependant, aucune étude n'a encore décrit le rôle de *Cardinium* dans la biologie de ces insectes.

Jusqu'à présent, il n'y a pas d'étude publiée démontrant l'influence de *Cardinium* sur la transmission virale des *Culicoides*. De plus, aucune bactérie n'a été documentée pour être transmise par les *Ceratopogonidae*.

I.5. Relations hôtes vecteurs

Les moucheron hémaphages sont nuisibles et vecteurs potentiels de maladies chez les vertébrés (Balashov, 1999). Leur évolution a été observée dans trois grandes tendances écologiques : ectoparasitisme, le parasitisme dans les nids et les abris, et le parasitisme qui consiste à faire des attaques répétées mordantes sur les hôtes à l'extérieur de refuges (Balashov, 1999). La préférence trophique chez les *Culicoides* dépend de la disponibilité de l'hôte, des réactions défensives de l'hôte et les préférences d'accueil (Viennet *et al.*, 2013). La préférence de l'hôte peut être définie comme la tendance de l'insecte à sélectionner une catégorie de vertébrés ou d'une espèce hôte donné (Balenghien *et al.*, 2011). Le choix de l'hôte est le résultat d'un compromis entre les avantages à gagner en trouvant un hôte optimale et le risque de mort avant de se nourrir. Il détermine les comportements alimentaires opportunistes ou spécialisés (Lyimo and Ferguson, 2009). Les espèces de *Culicoides* sont opportunistes dans leur choix d'hôte avec une préférence pour le bétail (Lassen *et al.*, 2011). Le nombre d'antenne avec ou sans sensilles coeloconica joue également dans les critères de sélection des hôtes chez les *Culicoides* (Braverman *et al.*, 2012). En outre, le choix de l'hôte est un facteur déterminant l'intensité à laquelle les agents pathogènes sont transmis (Viennet *et al.*, 2013).

Tableau 1: Pathogènes transmis ou associés avec les Ceratopogonidae

<i>Pathogènes</i>	<i>Hôtes</i>	<i>Culicoides Vecteurs</i>	<i>References</i>
BTV	Ruminants sauvages et domestiques	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris groups</i> , <i>C. nubeculosus</i> , <i>C. sonorensis</i> , <i>C. bolitinos</i> , <i>C. fulvus</i> , <i>C. brevitarsis</i> , <i>C. insignis</i> , <i>C. pusillus</i> .	Mellor and Wittmann, 2002; Torina et al., 2004 ; Purse et al., 2006 ; Carpenter et al., 2006; Carpenter et al. 2009; Veronesi et al., 2013 ; Meiswinkel et al., 1989; Mellor, 1990.
EHDV	Cerfs, ovins bovins	<i>C. sonorensis</i> , <i>C. variipennis</i> , <i>Obsoletus complex</i> , <i>C. dewulfi</i> , <i>C. chiopterus</i> , <i>Pulicaris complex</i> , <i>C. kingi</i> , <i>C. schultzei</i> , <i>C. brevitarsis</i>	Walton 2004; Schmidtman et al, 2011; Jones et al 1977; Foster et al, 1977 ; Hubálek et al, 2014 ; Savini et al, 2011 ; Hubálek et al, 2014.
SBV	bovins, ovins et caprins	<i>Culicoides scoticus</i> , <i>C. obsoletus s.s.</i> , <i>C. dewulfi</i> , <i>C. chiopterus</i>	De Regge et al., 2012; Elbers et al.; 2013; Rasmussen et al., 2012
OROV	hommes	<i>C. paraensis</i> ,	Mellor et al, 2000; Borkent and Spinelli, 2007
WNV	oiseaux, Hommes, équidés	<i>C. sonorensis</i> , <i>C. arboricola</i> , <i>C. biguttatus</i> , <i>C. stellife</i>	Naugle et al, 2004; Sabio et al, 2006
AHSV	horses, zebras, dogs, elephants, camels, sheep, goats	<i>C. imicola</i> , <i>C. sonorensis</i> , <i>C. obsoletus</i>	Mellor and Hamblin, 2004
EEV	équidés	<i>C. imicola and C. bolitinos</i>	Hubálek et al., 2014
AKAV	buffalo, cattle, camel, sheep, goats, horses	<i>C. brevitarsis</i> , <i>C. oxystoma</i> , <i>C. milnei</i>	Jennings and Mellor, 1989
BEFV	cattle, buffalo	<i>C. kingi</i> , <i>C. nivosus</i> , <i>C. bedfordi</i> , <i>C. imicola</i> , <i>C. cornutus</i> , <i>C. imicola and C. coarctatus</i> , <i>C. brevitarsis</i>	Mellor et al., 2000; St George and Standfast, 1988; Davies and Walker, 1974; Blackburn et al., 1985; Cybinski and Muller, 1990
RVF		<i>Culicoides spp</i>	Hubálek et al., 2014
<i>Shuni virus</i>	sheep, cattle, equids	<i>Culicoides spp</i>	Hubálek et al., 2014
VSV	Horses, cattle, pigs, hommes	<i>C. sonorensis</i> , <i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
CURV	Souris	<i>C. spp.</i>	Travassos et al, 1998

<i>Burritirana virus</i>	Unknown	<i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Utinga virus</i>	Sloths	<i>Ceratopogonidae</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Leishmaniasis</i>	hommes	<i>C. imicola, C. circumscriptus</i>	Slama et al, 2014
<i>Leucocytozoon caulleryi</i>	Poule	<i>C. arakawa, C. circumscriptus, C. odibilis</i>	Lee et al, 2014, Nakamura et al, 2001
<i>Haematoproteus meleagridis</i>	Volaille	<i>C. spp</i>	Lee et al, 2014, Mullen, 2009
<i>Hepatoctystis spp</i>	Volaille	<i>C. spp</i>	Mullen, 2009
<i>Mansonella pesrtans filariasis</i>	hommes	<i>C. grahami, C. austeni and C. fulvithorax</i>	Uttah, 1998; Agbolade et al, 2006
<i>Mansonella ozzardi</i>	hommes	<i>C. furens, C. barbosai</i>	Raccurt et al, 2014
<i>Dipetalonema caudispina</i>	Monkeys (Cebidae)	<i>C. hollensis</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Dipetalonema gracile</i>	Monkeys (Cebidae, Callithricidae)	<i>C. hollensis</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Dipetalonema marmosetae</i>	Monkeys (Cebidae, Callithricidae)	<i>C. furens</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Dipetalonema ozzardi</i>	hommes, other primates	<i>C. lahillei, C. paraensis, L. bequaerti, C. furens C. phlebotomus</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Icosiella neglecta</i>	Frogs	<i>F. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Onchocerca cervicalis</i>	Equidae	<i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Onchocerca gutturosa</i>	Bovidae	<i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007

Discussion du chapitre 1

La revue de la littérature sur les *Culicoides* afro-tropicale montre qu'à un moment de l'histoire, l'intérêt porté sur ces moucheron a été négligé. La preuve en est que peu d'équipes de recherche ont mis en relief l'impact économique, social et sanitaire, que les *Ceratopogonidae* en particulier les *Culicoides* pouvaient entraîner. Les travaux récents du LNERV sur les *Culicoides* potentiels vecteurs de virus animal (Diarra *et al.*, 2014, Fall *et al.*, 2015) pourront certainement attirer l'attention des autorités Sénégalaises sur l'importance de ces insectes. Plus de 50 arbovirus sont transmis par les *Culicoides* à travers le monde (Meiswinkel *et al.*, 1994). Au Sénégal, la dernière épidémie de la peste équine de 2008 causée par AHSV a entraîné des pertes économiques estimées à 498462665 FCFA, soit 55,58 % du coût économique total (Akakpo *et al.*, 2011). Une grande partie des *Culicoides* rencontrés au Sénégal, sont connus dans la transmission de divers virus. Alors que, la répartition d'une maladie dans une région, va de pair avec l'extension de l'aire de répartition des insectes vecteurs de la maladie. Cependant, le contrôle d'une maladie vectorielle passe par une connaissance accrue des différents acteurs qui interviennent dans le cycle. Tout d'abord la détermination précise du vecteur avec des outils de diagnostic fiables, reproductibles et rapides est capitale. En Afrique de l'ouest, l'identification des *Culicoides* avec de nouvelles technologies est pratiquement inerte, hormis les travaux de Bakhom et collègues sur l'identification moléculaire des espèces de *Culicoides* apparentées au *C. schultzei* (Bakhom *et al.*, 2013). La technologie MALDI-TOF MS a été évaluée avec succès pour sa capacité à identifier les différents groupes d'arthropodes. L'utilisation du MALDI-TOF pour la détermination des *Culicoides* n'a été valorisée qu'en Suisse (Kaufmann *et al.*, 2011; Kaufmann *et al.*, 2012a; Steinmann *et al.*, 2013; Kaufmann *et al.*, 2012b) et en Royaume Uni (Uhlmann *et al.*, 2014). Cette nouvelle approche s'ajoute aux autres méthodes (divers format de PCR, clés d'identifications) mises au point pour l'identification de ces moucheron piqueurs, facilitant ainsi les études épidémiologiques et biologiques de ces insectes.

Notre revue, nous a permis de faire le point sur les acquis, les hypothèses et les lacunes à combler concernant la biologie et les outils de détermination des *Culicoides* adultes, notamment concernant la détermination morphologique, moléculaire, le comportement de reproduction, la dispersion, les interactions pathogènes, vecteurs et hôtes.

DEUXIEME CHAPITRE : TRAVAUX DE THESE

II.1. Matériel et Méthodes d'étude

II.1.1. Zones d'étude

Les sites ont été choisis en tenant compte des foyers de distribution des maladies infectieuses sur lesquelles l'Unité des Maladies Infectieuses Tropicales et Emergentes (URMITE) cherche à déterminer l'épidémiologie. L'URMITE intervient dans 5 zones du Sénégal où leurs études ont montré la circulation de bactéries pathogènes notamment *Rickettsia* spp. inclus *R. felis*, *Bartonella* spp. inclus *B. quintana*, *Borrelia crocidurae*, *Tropheryma whipplei*, *Coxiella burnetii* et autres. L'unité cherche également à comprendre l'épidémiologie de *Mansonella perstans* en particulier dans la zone de Kédougou où il est très répandu. Dans la pratique, notre étude a retenu 3 zones pour la capture des *Ceratopogonidae*.

II.1.1.1. Mlomp (Basse Casamance)

La commune de Mlomp se situe à neuf kilomètres d'Oussouye, capitale départementale la plus méridionale de la Casamance. Mlomp est limité au nord par le fleuve Casamance qui la relie avec le département de Bignona, au sud par la commune d'Oukout, à l'ouest par la commune de Diembering et à l'est par le département de Ziguinchor. La commune de Mlomp a une superficie de 337 km² et occupe 37,82% de la superficie totale du département d'Oussouye.

Le climat de type soudano-guinéen est marqué par une saison sèche qui s'étale de novembre à mai et une saison des pluies de juin à octobre au cours de laquelle sont menées les activités agricoles. Celles-ci sont principalement basées sur la riziculture et l'élevage. Les précipitations moyennes peuvent atteindre 1500 mm par an. La pêche dite commerciale, en plein essor, se concentre surtout sur le site de Elinkine qui est devenu l'un des premiers ports de pêche de la région de Ziguinchor et qui attire de nombreux pêcheurs venant d'autres régions du Sénégal voire d'autres pays d'Afrique occidentale.

L'élevage pratiqué dans la zone de Mlomp est traditionnel. Le cheptel est composé de bovins gardés en troupeaux par village ou par quartier mais également des ovins et des caprins. On trouve aussi de nombreux éleveurs de porcs.

La population de Mlomp est estimée à 8000 habitants appartenant à des ménages regroupés en concessions familiales basées sur le système patrilinéaire. Les habitants de Mlomp sont principalement d'ethnie diola (joola), animistes ou catholiques et très peu de musulmans. Mlomp dispose d'un réseau convenable d'infrastructures scolaires avec une

tendance très favorable à l'inscription des jeunes filles puisqu'elles représentent plus de 47 % des effectifs.

Mlomp possède un bon taux de couverture sanitaire comparé aux autres zones rurales du Sénégal. La commune compte quatre postes de santé, 5 maternités rurales fonctionnelles et un dispensaire (**figure 13**) tenu par une sœur infirmière catholique. Outre la salle de consultation, le dispensaire dispose de 12 lits d'hospitalisation, d'un petit laboratoire et une maternité où les accouchements s'effectuent sous le contrôle de deux matrones travaillant sous la supervision de l'infirmière du dispensaire. Le dispensaire de Mlomp est un modèle pour toute l'Afrique.

L'analyse des résultats des patients fébriles consultant, a montré la présence de pathogènes dont les vecteurs impliqués sont ignorés. Le site a été choisi dans le cadre d'étudier le rôle et de répertorier les insectes de la famille des *Ceratopogonidae* dans la zone.



Figure 13. : Dispensaire de Mlomp

II.1.1.2. Toubacouta (Sine Saloum)

Dans le Sine Saloum, les villages concernés (Dielmo et Ndiop) sont situés dans l'arrondissement de Toubacouta du district de Sokone (région de Fatick). La zone de Toubacouta est une localité qui est située à environ à 280 km au sud-est de Dakar. Elle est approximativement de 15 Km au nord de la frontière Gambienne. Toubacouta est composée de 51 villages officiels qui sont répartis sur une superficie de 170 Km². La population est estimée à environ 28095 habitants (ANSD Fatick, 2007) avec une diversité ethnique composée de Sérère et de Wolof, mais également une minorité de Pulars et Socés.

Le climat de la zone est de type soudano-sahélienne. Les pluviométries sont de l'ordre de 1300 mm en moyenne par an (ANSD Fatick, 2011).

L'agriculture est la principale activité de la zone avec une variété de régime comprenant le riz, l'arachide, le mil, le maïs et aussi le maraichage. Pour la pêche, les activités principales sont la cueillette et la transformation des produits halieutiques.

L'élevage, malgré la faible productivité du secteur, occupe la deuxième place de l'économie locale aussi bien sur le plan des revenus financiers que de la valeur monétaire du nombre du cheptel. Par ailleurs, la distribution spatiale du cheptel intègre la dimension ethnique même si de plus en plus des agriculteurs font de l'élevage pour trouver des ressources additionnelles et améliorer la fertilité des sols.

Une plateforme de recherche a été établie dans les villages Dielmo en 1989 et Ndiop en 1993. Ce projet « Dielmo et Ndiop » a installé deux stations de recherche dans la zone. Les stations de recherche de Dielmo et de Ndiop se composent de logements simples dans des cases de style local avec un dispensaire et des équipements de laboratoire, une zone d'incinération, de l'électricité produite par des panneaux solaires et une adduction d'eau pompée de puits et de châteaux d'eau propres à chaque station. Les stations ont été récemment modernisées sans compromettre leur simplicité. Le projet emploie une infirmière diplômée d'état (Infirmier d'Etat), une femme de ménage et deux enquêteurs ou plus qui vivent dans chaque village. Des données de terrain sont saisies sur des formulaires ou des ordinateurs portables. Cette équipe est appuyée par un médecin qui séjourne régulièrement sur le site.

Un petit laboratoire (**figure 14**) "Point of Care" (POC) fut installé à Dielmo qui est destiné au diagnostic rapide des infections liées aux fièvres non palustres (Sokhna *et al.*, 2013). Les résultats du POC récemment publiés ont montré une prévalence de 15% des infections dues à *Rickettsia felis* chez des sujet fébriles, alors que la transmission de la bactérie à l'homme n'est pas encore connue dans la zone (Mediannikov *et al.*, 2013).

En plus de la nécessité d'investiguer l'épidémiologie des maladies fébriles comme la fièvre à *R. felis*, la zone de Toubacouta a été choisie en raison de son réseau hydraulique important, où plusieurs écosystèmes favorables aux *Ceratopogonidae* ou insectes coexistent, favorisant ainsi une transmission pérenne des pathogènes identifiés chez la population.



Figure 14 : Station de Dielmo (S) et le POC (P)

II.1.1.3. Kédougou (Sénégal oriental)

La zone d'étude de Kédougou est située au sud-est du Sénégal, proche des frontières du Mali et de la Guinée. Kédougou appartient à la zone écologique soudano-guinéenne. Le relief de la région est entrecoupé par des plateaux, des vallées qui constituent les principales zones agricoles. Kédougou est l'une des régions les plus pluvieuses du Sénégal, avec une pluviométrie comprise entre 450 et 1200 mm. Le réseau hydraulique de la région est constitué de trois grands cours d'eau principaux :

- Le Falémé à l'Est;
- le Koulountou à l'Ouest et;
- le fleuve Gambie avec ses deux affluents (le Niokolo et le Thiankoyea) font une grande boucle à l'intérieur de Kédougou.

La région de Kédougou occupe la dernière place du point de vue démographique par rapport aux autres régions du Sénégal. Sa population représente seulement 1% de la population du Sénégal (ANSD Kedougou, 2010). Kédougou est l'une des régions les moins équipées du point de vue infrastructures sanitaires. La majorité de la population habite dans des cabanes

couvertes de toits de chaume et en générale sans toilettes. Une enquête épidémiologique dans cette région a montré des prévalences élevées de *Mansonella perstans*.

Le choix du site Kédougou est lié à la forte prévalence de pathogènes circulant dans la zone, inclus mansonellose dont les vecteurs sont les *Culicoides*, mais aussi les maladies dont leur épidémiologie n'est pas connue. L'écologie de la région est favorable au développement des insectes hématophages, suspectés comme vecteurs.

II.1.2. Collecte et traitement des échantillons sur le terrain

II.1.2.1. Piégeages lumineux

Les moucheron piqueurs du genre *Culicoides* ont été capturés à l'aide de pièges lumineux de type « OVI » (Onderstepoort Veterinary Institute) décrit ci-dessous:

- Un tube ultraviolet d'une puissance de 8 W ;
- Un filet présentant des mailles de 5 x 5 mm permettant exclusivement le passage des insectes de petites dimensions et ;
- Une hélice en rotation qui les dirige dans un flacon collecteur contenant environ 300 ml.

Le piège est alimenté par une batterie fournissant un courant continu de 12 volts. L'extrémité inférieure du piège est reliée à un filet en tissu tergal qui ne laisse pas passer les minuscules insectes, auquel pend un pot (**figure 15**).

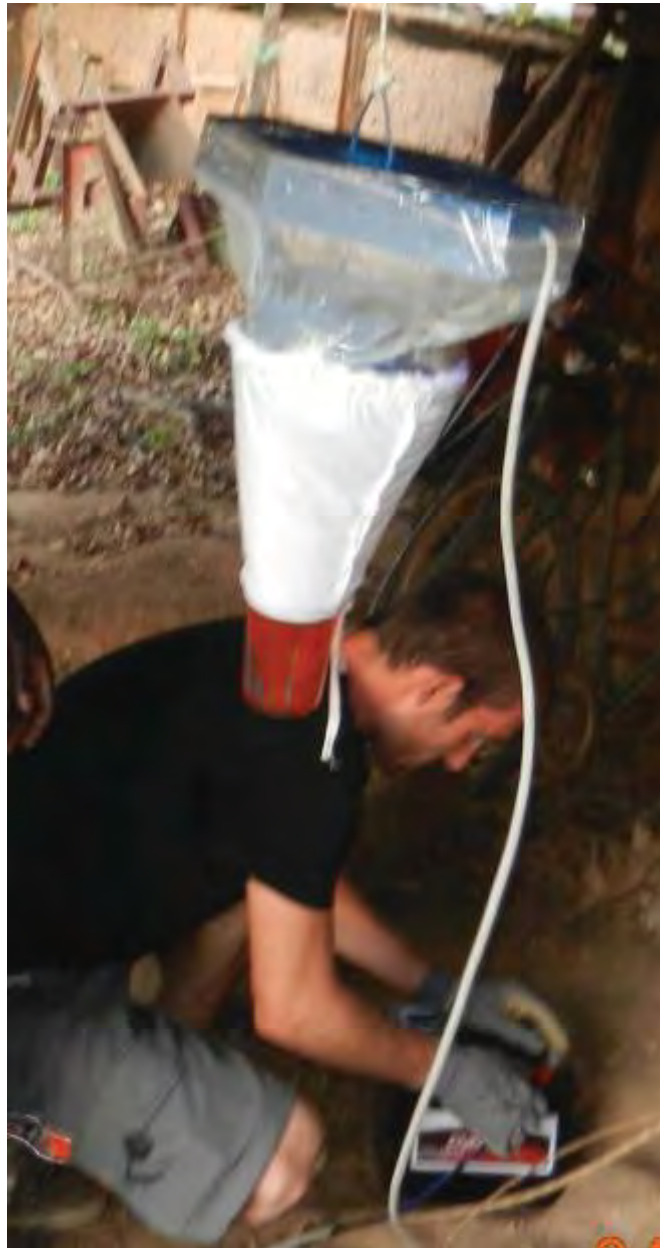


Figure 15 : Piège OVI

Le piège à lumière ultraviolette de model ‘Ondertepoort Veterinary Institute (OVI) est la méthode de collecte la plus utilisée, car la plus efficace pour échantillonner les *Culicoides*. Il est conçu et fabriqué en Afrique du Sud et commercialisé par le laboratoire Agricultural Research Council-Ondertepoort Veterinary Institute (ARC-OVI). La méthode permet de capturer uniquement les espèces présentant une activité crépusculaire ou nocturne (**Figure 16**).

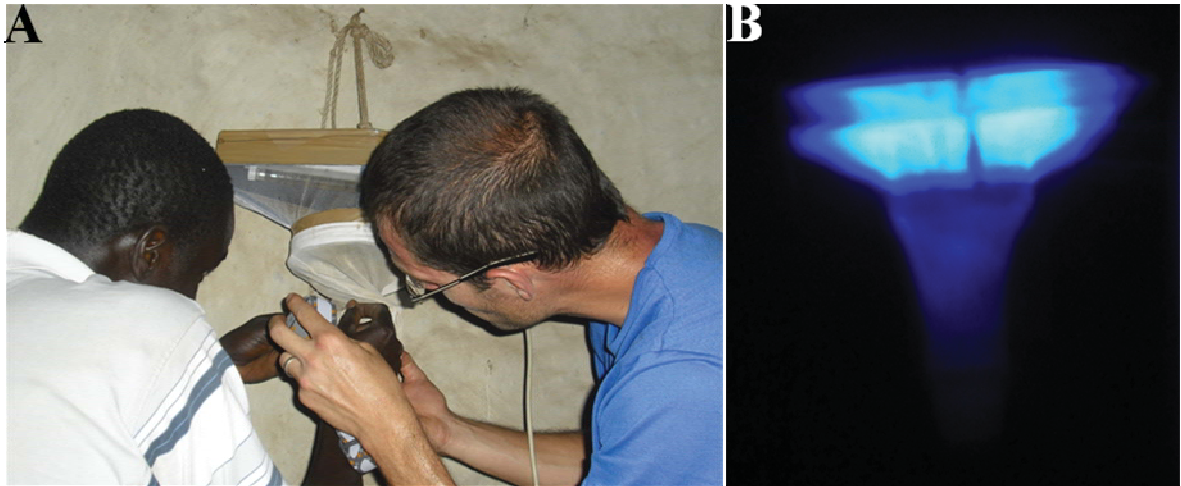


Figure 16 : Pose d'un piège OVI dans une case (A) et piège OVI en marche pendant la nuit (B)

Les pièges sont posés, au moins une heure avant la couchée du soleil, soit à proximité immédiate des habitations et/ou des cheptels de bétail, soit directement à l'intérieur des cases ou des concessions. La relève des pièges se fait au moins une heure après le lever du soleil car les moucheron sont plus actifs au crépuscule et à l'aube. Le cône en tissu de type moustiquaire et le pot en plastique sont placés dans une glacière électrique réglé à -20°C durant environ 30 minutes pour endormir les insectes (**figure 17**). Les *Culicoides* sont ensuite triés et séparés des autres insectes. Ils sont ensuite conservés dans des tubes à vis, par localité et par lots de dix dans de l'azote liquide jusqu'à notre retour au laboratoire.



Figure 17 : Photo de la glacière électrique

II.1.2.2. Traitement au laboratoire

II.1.2.2.1. Identification morphologique

Tous les *Culicoides* adultes ont été identifiés morphologiquement à la loupe, suivant les instructions des clés d'identifications disponibles dans la littérature (Cornet M *et al.*, 1974, Glick JJ, 1990, Cornet M and Brunhes J, 1994, Garcia-Saenz A *et al.*, 2011). Les caractères morphologiques utilisables pour l'identification des espèces du genre *Culicoides* sont très nombreux et leur importance varie selon les groupes.

Les caractères importants sont les suivants :

- La tête

Les yeux peuvent être pubescents ou non, contigus ou séparés ; les palpes avec 5 articles (PI-PV) dont le 3^{ème} (PIII) est un organe sensoriel présentant deux types (diffus et convergent) ; les antennes présentant 15 articles (I-XV), sont un critère de mensuration très utile. Les pièces buccales sont de type piqueur avec la présence de petites dents sur les mandibules et les maxilles. Les palpes maxillaires, constitués de 5 articles, présentent des fossettes sensorielles au niveau du troisième article.

- Le thorax

La coloration du thorax est à noter, chaque fois que cela est possible.

- Les ailes

La coloration, la nervation et les phanères sont essentiels et souvent déterminants. Un des caractères les plus utilisés dans cette étude est celui alaire.

- L'abdomen

Son principal intérêt est la présence des armatures génitales femelles et mâles.

II.1.2.2.2. Identifications par MALDI-TOF MS

II.1.2.2.2.1. Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique ancienne largement utilisée dans les laboratoires de chimie ou de physique pour la caractérisation de molécules. La technique a été mise au point depuis le début du XX^{ème} siècle (Aston, 1919). Elle permet d'effectuer une mesure de masse, en phase gazeuse, d'éléments ionisés. Cette technique est pratiquée en biologie et en analyse protéomique à la fin des années 1980, avec la mise en place de nouvelles techniques d'ionisation : la source *Electrospray* (ESI) (Fenn *et al.*, 1989) et la

source *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) (Tanaka *et al.*, 1988). Les travaux de ces derniers ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 2002. De nos jours, la technique est devenue la méthode de choix pour l'analyse des biomolécules (peptides, protéines, sucres, polymères, macromolécules etc.). Suite à l'enrichissement des bases de données coordonnées par les constructeurs, la technique est actuellement utilisée dans les laboratoires d'entomologie médicale. Un spectromètre de masse est constitué de différentes parties: une source d'ions (ESI, MALDI), un analyseur qui sépare les ions selon leur rapport masse/charge (m/z) et un détecteur qui capte l'intensité des ions (**figure 18**).

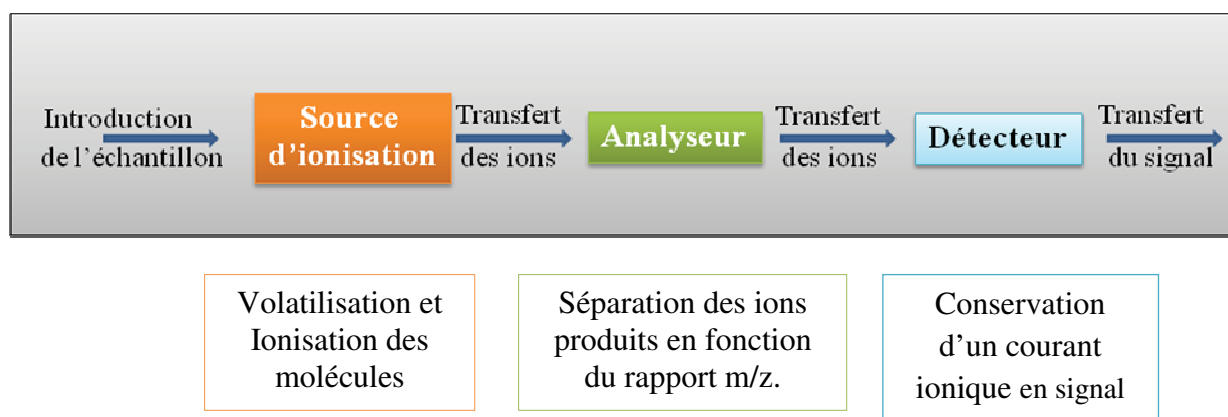


Figure 18 : Schéma du principe d'un spectromètre de masse

La variante MALDI-TOF reposant sur une source MALDI et un analyseur TOF utilisée dans le cadre de notre thèse sera détaillée (**figure 19**).

❖ La source d'ionisation (MALDI) (**figure 20**)

La méthode d'ionisation MALDI, est introduite en 1988 par Karas et Hillenkamp, permettant d'analyser des molécules de hautes masses moléculaires (peptides, protéines, oligonucléotides) (Roepstorff, 2000). La source MALDI a été développée à la fin des années 1980 par Karas et Hillenkamp. Cette technique d'ionisation a rapidement montré la possibilité d'analyser des molécules de masse moléculaire supérieure à 10 kDa (Karas and Hillenkamp, 1988; Tanaka *et al.*, 1988). Une co-cristallisation de l'échantillon avec une petite molécule organique, la « matrice », est préalable pour ce mode d'ionisation. Le dépôt cristallin est ensuite éclaté, sous vide, par des impulsions laser brèves de longueur d'onde correspondante à la longueur d'onde d'absorption de la matrice. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice, et cet apport d'énergie provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillons. Lors de la relaxation, la matrice est éjectée par de petites quantités (désorption) en entraînant des molécules d'ions. L'échantillon ionisé avec la matrice

forme des ions mono ou multichargés. Dans la source MALDI, les ions formés, majoritairement mono-chargés, sont accélérés jusqu'à l'analyseur. L'analyseur du temps de vol, adapté à l'ionisation par désorption laser, est en général couplé à la source MALDI.

La matrice est un élément primordial à l'ionisation des molécules et elle est constituée d'un composé organique et acide. Elle évite une dégradation importante de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du laser incident (Arcache *et al.*, 2003). Il existe plusieurs matrices (Beavis and Chait, 1989; Strupat *et al.*, 1991; Beavis *et al.*, 1992) dont le choix dépend de la classe de molécule à analyser. Dans le cadre de cette thèse, la matrice « α -cyano-4-hydroxycinnamic acid » ou acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -HCCA) est utilisée pour l'analyse des peptides et des protéines.

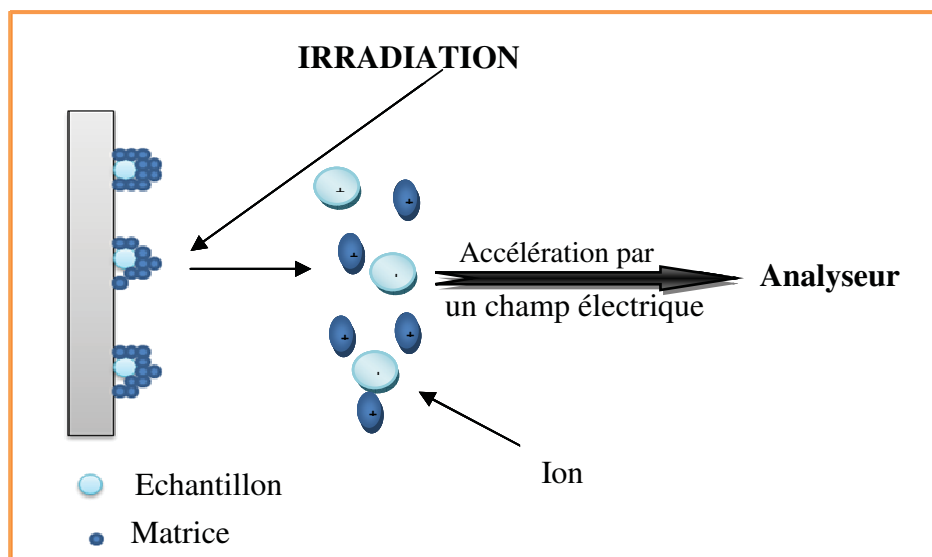


Figure 20 : Schéma du principe de la source d'ionisation MALDI.

❖ L'analyseur temps de vol de masse

Le rôle de l'analyseur dans un spectromètre de masse est de séparer les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Il joue un rôle capital dans un spectromètre de masse et influe directement sur la qualité du résultat. Aebersold et Mann (2003), ont établi quelques paramètres définissant les performances d'un analyseur : sa résolution, précision de mesure de masse, gamme de masse, sensibilité et capacité à réaliser de la spectrométrie de masse. L'analyseur temps de vol ou *Time Of Flight* (TOF) a vu le jour dans les années 1940 et 1950 (Cameron and Eggers, 1948; Wolff and Stephens, 1953; Wiley and McLaren, 1955). L'analyseur TOF a connu son regain à la fin des années 1980 avec l'apparition de la source MALDI (Standing, 2000). Les ions parvenus dans l'analyseur à temps de vol (zone

d'accélération) sont séparés en fonction de leur vitesse. Tous les ions ayant le même rapport m/z possèdent la même énergie cinétique à l'entrée du tube de vol, donc la même vitesse, et arrivent au même instant au niveau du détecteur. Cependant, les ions ne sont pas formés au même endroit et au même instant au niveau de la source. Ainsi, les ions de même rapport m/z acquièrent une énergie cinétique différente dans la zone d'accélération et affichent une vitesse différente dans le tube de vol. Ceci va impacter également la résolution de l'analyseur. Pour remédier à ce problème, Colby et collaborateurs et Mamyrin, ont développé deux dispositifs : l'extraction retardée (Colby *et al.*, 1994) et le réflecteur (Mamyrin, 1994). Le premier met en œuvre l'utilisation d'une lentille entre la source MALDI et l'analyseur. Au niveau de cette lentille est développé un potentiel légèrement supérieur à celui de la cible. Cette différence de potentiel permet de ralentir la vitesse des ions formés. Ainsi, ces ions sont réunis et vont entrer dans le tube de vol au même instant (Colby *et al.*, 1994). Le second est composé d'électrodes circulaires situées à l'extrémité du tube sur lesquelles sont appliqués des potentiels croissants (Mamyrin, 1994). Ce dispositif permet d'orienter les ions vers le détecteur.

❖ Le détecteur

La détection des molécules ionisées est réalisée grâce à un multiplicateur d'électrons. Lorsque les ions traversent l'analyseur, ils doivent ensuite être détectés. Cette détection va dépendre des propriétés de l'ion : masse, charge, vitesse ou conformation. Il existe 2 types de détecteurs qui sont utilisés en spectrométrie de masse MALDI-TOF : multiplicateur à dynodes discrètes et multiplicateur à dynodes continues. Le principe d'un multiplicateur d'électrons réside sur la capacité d'une surface métallique à émettre des particules secondaires à la suite d'impacts par des particules énergétiques. Quand un composé ionisé entre dans un canal et percute sa paroi, il entraîne l'émission de plusieurs électrons qui sont accélérés par la tension de polarisation. Les électrons générés vont à leur tour percuter la paroi et provoquer d'autres électrons. Cependant, le nombre d'électrons secondaires générés et l'intensité du pic dépendent de l'importance de la quantité d'ions et du rapport m/z . Ainsi, les pics enregistrés sont représentés sous la forme d'un spectre, spécifique à l'échantillon. Le spectre de masse obtenu peut être alors comparé aux spectres de référence contenus dans la base de données SARAMISTM.

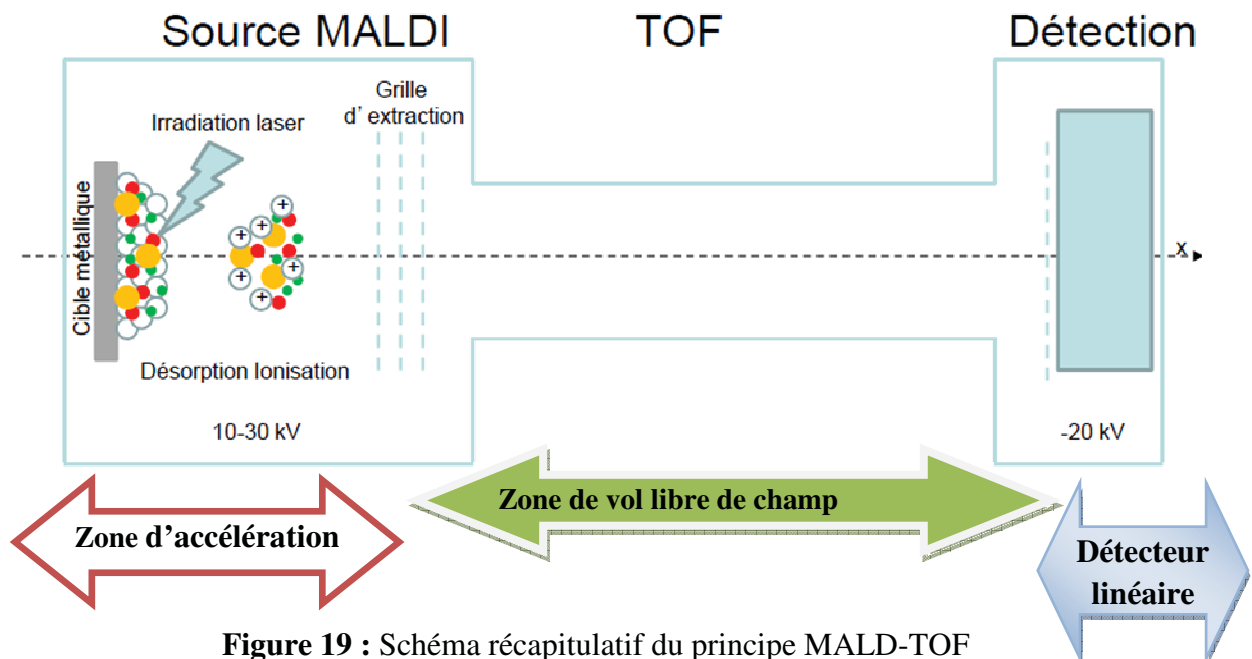


Figure 19 : Schéma récapitulatif du principe MALDI-TOF

II.1.2.2.2. Méthode d'identification

La méthode consiste à séparer l'abdomen du reste du corps de l'insecte identifié. Tête, thorax pattes et ailes sont utilisés pour les identifications au MALDI-TOF et l'abdomen pour la confirmation des identifications morphologiques par le séquençage. Pour chaque insecte, une photo de l'aile est dorénavant prise avec un microscope 'Dino-Lite Pro HR' (www.dino-lite.eu) (**Figure 21**).

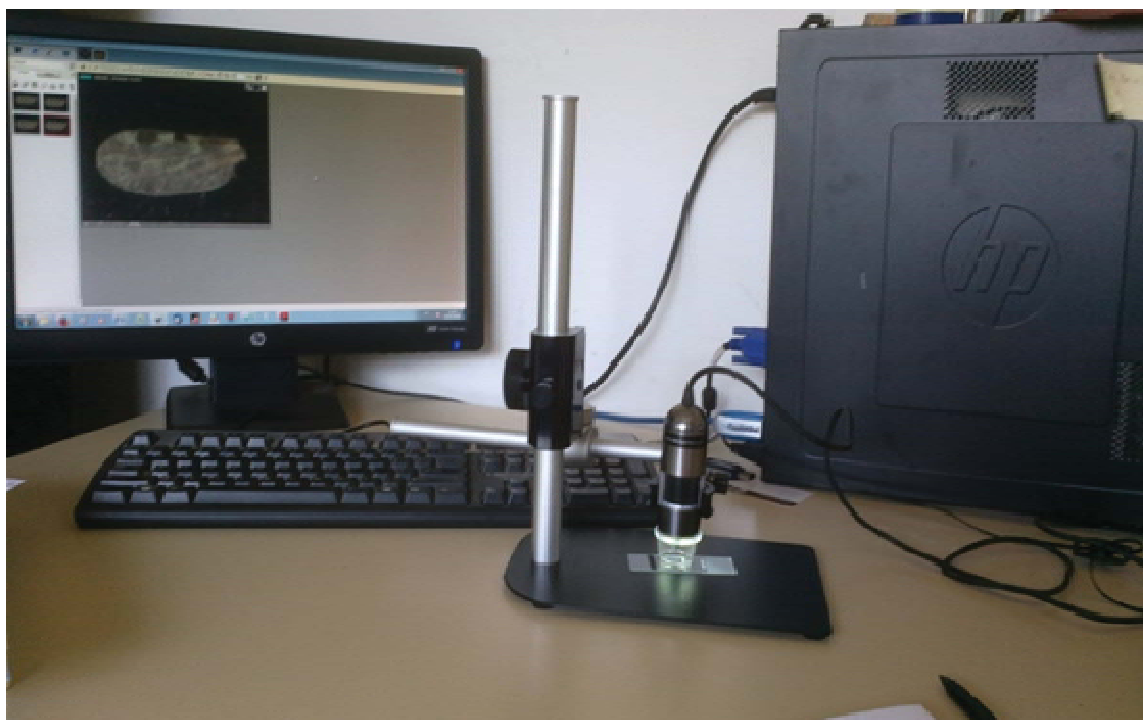


Figure 21 : Prise de photo d'aile de *Culicoides* par le Dino-Lite

a) Préparation des échantillons pour le MALDI-TOF MS

Après dissection, une partie du *Culicoides* (tête, thorax, pattes et ailes) est homogénéisée manuellement dans un tube eppendorf de 0,2 ml contenant 10 μ L de solution d'acide formique (10%), avec une anse. Un microlitre du broyat est déposé en duplicate sur les puits de la plaque matrice à l'aide d'une pipette (2 μ L). Ensuite, on ajoute 1 μ L de la matrice α -CCHA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic-acid) directement sur chaque dépôt. La plaque est laissée à sécher à température ambiante sous une hotte. La souche *Escherichia coli* ATCC8739 (Culture Collection Biomerieux SA, France) est utilisée pour contrôle qualité et calibration. Après séchage, la plaque est amenée à l'Hôpital Principal de Dakar (HPD), où elle sera placée dans le spectromètre pour la lecture. Les spectres ainsi obtenus sont analysés avec le logiciel SARAMIS (version 1).

b) Analyse des résultats

Les empreintes de masse des échantillons sont obtenues avec le Vitek MS Plus (BioMerieux) dont les spécifications sont décrites par Kaufmann et collaborateurs (2012a). La liste des spectres à pics représentatifs est importée dans le logiciel SARAMIS™ Premium

(figure 22). Un spectre représente une moyenne de 100 acquisitions correspondant chacune à un tir de laser sur différentes parties du spot. La qualité du spot influe donc directement sur la qualité du spectre obtenu. Les spectres ayant une intensité relative inférieure à 5% sont retirés de la liste.

acquisition time	name	sample	%	family	genus	species	typ	datacount	notes	Import Spectra	delete
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1511	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1512	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1513	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1514	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1515	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1516	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1517	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1518	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1519	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1520	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1521	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1522	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1523	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1524	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1525	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1526	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1527	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1528	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1529	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1530	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1531	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1532	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1533	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1534	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1535	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1536	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1537	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1538	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1539	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1540	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1541	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1542	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1543	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1544	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1545	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1546	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1547	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1548	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1549	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1550	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1551	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1552	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1553	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1554	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1555	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1556	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1557	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1558	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1559	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1560	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1561	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1562	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1563	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1564	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1565	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1566	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1567	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1568	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1569	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1570	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1571	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1572	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1573	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1574	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1575	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1576	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1577	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1578	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1579	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1580	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1581	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1582	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1583	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1584	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1585	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1586	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1587	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1588	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1589	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1590	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1591	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1592	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1593	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1594	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1595	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1596	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1597	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1598	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1599	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		
20 Mar 2014 15:08	HFD_000_0096_1600	ICM013-3	89.95	Carabogomidae	Carabogomus	Carabogomus		104	CHCA		

Figure 22 : Photo d'écran SARAMIS Premium

Pour la construction de dendrogrammes, le logiciel SARAMIS™ Premium est utilisé. Ainsi, conformément aux instructions du fabricant, nous pouvons comparer les différents spectres obtenus entre eux et définir s'ils appartiennent à une ou plusieurs espèces.

Une fois qu'une quantité suffisante de spectres d'une même espèce est enregistrée, il est possible de créer un spectre consensus, ou superspectre, grâce au logiciel SARAMIS superspectra. Il s'agit de ne conserver que les pics les plus déterminants pour une seule espèce, en épissant les pics les plus retenus parmi la totalité des échantillons testés. Une fois épissé, on compare le superspectre obtenu à la totalité de la base. S'il répond aux conditions requises, nous l'enregistrons dans la base de données comme superspectre de référence. Une fois activé dans la base, le superspectre peut directement identifier les spectres correspondant à ses critères et donner un pourcentage d'identification.

II.1.2.2.3. Culture et isolement

Les *Culicoides* identifiés sont désinfectés individuellement avec de l'eau de javel diluée au 1/20^{ième} et rincés avec du PBS. Un volume de 50 µL du broyat, est utilisé pour l'ensemencement sur gélose au sang (COS bioMérieux, Lyon, France) et incubé à 28°C. La lecture des cultures se fait toutes les 24 heures. Les isolats sont remis en culture pendant 24-48h à 28°C sur gélose au sang (COS bioMérieux, Lyon, France). Les souches seront analysées au MALDI-TOF Vitek MS. Une petite quantité de chaque colonie de culture est déposée en duplicate sur la plaque cible avec une anse a usage unique. Le dépôt est bien étalé avec l'anse et recouvert avec 1 µL de solution matrice α-HCCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic-acid); puis laissé sécher à température ambiante. Une souche d'*Escherichia coli* ATCC8739 (Culture Collection Biomerieux SA, France) est utilisée pour calibrer et pour le contrôle qualité. Les résultats sont analysés comme précédemment.

L'isolement des bactéries intracellulaires (rickettsies) est réalisé par la technique de centrifugation sur tubes bijoux pré-inoculés avec la lignée de cellules d'*Aedes albopictus*, lignée C6/36 (Horta *et al.*, 2006). Ces cellules sont cultivées sur du milieu Leibowitz-15 (L15) avec L-glutamine et L-amino-acides (Gibco, Gaithersburg, MD) additionné de 5% de sérum de veau fœtal (Gibco) et de 2% de tryptose phosphate (Gibco). Les cellules sont fixées au fond du tube bijou sur une petite lamelle en verre et forment un tapis cellulaire. La méthode consiste à vider le milieu L15 du tube bijoux contenant les cellules C6/36, puis ajouter 200 µL du broyat *Culicoides* et centrifuger pendant 1h à 4000 tours/minute. Après centrifugation, le surnageant est vidé, remplacé par 1ml de L15 avec antibiotiques (10 µL de Gentamicine et 20 µL de Bactrim) et incubées à 28°C. Chaque 3 jours, le surnageant est remplacé par du milieu de culture L15 frais et une coloration de Gimenez est réalisée. Lorsque la coloration de Gimenez permet de détecter des bactéries intracellulaires, le surnageant sera utilisé pour la détection de bactéries par amplification et séquençage du gène cible.

Pour la confirmation de nos identifications morphologique et MALDI-TOF, nous avons testé nos échantillons par biologie moléculaire (PCR et séquençage).

II.1.2.2.3. Biologie moléculaire (amplification PCR et séquençage)

II.1.2.2.3.1. Extraction d'ADN

L'étape de l'extraction de l'ADN analysable est cruciale. C'est d'elle que dépendent toutes les manipulations qu'il y aura en aval. Une extraction d'ADN de mauvaise qualité

pourra être à l'origine d'un résultat négatif du fait de la dégradation de l'ADN ou de présence d'inhibiteurs. De plus, la qualité de l'extraction a une influence majeure sur la sensibilité de la méthode d'analyse utilisée postérieurement. Le protocole de base utilisé est une modification de celui préparé par Vroh Bi et al. (1996) à partir de la méthode bromure de cetyltriméthyl ammonium (CTAB) de Murray & Thompson (1980), décrite par Chandellier (1995).

La méthode comprend trois étapes : une étape de lyse et de dénaturation des complexes nucléoprotéiques pour libérer l'ADN, une étape d'extraction proprement dite pour éliminer les protéines et enfin, une étape de précipitation pour purification de l'ADN.

Lyse : un système couramment utilisé, adaptable à tout type de spécimen, est le mélange de détergent-protéinase K qui dissocie les cellules, les tissus et libère les acides nucléiques. Le détergent utilisé dans le cadre de nos travaux est le CTAB qui est un agent de lyse cellulaire ainsi qu'un activateur de la protéinase K.

Extraction proprement dite : l'ADN contenu dans le lysat est séparé des protéines en appliquant la technique Chloroforme. L'addition du chloroforme à la phase aqueuse a pour effet de dénaturer les protéines en solution dans le milieu et d'éliminer les traces de composés organiques qui peuvent être des inhibiteurs de certains enzymes dont la Taq polymérase. Ainsi après une centrifugation et élimination de la phase organique, les acides nucléiques sont à l'état soluble dans la phase aqueuse.

Précipitation et purification de l'ADN : cette étape permet d'obtenir de l'ADN pur et concentré. La précipitation se fait à l'isopropanol. La purification se fait à l'éthanol 70% pour éliminer les sels. Le précipité est repris par du tampon à faible force ionique.

L'amplification par « polymérase chain reaction » (PCR)

La méthode d'amplification de séquences nucléiques par la « polymérase chain reaction », a été décrite par Mullis en 1983(Mullis *et al.*, 1986). La méthode fut une révolution. Deux types de PCR sont utilisés pour notre étude : PCR 'classique' et PCR en temps réel (qPCR)

II.1.2.2.3.2. Amplification par PCR classique

Principe

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire servant de matrice. L'initiation du processus nécessite l'association

d'amorces (petits segments de nucléotides). L'association de l'amorce à l'ADN à amplifier est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN à double brin. Le milieu réactionnel est constitué d'éléments indispensables : les précurseurs trinuécléotidiques (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), les ions Mg^{2+} , l'ADN polymérase et les amorces. L'ADN extrait du milieu biologique est ajouté à ce milieu réactionnel. La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes :

Etape 1 : Dénaturation thermique, consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogènes. Cette température de l'ordre de 95°C, est supérieure à la température de fusion (*melting temperature*, T_m) de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin dans le milieu. Ces brins serviront de matrice pour la synthèse du brin complémentaire.

Etape 2 : Hybridation des amorces (ou *annealing*), la température du milieu réactionnel est amenée à une température inférieure au T_m des amorces. Les amorces en large excès dans le milieu, s'hybrident à tout ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

Etape 3 : Extension ou élongation, une ADN polymérase allonge les amorces en y incorporant les dNTP complémentaires de la séquence matrice auquel elle est hybridée. L'élongation s'effectue dans le sens 5' → 3' à T_m 72°C, pour la plupart des ADN polymérases. A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

II.1.2.2.3.3. Amplification de gènes cible en temps réel (QPCR)

Principe

La technique de cette méthode d'amplification est fondée sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorophore dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la PCR. A l'inverse des techniques utilisant la PCR 'classique' dont les étapes d'amplifications et d'analyse du produit amplifié sont séparées, la PCR en temps réel est réalisée en une seule étape. Le développement et la commercialisation de nouvelles générations d'appareils ont grandement facilité ce procédé. Ces appareils permettent le suivi en temps réel de toutes les étapes de PCR : dénaturation, élongation et hybridation, et la détection du signal après traitement des données.

II.1.2.2.3.4. Séquençage (Sanger)

Principe

Le séquençage génétique est une technique déterminant l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. L'approche méthodologique de Sanger est une technique par synthèse enzymatique (ADN polymérase). La méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. La synthèse d'ADN par l'ADN polymérase est réalisée en présence des désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) auxquels sont mélangés des didéoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par quatre fluorochromes différents. Une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ces didéoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence. Le séquenceur sépare les fragments d'ADN obtenus selon leurs tailles par chromatographie et détecte la fluorescence. Une dernière étape de traitement bioinformatique permet alors la reconstruction d'un génome entier à partir de tous les fragments séquencés. Le séquenceur utilisé dans le cadre de nos travaux est Applied Biosystems (AB)/ HITACHI 3130X/ Genetic Analyser ABI PRISM, du laboratoire de l'Unité des Rickettsies à Marseille (**figure 23**).



Figure 23 : Applied Biosystems (AB)/ HITACHI 3130X/ Genetic Analyser ABI PRISM

II.1.2.2.3.5. Analyse des séquences

Les séquences obtenues sont corrigées en utilisant le logiciel ChromasPro (version 1.49 beta Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australia) (**figure 24**), éditées et alignées par BioEdit Sequence alignment editor v. 7.0.9.0. Ces séquences sont comparées à celles disponibles dans GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La construction d'arbres phylogéniques est réalisée par le logiciel Topali v2.5.

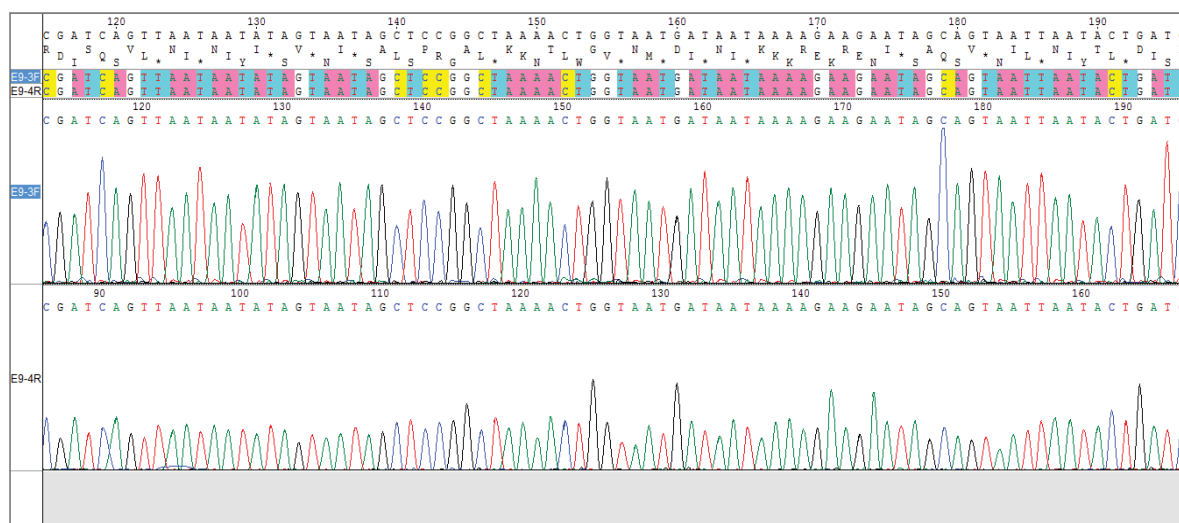


Figure 24 : Exemple de photo d'écran ChromasPro (version 1.49 beta Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australia)

II.1.2.2.4. Identification des espèces *Culicoides* par la biologie moléculaire

Après les études morphologiques et par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), nous avons procédé à des études moléculaires, puis à des analyses phylogénétiques pour confirmer et comparer les résultats obtenus. La méthode consiste à extraire la totalité de l'ADN à partir de l'abdomen des insectes dont le complexe « tête-thorax » a été utilisé pour l'identification MALDI. L'extraction a été faite avec l'appareil automatique EZ1 (Qiagen, Courtaboeuf, France), suivant les instructions du fabricant (EZ1 DNA tissue kit; Qiagen). L'amplification PCR a été réalisée en utilisant le couple d'amorces C1-J-1718-F et C1-N-2191-R (**Tableau 2**), qui amplifie environ 570 paires de bases (bp) du gène mitochondrial codant l'enzyme cytochrome oxydase I (COI) (Simon *et al.*, 1994). Le séquençage des produits PCR a été réalisé en utilisant le BigDye Terminator v.1.1 kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Les résultats du séquençage ont été purifiés avec du Sephadex G-10, 100 g (GELifeSciences-fr), puis analysés en utilisant le séquenceur ABI PRISM 3130X/genetic analyzer (Applied Biosystems; Life Technologies). Les séquences obtenues ont été corrigées avec le logiciel

ChromasPro, alignées avec le logiciel Bio Edit v.7.0.5.3 (Hall, 1999) et enfin comparées avec les séquences de *Culicoides* disponibles dans GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>).

II.1.2.2.5. Identifications des filaires par la biologie moléculaire

La recherche de filaire consistait à une extraction d'ADN du matériel biologique et une amplification en temps réel du gène d'ADN cible (ITS1). Nous avons désigné deux systèmes de PCR en temps réel (combinaison de deux amorces et une sonde Taqman) à la base de cet espace intergénique : un spécifique pour le genre *Mansonella* et un autre spécifique pour *Mansonella perstans* (**Tableau 3**). La spécificité et la sensibilité des deux systèmes ont été vérifiées : les deux sont spécifiques et n'amplifient pas l'ADN des autres macro- ou microorganismes non ciblés. De plus ces deux couples sont capables d'identifier la présence des filaires solitaires dans le prélèvement.

Pour caractériser les *Mansonella* spp. identifiées pendant cet étude nous avons procédé à l'analyse des séquences du gène codant l'ARN ribosomal 5S et l'espace intergénique ITS1 (entre les gènes codants de l'ARN ribosomal 18S et l'ARN ribosomal 5.8S). Nous avons utilisé les amorces ITS1 et 5S pour obtenir les amplicons à partir des prélèvements positifs pour le séquençage.

II.1.2.2.5.1. Etude rétrospective des lames de goutte épaisse

Les frottis sanguins ont été collectés dans le cadre des deux programmes menés par l'URMITE Dakar : l'identification des pathogènes émergents au Sénégal (N°00.87 MSP/DS/CNERS, June 02, 2010) et « Palu scolaire » (Malaria in schoolchildren -0000-91/MSP/DS/CNERS, June 03, 2010). Nous avons utilisé les lames colorées (Giemsa) et déjà examinées par les techniciens dans le cadre de ces projets pour effectuer la recherche des filaires de *Mansonella* spp.

Les lames ont été grattées avec un scalpel, recueillies dans un tube de type « eppendorf » (1,5ml). Le contenu est soumis à l'extraction d'ADN par la méthode cetyl trimethyl ammonium bromide à 2 % (CTAB). L'amplification en temps réel (qPCR) a été réalisée avec le thermocycleur BIO-RAD CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (**Figure 25**).

Les lames positives en qPCR à toutes *Mansonella*, sont ensuite testées pour la présence de *Mansonella perstans* avec le système spécifique (**Table 3**).

II.1.2.2.5.2. Recherche de filaires du genre *Mansonella* chez les *Culicoides*

L'identification de filaires chez les *Culicoides* consiste dans un premier temps à l'extraction d'ADN de *Culicoides* (CTAB 2%) décrite précédemment. La détection des

filaires du genre *Mansonella* est réalisée en utilisant les mêmes jeux d'amorces cités ci-dessus. Le programme de l'amplification comprend: une purification de l'ADN à 50°C pendant 2 minutes, une dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes et proprement dite à 95°C pendant 10 secondes et en fin une hybridation et extension des amorces à 60°C pendant 45 secondes.



Figure 25 : Photo du BIO-RAD CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (URMITE Dakar, 2015)

II.1.2.2.5.3. Analyse statistique

L'analyse des résultants a été réalisée en utilisant le logiciel Epi Info, version 7.0.8.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Une valeur de p -value $<0,05$ indique une différence statistique significative.

Tableau 3. : Les différents couples d'amorces utilisés pour l'amplification spécifique des organismes ciblés

Organismes ciblés	Séquences ciblées	Nom amorce	Nbre bases/amorce	Séquences (5'-3')
<i>Mansonella perstans</i>	ITS1	Manso_perstans ITS_r	22	CGA ATA TCA CCG TTA ATT CAG T
		Manso_perstans ITS_f	20	AGG ATC ATT AAC GAG CTT CC
		Manso_perstans ITS_p	24	6-FAM TTC ACT TTT ATT TAG CAA CAT GCA TAMRA
<i>Mansonella</i> spp.	ITS	Manso_sp ITS_r	20	ATC GAC GGT TTA GGC GAT AA
		Manso_sp ITS_f	20	CCT GCG GAA GGA TCA TTA AC
		Manso_sp ITS_p	21	6-FAM- CGG TGA TAT TCG TTG GTG TCT-TAMRA
<i>Coxiella burnetii</i>	IS1111	CbIS1111_r	21	CAC AGA GCC ACC GTA TGA ATC
		CbIS1111_f	21	CAA GAA ACG TAT CGC TGT GGC
		CbIS1111_p	24	6-FAM-CGG AGT TCG AAA CAA TGA GGG CTG-TAMRA
<i>Homo sapiens</i>	Actine	Actine_f	20	CAT GCC ATC CTG CGT CTG GA
		Actine_r	20	CCG TGG CCA TCT CTT GCT CG
		Actine_p	24	6-FAM-CGG GAA ATC GTG CGT GAC ATT AAG-TAMRA
<i>Rickettsia</i> spp.	gltA	RKND03_F	25	GTG AAT GAA AGA TTA CAC TAT TTA T
		RKND03_R	25	GTA TCT TAG CAA TCA TTC TAA TAG C
		RKND03_P	25	6FAM- CTA TTA TGC TTG CCG CTG TCG GTT C -TAMRA
<i>Rickettsia felis</i>	bioB	Rfelis_0527_F	20	ATG TTC GGG CTT CCG GTA TG
		Rfelis_0527_R	21	CCG ATT CAG CAG GTT CTT CAA
		Rfelis_0527_P	25	6FAM- GCT GCG GCG GTA TTT TAG GAA TGG G-TAMRA

Bartonella spp.	ITS	Barto ITS2 F2	18	GGG GCC GTA GCT CAG CTG
		Barto ITS2 R2	26	TGA ATA TAT CTT CTC TTC ACA ATT TC
		Barto ITS2 P	21	6FAM- CGA TCC CGT CCG GCT CCA CCA -TAMRA
Ehrlichia canis	glutaredoxin related proteine	Ehrcan_0701_F	22	TGA GGC CAT TAA AGA TTC ACA A
		Ehrcan_0701_R	25	TGAAGCTCTCCACTGTGGTACATTT
		Ehrcan_0701_P	23	6FAM- AGGTGAGTTTATTGGGTGCGACA-TAMRA
Anaplasma phagocytophilum	orf 1395	Anapha_1395_F	20	CAGAAGAACCAGGCGATA
		Anapha_1395_R	20	TCGACGTAGGTGAGCTGCAA
		Anapha_1395_P	25	6FAM- TGACCAAAGATGCACATGGTGCACA-TAMRA
Filaire	5s	D.rep-R1	24	ACG AGA TGT CGT GCT TTC AAC GTG
		D.rep-F1	24	TGT TTC GGC CTA GTG TTT CGA CCA
Filaires	ITS1	ITS1-F	20	GGT GAA CCT GCG GAA GGA TC
		ITS1-R	21	CTC AAT GCG TCT GCA ATT CGC
Culicoides	COI	C1-J-1718-F	24	AGG ATT TGG AAA TTG ATT AGT TCC
		C1-N-2191-R	24	CGG TAA AAT TAA AAT ATA AAC TTC

II.2. Résultats obtenus

Etude n°1 : Identification des *Culicoides* par Maldi-Tof et par Biologie Moléculaire

Introduction

Les moucheron piqueurs du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) sont impliqués dans la transmission de virus d'intérêt vétérinaire et médical à travers le monde. Ces virus sont responsables de crises sanitaires majeures avec des conséquences économiques importantes comme l'ont montré l'émergence du virus de la fièvre catarrhale (FCO) en Europe, les incursions épizootiques de la peste équine (AHS) sur la péninsule ibérique entre 1987 et 1990 (Balenghien and Delécolle, 2009) et l'apparition de foyers de peste équine identifiés en Afrique de l'Ouest (Bazarusanga, 1995). Au Sénégal, l'épizootie de la peste équine de 2007 entraînant une perte économique estimée à 1370000 euro (Akakpo *et al.*, 2011), souligne l'intérêt majeur de développer des activités de recherche pour mieux comprendre l'épidémiologie de ces maladies, mais aussi l'écologie des vecteurs et les relations hôte/vecteur/virus. Ceci permettra la mise en place de mesures de lutte anti-vectorielle efficaces et respectueuses de l'environnement. Aujourd'hui, les connaissances taxonomiques et bioécologiques disponibles sur les espèces de *Culicoides* présentes en région afro tropicale ne permettent pas d'identifier les vecteurs impliqués dans la transmission des pathogènes d'intérêt vétérinaire et médical.

L'identification fiable des espèces de *Culicoides* est une importante condition préalable à l'étude de leur présence et de leur rôle dans la transmission de pathogènes, d'autant plus que les espèces étroitement liées peuvent varier considérablement dans leur écologie. La détermination morphologique des espèces de *Culicoides* est fastidieuse (Goffredo and Meiswinkel, 2004; Meiswinkel *et al.*, 2008; Augot *et al.*, 2010) et nécessite une certaine expertise (Delécolle, 1985; Kaufmann *et al.*, 2012b). Cependant, l'identification morphologique des *Culicoides* cryptiques ou génétiquement proches et les variations au sein d'un groupe d'espèces reste toujours inachevée (Nolan *et al.*, 2007).

Les identifications moléculaires par PCR et par séquençage peuvent être une alternative à l'identification morphologique. Ces techniques sont relativement robustes et objectives pour la détermination des espèces avec une spécificité, une reproductibilité et une sensibilité élevée. Elles sont basées sur le séquençage et la comparaison phylogénétique de l'ADN

mitochondrial, dont le gène le plus utilisé est surtout le cytochrome oxydase (COI) (Linto *et al.*, 2002; Pagès and Monteys, 2005; Bakhoun *et al.*, 2013; Nolan *et al.*, 2007). Cependant, ces méthodes d'identification moléculaire sont laborieuses, très coûteuses, mais fiables. En plus des inconvénients techniques et logistiques, cette approche est en outre limitée par la disponibilité de séquences de gènes dans GenBank. Les espaces intergéniques (ITSI et ITSII) ont été également utilisées pour la détermination des *Culicoides* (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Meiswinkel *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2007), mais les résultats obtenus sont dans certains cas contradictoires.

En outre, des PCR multiplex et à temps réel ont été également développées pour permettre l'identification rapide des *Culicoides*, en particulier les groupes d'espèces cryptiques (femelles *C. obsoletus* et *C. scoticus*) difficiles à déterminer morphologiquement (Mathieu *et al.*, 2007; Balczun *et al.*, 2009; Stephan *et al.*, 2009; Wenk *et al.*, 2012; Nolan *et al.*, 2007). Seuls quelques tests sont commercialisés pour l'identification rapide de *Culicoides* spécifiques, améliorant les stratégies d'identification en biologie moléculaire. Mais le coût de ces tests et parfois, la charge de travail, restent élevés et représentent des facteurs limitant pour leur utilisation dans les laboratoires d'entomologie médicale et vétérinaire.

En somme, le coût élevé et le haut niveau d'expertise technique requise font de la biologie moléculaire une technique actuellement inappropriée à l'identification de routine. Ainsi, le développement d'un outil alternatif rapide qui permet d'identifier correctement les espèces de *Culicoides* est nécessaire.

Une nouvelle approche d'identification des *Culicoides*, par 'Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight' (MALDI-TOF) 'Mass Spectrometry' (MS), établie par Kaufmann et collaborateurs (Kaufmann *et al.*, 2011; 2012a; 2012b), offre de nouvelles perspectives à la caractérisation des espèces du genre *Culicoides* Latreille. Cette méthode alternative à la technique d'identification moléculaire pour la détermination rapide, fiable et peu coûteuse, des *Culicoides*, par la détection des peptides et des protéines par MALDI -TOF a émergé au cours de la dernière décennie.

L'objectif de cette étude est de mener une étude prospective de la spectrométrie de masse par la variante MALDI-TOF chez les *Culicoides* Latreille dans la région afro-tropicale en particulier le Sénégal. La méthode morphologique est notre gold standard et, la biologie moléculaire (séquençage) est utilisée pour confirmer les deux premières méthodes pour les

Culicoides dont les séquences sont disponibles dans GenBank. Une comparaison des techniques moléculaires et de la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été réalisée.

Les résultats de cette étude sont valorisés dans la revue scientifique « ***Journal of Clinical Microbiology*** ».

Résumé de l'étude n°1

Les moucheron du genre du *Culicoides* sont impliqués dans la transmission de divers pathogènes. L'identification morphologique de ces insectes est fastidieuse en raison de leur minuscule taille, du manque de données disponibles et d'outils fiables et rapides en Afrique. Le niveau spécifique est mieux supporté lorsque l'étude se base sur plusieurs types de données plutôt que sur un seul. Cependant, la spectrométrie de masse par sa variante MALDI-TOF est un outil alternatif efficace pour la détermination des espèces d'arthropodes. Cette étude utilise la spectrométrie de masse en combinaison avec les approches moléculaires et morphologiques (gold standard) pour établir une base de données spectrales des espèces de *Culicoides* collectées au Sénégal. La base des spectres de référence MALDI-TOF MS a été établie avec 437 spécimens de *Culicoides* appartenant à 10 espèces capturées sur le terrain. Les profils protéiques de tous les *Culicoides* testés ont révélé plusieurs pics avec des masses moléculaires comprises entre 2 à 20 kDa. Pour la validation de l'étude, 76 spécimens de *Culicoides* identifiés morphologiquement, ont été utilisés pour un test aveugle au MALDI-TOF, puis étudiés en biologie moléculaire. Parmi les 76 spécimens de *Culicoides* testés, 72 individus ont été correctement identifiés jusqu'au niveau de l'espèce, avec une similarité comprise entre 95 et 99,9 %. Seulement 3 spécimens ont été mal identifiés par le MALDI-TOF en comparaison avec l'analyse moléculaire. 4 individus identifiés au MALDI-TOF étaient discordants avec les identifications morphologiques et un spécimen mal identifié par la morphologie en comparaison avec les identifications moléculaires. Cependant 6 SuperSpectres de *C. imicola*, *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. kingi*, *C. magnus* et *C. fulvithorax* ont été créés, validés et activés dans la base SARAMISTM *Culicoides*. Le séquençage de l'abdomen des 76 spécimens de *Culicoides*, a été réalisé en utilisant le gène du cytochrome oxydase I (COI) de l'ADN mitochondrial. Les résultats obtenus en utilisant l'outil MALDI-TOF MS étaient compatibles avec l'identification morphologique et similaire à l'identification génétique. Le MALDI-TOF est une approche efficace pour l'identification des *Culicoides* spp. La méthode est économiquement avantageuse pour les études qui nécessitent des informations détaillées et quantitatives des espèces de vecteurs collectés sur le terrain. La base de données SARAMISTM *Culicoides* nouvellement créée pour la faune culicoidienne Sénégalaise est une première en Afrique. Les séquences (COI) des cinq espèces de *Culicoides* qui étaient auparavant non caractérisées en utilisant des méthodes moléculaires, sont dorénavant déposées dans GenBank.

Comparison of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and Molecular Biology Techniques for Identification of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Biting Midges in Senegal

Masse Sambou,^{a,d} Maxence Aubadie-Ladrix,^a Florence Fenollar,^a Becaye Fall,^b Hubert Bassene,^a Lionel Almeras,^a Bissoume Sambe-Ba,^d Nadine Perrot,^c Sonia Chatellier,^c Ngor Faye,^d Philippe Parola,^a Boubacar Wade,^b Didier Raoult,^a Oleg Mediannikov^a

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France, and Dakar, Senegal^a; Hôpital Principal, Dakar, Senegal^b; bioMérieux, La Balme-Les-Grottes, France^c; UCAD, Dakar, Senegal^d

Biting midges of the genus *Culicoides* are implicated as vectors for a wide variety of pathogens. The morphological identification of these arthropods may be difficult because of a lack of detailed investigation of taxonomy for this species in Africa. However, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) profiling is efficient for arthropod identification at the species level. This study established a spectrum database of *Culicoides* spp. from Senegal using MALDI-TOF. Identification of *Culicoides* insects to the species level before mass spectrometry was performed on the basis of morphological characters. MALDI-TOF MS reference spectra were determined for 437 field-caught *Culicoides* of 10 species. The protein profiles of all tested *Culicoides* revealed several peaks with mass ranges of 2 to 20 kDa. In a validation study, 72 *Culicoides* specimens in the target species were correctly identified at the species level with a similarity of 95 to 99.9%. Four *Culicoides* protein profiles were misidentified. Nevertheless, six SuperSpectra (*C. imicola*, *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. kingi*, *C. magnus*, and *C. fulvithorax*) were created. Abdomens of midges were used to amplify and sequence a portion of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI). The results obtained using the MALDI-TOF MS method were consistent with the morphological identification and similar to the genetic identification. Protein profiling using MALDI-TOF is an efficient approach for the identification of *Culicoides* spp., and it is economically advantageous for approaches that require detailed and quantitative information of vector species that are collected in field. The database of African *Culicoides* MS spectra created is the first database in Africa. The COI sequences of five *Culicoides* species that were previously noncharacterized using molecular methods were deposited in GenBank.

Biting midges of the genus *Culicoides* are among the smallest hematophagous insects, and they can be a nuisance to humans and animals (1). These insects are implicated as vectors for a wide variety of viruses, such as bluetongue virus (2), African horse sickness virus (3), epizootic hemorrhagic disease virus (4), the Schmallenberg virus that recently emerged in Europe (5–7), Toggenburg orbivirus (8), and the Oropouche virus (9), which is the only human virus transmitted by *Culicoides*. Additionally, biting midges are involved in the transmission of various human filarial parasites, such as *Mansonella perstans* (10–13), *Mansonella streptocerca*, *Mansonella ozzardi*, and *Mansonella rodhaini* (14). Recently, *Leishmania* spp. and *Leishmania infantum* were detected in *Culicoides imicola* and *Culicoides* spp. (15).

Vector identification is an important step in the epidemiology of vector-borne diseases. Information on the major vector species may provide a clearer indication of the geographic distribution of the disease or its potential distribution, the location of danger points for high risks of contact with the vector, and access to alternative tools for the study of the natural cycles of parasites. A comprehensive key to all of the species within a genus in any particular faunal region is a useful, primary tool for taxonomists (16). However, identification of the *Culicoides* species is challenging because the morphological identification of these tiny insects to the species level is very difficult in many cases (17, 18). Identification requires time-consuming mi-

croscopic analyses of slide-mounted insect preparations (19). The scarcity of data on *Culicoides* taxonomy in Western Africa also complicates identification. Several PCR-based tests were developed for the identification of *Culicoides* spp., and these tests target the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) or the rRNA genes, internal transcribed spacer 1 (ITS-1) or 2 (20–26).

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was tested for 2 decades as an alternative method for microorganism identification. This ap-

Received 1 July 2014 Returned for modification 4 August 2014

Accepted 1 November 2014

Accepted manuscript posted online 19 November 2014

Citation Sambou M, Aubadie-Ladrix M, Fenollar F, Fall B, Bassene H, Almeras L, Sambe-Ba B, Perrot N, Chatellier S, Faye N, Parola P, Wade B, Raoult D, Mediannikov O. 2015. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for identification of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. J Clin Microbiol 53:410–418. doi:10.1128/JCM.01855-14.

Editor: E. Munson

Address correspondence to Oleg Mediannikov, oleguss1@gmail.com.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.01855-14



FIG 1 Map of the villages where *Culicoides* spp. were collected during the study. In the Sine-Saloum, inspected villages were Dielmo, Ndiop, Toubacouta, Sourou, and Nema Bah; in Casamance, Mlomp, Kagnoute, and Elinkine were inspected; and in Kédougou, Bandafassi, Mbaning, Ibel, and Tiabéji were inspected.

proach has developed for the high-throughput, accurate, and reproducible identification of clinically relevant microorganisms (bacteria, yeasts, and filamentous fungi) at a low cost with minimal preparation time (27–32).

Additionally, this proteomic approach has been used for the identification of metazoans, such as fish species (33), plants (lentil varieties) (34), ticks (35, 36), and insects, such as *Drosophila* fruit flies (37, 38) and mosquitoes (39, 40).

Recently, similar studies demonstrated the suitability of MALDI-TOF MS analysis for the characterization of *Culicoides* flies (3, 41, 42) in Europe. Therefore, molecular and MALDI-TOF approaches are promising techniques for the elucidation of relationships within species and between closely related species.

The present study investigated the ability of MALDI-TOF MS to consistently characterize biting midges of the *Culicoides* genus

in Africa and established a baseline taxonomy based on mass spectrometry.

MATERIALS AND METHODS

Insect collection. Insects were collected using a modified CDC light trap (43). Briefly, tulle net pockets were replaced by pocket sails of terylene, which traps tiny insects. Specimens were collected in three regions of Senegal (Fig. 1): Kédougou, a vast region of southeastern Senegal surrounded by large hills; Sine-Saloum, a region in the northwestern part of the Gambia basin; and Lower Casamance (Oussouye department), a region in the southwestern part of Senegal (Table 1). Traps were placed in different habitats, which resulted in important variations in their qualitative and quantitative performance. The majority of captured specimens were female. Irregularities in catching made it very difficult to assess seasonal variations.

TABLE 1 Villages where *Culicoides* spp. were collected during this study

Study site	Climate vegetation	Annual precipitation (mm)	Village	Coordinates
Sine-Saloum	Sudanian wooded savannah	939	Dielmo	13°43'N, 16°24'W
			Ndiop	13°41'N, 16°23'W
			Toubacouta	13°47'N, 16°28'W
			Sourou	13°45'N, 16°28'W
			Nema Bah	13°44'N, 16°28'W
Basse Casamance	Sub-Guinean/primary and secondary gallery forest	1,432	Mlomp	12°32'N, 16°34'W
			Kagnoute	12°33'N, 13°34'W
			Elinkine	12°30'N, 16°39'W
			Bandafassi	12°32'N, 12°18'W
Kédougou	Sudano-guinean/woodland, wooded savannah	1,189	Ibel	12°30'N, 12°22'W
			Tiabéji	12°38'N, 12°27'W
			Mbaning	12°31'N, 12°27'W

Morphological identification. *Culicoides* spp. were separated from other insects using a stereomicroscope and sorted on the basis of wing morphology into the groups of *C. schultzei*, *C. imicola*, *C. magnus*, *C. milnei*, and other *Culicoides* spp. (44, 45). Species were identified using microscopic analyses of wing patterns and the observation of different body parts (head, legs, and wing) (44–46). Insects were stored individually at -80°C after identification for further DNA and mass spectrometry analyses.

Sample preparation for MALDI-TOF MS. Abdomens of *Culicoides* specimens were removed for further molecular studies after dissection using a stereomicroscope, and the remaining parts were individually transferred to 0.2-ml tubes. The remaining parts were triturated in 10 μl of 10% formic acid using a manual homogenizer with disposable inoculation loops. One microliter of the homogenate was spotted in duplicate onto a steel target plate. Additionally, 1 μl of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix was added directly to the spots and air dried at room temperature. Control experiments and calibration were performed using an *Escherichia coli* reference strain (LyfoCults *E. coli* ATCC 8739; bioMérieux). Plates were submitted for MALDI-TOF MS analysis after air drying.

MALDI-TOF MS analysis. Protein profiles were obtained using MALDI-TOF Vitek mass spectrometry (Vitek MS RUO system; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at the Principal Hospital of Dakar. The resulting profiles were analyzed using SARAMIS Premium software, v.4.0.0.14. Potential species-specific biomarker mass patterns, called SuperSpectra, were calculated using the SARAMIS SuperSpectra tool. Therefore, peak lists of representative isolates were imported into SARAMIS Premium software. Peak lists were trimmed to a mass range of 2 to 20 kDa, and peaks with a relative intensity of $<5\%$ were removed. Peak lists were binned, and average masses were calculated using the SARAMIS SuperSpectra tool.

We used the SARAMIS Premium software package to create an MS species-based dendrogram. The dendrogram was based on the entire spectra of *Culicoides* spp. that were collected during this study. The threshold for identification was set at 75% of biomarker matches based on the reference data set in accordance with SARAMIS Premium user guidelines.

A binary mass list was calculated with an error of 800 ppm, and the SARAMIS single-link clustering algorithm was applied.

Extraction of DNA and PCR amplification. Mechanical separation of the abdomens of biting midges was performed under a stereomicroscope using fine forceps, disposable petri dishes, needles, and razor blades. Disposable instruments were washed in 70% ethanol between specimens of the same species and discarded after each species was treated.

The abdomen of each biting midge was placed in a 1.5-ml tube that contained 100 μl of lysis buffer G2 (30 mM Tris Cl, 30 mM EDTA, 5% Tween 20, 0.5% Triton X-100, and 800 mM guanidine hydrochloride [GuHCl]) and 20 μl of proteinase K (activity equal to 600 milliabsorbance units [mAU]/ml solution or 40 mAU/mg of protein). The homogenate was digested in a heating block for 1 h or overnight at 56°C . Total abdominal DNA was extracted using EZ1 (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions (EZ1 DNA tissue kit; Qiagen). DNA was eluted in 100 μl and stored at -20°C until further use.

Molecular analyses of biting midges were conducted using primers C1-J-1718-F and C1-N-2191-R (47), which amplify approximately 520 bp of the COI gene. PCR consisted of an initial heating phase at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 30 s), annealing (50°C for 30 s), and elongation (72°C for 1 min) and a final elongation step (72°C for 10 min). Negative controls were used to detect possible contamination, and positive controls ensured appropriate amplification conditions. All amplifications were made in a total reaction volume of 25 μl , which included 2.5 μl of PCR $10\times$ buffer, 0.75 μl of MgCl_2 (25 mM), 2.5 μl of deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (20 mM), 0.5 μl of each primer, 0.1 μl of HotStarTaq DNA polymerase (5 units/ μl), 15.15 μl of distilled water, and 5.0 μl of the DNA template. PCR products were

TABLE 2 *Culicoides* species COI sequences used for phylogenetic analyses^a

Species	GenBank accession no.	Geographical origin
<i>C. enderleini</i>	KF186430, KF186429, KF186431	Madagascar
<i>C. enderleini</i>	HQ447066, HQ447065	Reunion Island
<i>C. schultzei</i> group	JN545050, JN545051	Israel
<i>C. nevillei</i>	KF186428	Madagascar
<i>C. oxystoma</i>	JN545048, JN545047	Israel
<i>C. oxystoma</i>	KF528692, KF528693	China
<i>C. oxystoma</i>	AB360985	Japan
<i>C. sonorensis</i>	JF870510	United States
<i>C. obsoletus</i>	JA620142	Sweden
<i>C. loxodontis</i>	AF069235, AF069234	South Africa
<i>C. pseudopallidipennis</i>	AY286329	Cote d'Ivoire
<i>C. imicola</i>	AF080597	Israel
<i>C. imicola</i>	HQ447069	Reunion Island
<i>C. imicola</i>	AF069233	South Africa
<i>C. imicola</i>	AF080539	Spain
<i>C. imicola</i>	HQ824456	France
<i>C. imicola</i>	AJ549415, AF079977	Portugal
<i>C. imicola</i>	EU189057	Algeria

^a Sequences from GenBank for 26 *Culicoides* spp. are shown.

loaded onto a 1.5% agarose gel stained with GelRed and scanned to assess amplifications.

Sequencing and molecular data analysis. PCR products that displayed positive bands on gels were sequenced using a forward primer and a reverse primer and the BigDye Terminator v.1.1 kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Products were purified and analyzed using an ABI PRISM 3130X/genetic analyzer (Applied Biosystems; Life Technologies). Sequences were analyzed using BLAST sequencing and compared with the available *Culicoides* sequences in GenBank.

Sequence editing and analyses were performed using BioEdit sequence alignment editor (v.7.0.5.3) (48).

A phylogenetic tree was created using the Bayesian phylogenetic analysis (49) in TOPALi 2.5 software (Biomathematics and Statistics Scotland, Edinburgh, United Kingdom) within the integrated MrBayes application (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>) using the sequences that were obtained during this study and additional COI sequences of *Culicoides imicola*, *Culicoides oxystoma*, *Culicoides schultzei* group spp., *Culicoides obsoletus*, *Culicoides sonorensis*, *Culicoides loxodontis*, and *Culicoides pseudopallidipennis* from GenBank (Table 2). The number of identical sequences is shown next to the species name, but only unique sequences were used in the tree.

Nucleotide sequence accession numbers. All COI sequences obtained were deposited in GenBank under the following accession numbers: KJ833678 to KJ833717 and KP025627 to KP025651.

RESULTS

Morphological identification. Morphological analyses of 437 individuals from 3 collection sites revealed the presence of 10 species that belonged to the following groups: *C. imicola* (*C. imicola*), *C. schultzei* (*C. enderleini*, *C. kingi*, *C. oxystoma* and *C. nevillei*), *C. milnei* (*C. milnei*, *C. wansonii*, and *C. moreli*), *C. magnus*, and *C. fulvithorax* (Fig. 2). Several damaged and unidentifiable samples were excluded from the study. Wing characterization is unique for each species, but slight variations in wing patterns between individuals within a species were frequently observed. *C. moreli* and *C. milnei* were collected only at the Sine-Saloum site, and *C. kingi* was collected more frequently at the Kédougou site. The other species were abundant and equally present at the 3 sampled sites.

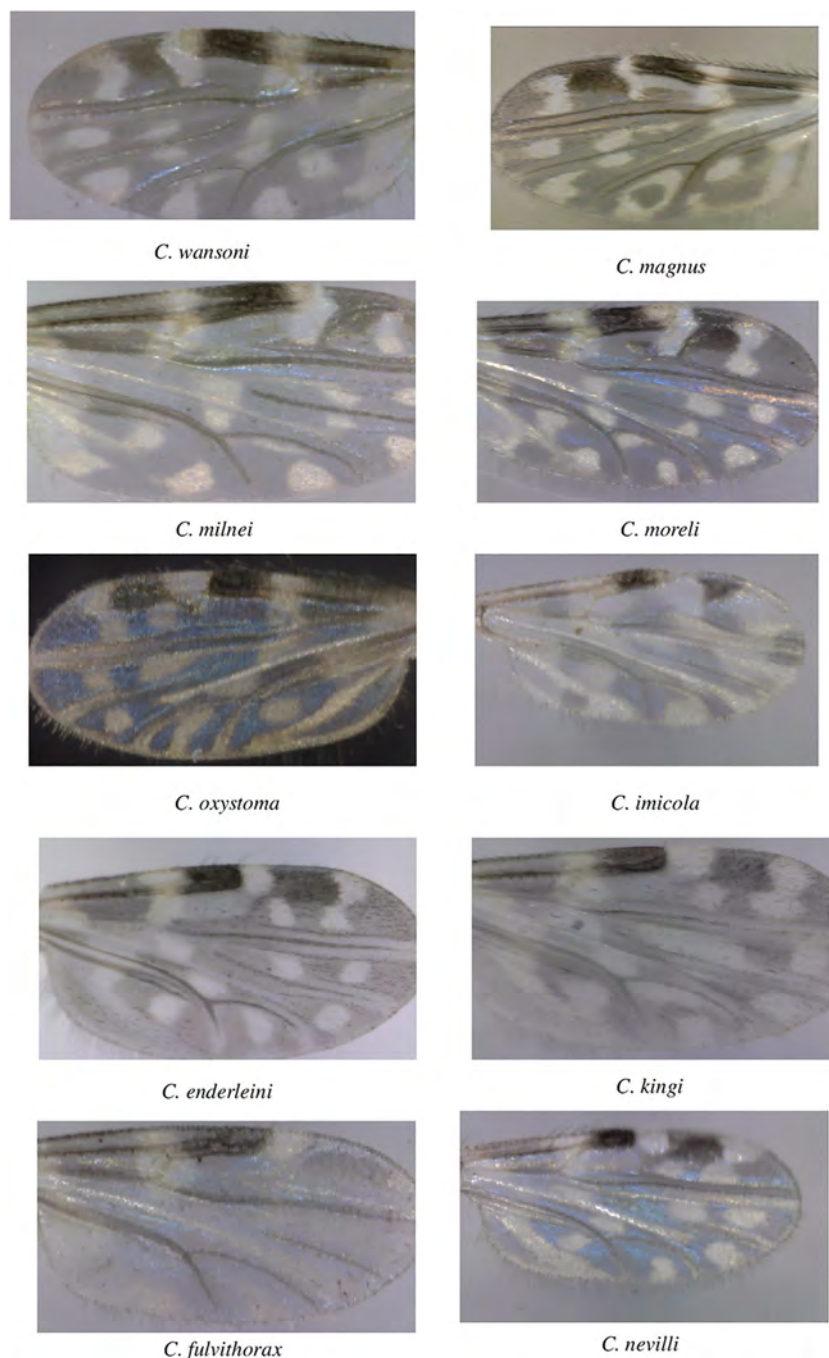


FIG 2 Photographs of wings of slide-mounted representatives of *Culicoides* specimens viewed under a light microscope. The same individuals were used for molecular and MALDI-TOF identification.

Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Culicoides* species based on the COI gene. A total of 150 morphologically identified randomly selected *Culicoides* specimens representing all 10 species were subjected to specific PCR using the COI primers. A total of 68 randomly selected amplicons that represented all studied species were sequenced. BLAST searches (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) of *C. imicola*, *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. nevillei*, and *C. kingi* were almost identical (98 to 100%) to the sequences that were already deposited in GenBank

(*C. imicola*, *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. nevillei*, and *C. schultzei* groups). Sequences of *C. milnei*, *C. wansoni*, *C. moreli*, *C. magnus*, and *C. fulvithorax* were not available in GenBank before our study, and the closest identity of the obtained sequences of these species was approximately 80 to 89% with different Diptera species. Altogether, the identification of African biting midges using molecular methods was hardly possible because of the insufficient number of deposited sequences of the COI gene in GenBank.

The phylogenetic tree (Fig. 3) revealed that the 31 individual

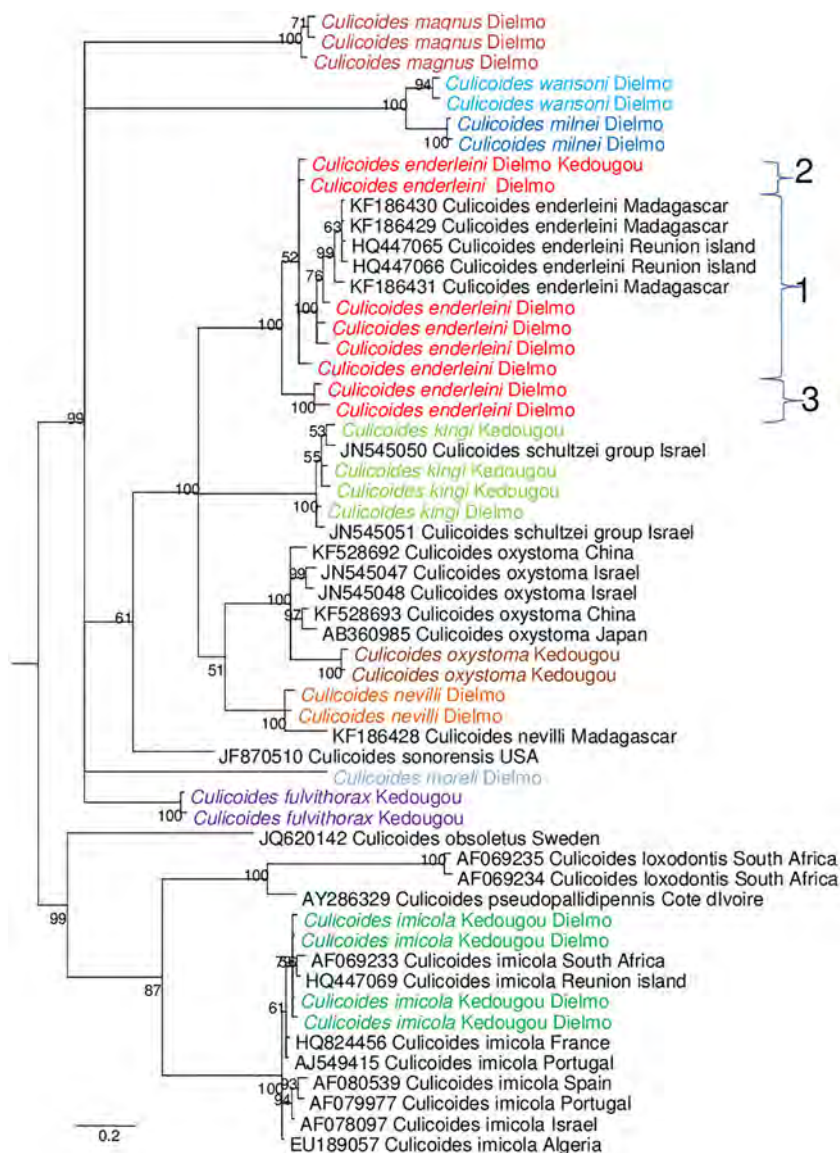


FIG 3 A consensus phylogenetic tree showing the relationships of the studied species of *Culicoides* based on COI sequence comparisons. GenBank accession numbers are indicated. The sequences were aligned using ClustalW, and phylogenetic inferences were obtained using Bayesian phylogenetic analysis with TOPALi 2.5 software (Biomathematics and Statistics Scotland, Edinburgh, UK) within the integrated MrBayes application using the SYM+Γ, JC, and SYM+Γ substitution models for the first, second, and third codons, respectively. Numbers at the nodes are percentages of bootstrap values obtained by repeating the analysis 100 times to generate a majority consensus tree. The final set includes 471 bp. The scale bar represents a 2% nucleotide sequence divergence. Numbers 1, 2, and 3 indicate genetic groups of *C. enderleini*.

midges that were identified morphologically as *C. enderleini* split into 3 different well-defined and well-supported genetic groups with high homogeneity inside of the groups. One genetic group consisted of midges that were collected in Dielmo (Sine-Saloum region), and the *C. enderleini* sequences obtained from GenBank. The second genetic group consisted of midges that were collected from Dielmo and Kédougou. The third genetic group consisted of midges collected from Dielmo. The sequences of *C. imicola* obtained were closely related to the published sequences of *C. imicola* worldwide. The COI gene sequences from the *C. wansonii* specimens were grouped with *C. milnei* in a separate branch. *C. oxiostoma* from Kédougou formed a sister clade to *C. oxiostoma* from Japan, China, and Israel. *C. kingi* from Kédougou and Dielmo

were almost identical to the deposited sequences of the *C. schultzei* group from Israel (Fig. 3).

MALDI-TOF MS analysis. (i) Creating a reference database of biomarker masses. MALDI-TOF MS reference spectra were determined for 437 field-caught *Culicoides* biting midge species from Senegal, including *C. imicola* ($n = 52$), *C. enderleini* ($n = 130$), *C. oxiostoma* ($n = 115$), *C. nevillei* ($n = 22$), *C. kingi* ($n = 44$), *C. magnus* ($n = 22$), *C. wansonii* ($n = 23$), *C. milnei* ($n = 2$), *C. moreli* ($n = 1$), and *C. fulvithorax* ($n = 26$). Protein spectral profiles of all tested *Culicoides* species revealed several peaks with mass ranges of 2 to 20 kDa and high signal intensities. These protein spectral profiles were very similar between specimens of the same species. Profiles of specimens belonging to these biting

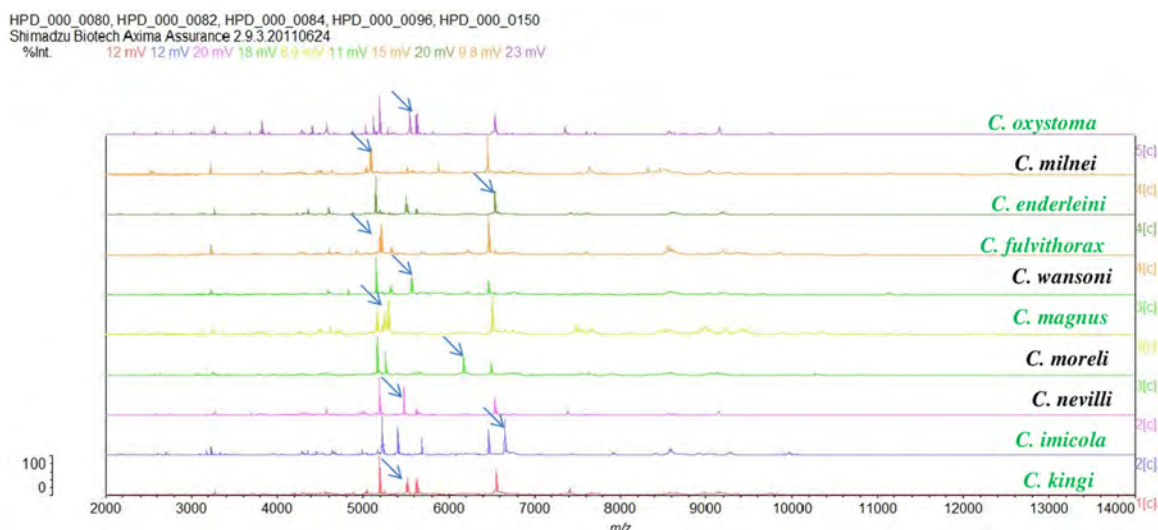


FIG 4 MALDI-TOF Vitek mass spectra in the range of 2 to 14 kDa of 10 field-caught *Culicoides* insects (*C. kingi*, *C. imicola*, *C. nevillei*, *C. moreli*, *C. magnus*, *C. wansoni*, *C. fulvithorax*, *C. enderleini*, *C. milnei*, and *C. oxystoma*). Six SuperSpectra (in green), *C. kingi*, *C. imicola*, *C. magnus*, *C. fulvithorax*, *C. enderleini*, and *C. oxystoma*, were created. The most remarkable specific peaks are indicated by the arrows.

midge species (*C. imicola*, *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. nevillei*, *C. kingi*, *C. magnus*, *C. wansoni*, *C. milnei*, *C. moreli*, and *C. fulvithorax*) are shown and ranged between 2 and 15 kDa (Fig. 4). The protein profiles of 1 to 5 specimens per species were used to compile the total mass spectra for these species. The resulting dendrogram revealed that all *Culicoides* specimens of the same species were clustered on distinct branches (Fig. 5). Additionally, six SuperSpectra were created for *C. imicola*, *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. kingi*, *C. magnus*, and *C. fulvithorax*.

(ii) Study validation. The accuracy of the *Culicoides* reference database was tested in a second step using a validation study. A total of 76 *Culicoides* specimens (*C. imicola*, $n = 15$; *C. enderleini*, $n = 19$; *C. kingi*, $n = 11$; *C. magnus*, $n = 7$; *C. fulvithorax*, $n = 8$; and *C. oxystoma*, $n = 16$) were blindly tested (i.e., the spectra obtained were tested using a created database). A comparison of all of these specimens in the database using Vitek MS software revealed satisfactory results (Table 3). Among the 72 specimens of biting midge species tested, the correct identification was achieved at the species level with a confidence index from 95 to 99.9% similarity. One *C. enderleini* and 3 *C. oxystoma* protein profiles were misidentified. *C. enderleini* was identified as *C. oxystoma* with an average of 99.99% similarity, and the 3 *C. oxystoma* were identified as *C. enderleini* with 98 to 99.90% similarity. Some of these *Culicoides* species were sequenced.

DISCUSSION

Mass spectrometry profiling generates and identifies molecules according to mass and charge. Mass spectrometry is used for numerous applications in different areas (50). Insect identification using MALDI-TOF MS is a novel entomological tool that has been utilized in only a few studies (3, 37, 38, 40, 51), including a very recent application for the identification of cryptic *Anopheles* mosquito species (39). Kaufmann et al. applied this proteomic approach to characterize a hematophagous *Culicoides* species from Europe (41). Additionally, Steinmann et al. (42) recently evaluated this technique for the identification of *Ceratopogonidae* and culicid larvae. The present study used MALDI-TOF MS for iden-

tification and established the first database reference of hematophagous *Culicoides* in Western Africa. The database created allows for cost-effective and rapid identification of *Culicoides* species with high specificity. Some of the 12 species collected in this study are implicated as vectors for protozoa and arboviruses (*C. imicola*, *C. fulvithorax*, *C. kingi*, and *C. enderleini*) (1, 15, 52–55). These data highlight the veterinary and clinical need for the species identification of *Culicoides*.

Our results confirm that the database of protein extract spectra obtained using MALDI-TOF is a suitable tool for the identification of *Culicoides*. This method was used throughout the experiments and yielded high-quality spectral profiles (Fig. 4). Kaufmann et al. (3) reported that male and female specimens had very similar spectra with a high count of identical masses, but the presence of blood had a considerable impact on the MALDI-TOF analysis because it reduced the intensity of the midges' biomarker masses. This effect was undetectable in insects 5 days after the ingestion of blood. Our study used only unfed females for MALDI-TOF identification.

Several authors evaluated other MALDI-TOF MS-based systems and reported the necessary use of a formic acid-based protein extraction using a *Culicoides* lysis step before matrix application (24–42). The Vitek MS system used in this study generated a low frequency of unusable spectra without formic acid, and we obtained good-quality spectra with formic acid. In general, MS provides good identification of *Culicoides* with satisfactory results for the species studied. MS was effective for the identification of *C. imicola*, *C. kingi*, *C. fulvithorax*, *C. magnus*, and *C. enderleini*, which resulted in the creation of SuperSpectra for these species. The reproducibility and accuracy of the reference spectra were tested in a blind study of 76 morphologically identified biting midges (Table 3), and a correct and unambiguous result was obtained in 72 of the 76 insects tested. Four of the insects that were misidentified by the Vitek MS species belonged to the *C. schultzei* group (1 *C. enderleini* and 3 *C. oxystoma*). One *C. enderleini* was identified by MALDI-TOF as *C. oxystoma* with 99.99% similarity, and 3 *C. oxystoma* were identified as *C. enderleini* with 91 to

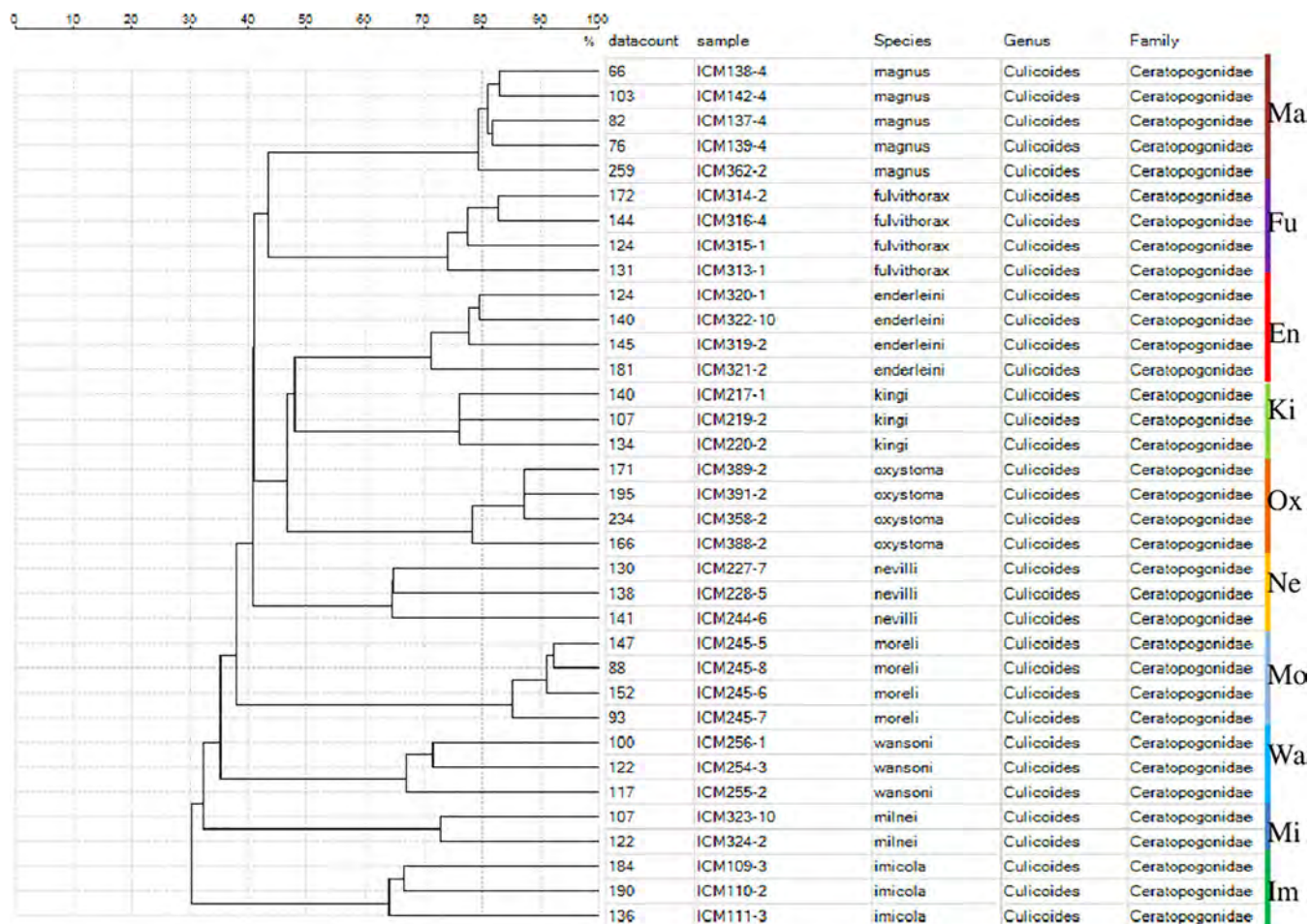


FIG 5 Dendrogram of MALDI-TOF Vitek mass spectra in the range of 3 to 20 kDa of thoraxes from 2 to 4 individuals of 10 species of field-caught *Culicoides* biting midges. Ma, *C. magnus*; Fu, *C. fulvithorax*; En, *C. enderleini*; Ki, *C. kingi*; Ne, *C. nevilli*; Mo, *C. moreli*; Wa, *C. wansoni*; Mi, *C. milnei*; Im, *C. imicola*.

99.99% similarity. One misidentification (Table 3) was evidently the fault of morphological identification. *C. oxystoma* was misidentified as *C. enderleini* because both sequencing and MALDI-TOF methods were concordant, and this specimen was identified as *C. oxystoma*. MALDI-TOF spectra were misleading in three

TABLE 3 Validation of Vitek MS results for 76 *Culicoides* spp.

Species	No. of morphological identifications	Correspondence of COI identification to morphological identification (no./total no. [%])	Correspondence of MALDI-TOF identification to morphological identification (no./total no. [%])
<i>C. imicola</i>	15	15/15 (100)	15/15 (100)
<i>C. fulvithorax</i>	8	8/8 (100)	8/8 (100)
<i>C. magnus</i>	7	7/7 (100)	7/7 (100)
<i>C. kingi</i>	11	11/11 (100)	11/11 (100)
<i>C. enderleini</i>	19	18/19 (95) ^a	18/19 (95)
<i>C. oxystoma</i>	16	16/16 (100)	13/16 (69) ^b
Total	76	75/76 (99)	72/76 (95)

^a One individual was morphologically identified as *C. enderleini*. The sequenced COI and MALDI-TOF spectra corresponded to *C. oxystoma*.

^b All 16 specimens that were morphologically identified as *C. oxystoma* were confirmed using sequencing, but the MALDI-TOF spectra of 3 individuals were closer to those of *C. enderleini* than to those of other *C. oxystoma*.

other cases: the individuals who were identified morphologically and genetically as *C. oxystoma* had spectra that were closer to those of *C. enderleini*. All of these identifications concerned only two taxonomically related species of the *C. schultzei* group, *C. oxystoma* and *C. enderleini*, which resembled each other morphologically and genetically.

Comparisons of the dendrograms that were obtained using molecular biological methods and MALDI-TOF MS showed similar topologies for *C. kingi*, *C. imicola*, *C. magnus*, *C. fulvithorax*, *C. oxystoma*, *C. nevilli*, *C. moreli*, and *C. wansoni*. Few differences were shown for *C. enderleini*; phylogeny tree analysis revealed three clusters, but spectral analysis did not support this separation. Spectral analysis showed one cluster with similarity within the species that was >75%. This result may be explained by the few protein differences between the molecularly identified clusters, which may represent either high intraspecies variation or subspecies.

Morphological identification provides gold standard specimens for insect taxonomy. However, morphological identification can be a time-consuming procedure, and it is a very difficult task in many cases even for expert taxonomists (28) because of faint characteristics or intraspecific variability (26). Pagès et al. (56) described the existence of morphologically similar midges (cryptic species) that are

genetically distinguishable. Molecular identification assays are accurate tools for species diagnosis, but precautions are required during several steps from the storage of specimens/samples to PCR amplification to ensure correct identification. Analyses of partial COI sequences confirmed previous findings (57) that this locus displays low intraspecies variation and considerable interspecies variations in *Culicoides* spp. (26). The molecular identification of African biting midges may be difficult because of the virtual paucity of deposited sequences; sequences for only 5 of the 10 species studied were available in GenBank. The population genetic structure of the investigated midge species might differ across ecological conditions (26). MALDI-TOF MS has emerged as an alternative technique for species identification. The technical preparation of midges included abdomen removal because host blood in female midges blurred the spectra during the first few days after the blood meal (41). This proteomic approach has been developed for use for use as a high-throughput, accurate, and reproducible identification of clinically relevant midges species at a low cost with minimal preparation time. Kaufmann et al. (41) reported that this approach may become the method of choice for the centralized, robust and high-throughput screening of midge populations in connection with the surveillance of eventually emerging midge-transmitted agents. Morphological, molecular, and protein profiling using MALDI-TOF approaches together hold promise for the elucidation of relationships within species complexes and between closely related species.

In conclusion, we report for the first time the successful identification of epidemiologically important arthropods (*Culicoides* spp.) using mass spectrometry that was performed entirely in Africa. The database of *Culicoides* spectra obtained allowed the cost-effective and reproducible identification of species without the assistance of trained entomologists. Our database contains reproducible reference SuperSpectra for 6 species of field-caught *Culicoides* and reference spectra for other *Culicoides*. This database could benefit any entomological laboratory that is equipped with a MALDI-TOF Vitek MS system. Our study also showed that Vitek MS is an efficient approach for the identification of *Culicoides*. This method is economically advantageous for approaches that require detailed and quantitative information on midge fauna.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Thierry Schmidgen, Virginie Giroudon, Hervé Tissot-Dupont, and all of the staff of the Hôpital Principal de Dakar (Senegal), especially Elimane Mbaye and Diene Bane, for their contributions; Moussa Fall and Assane G. Fall and all of the staff of the Bio Ecologie et Pathologies Parasitaires (BEPP) du Laboratoire National d'Élevage et de Recherches Vétérinaires (LNERV) ISRA (Senegal) for their help; and Mustapha Dahmani for his technical help with the molecular biology.

REFERENCES

- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. 2000. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45:307–340. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.307>.
- Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. 2009. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol* 17:172–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.01.001>.
- Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pfluger V, Mathis A. 2011. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Med Vet Entomol* 25:32–38. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00927.x>.
- Paweska JT, Venter GJ, Hamblin C. 2005. A comparison of the susceptibility of *Culicoides imicola* and *C. bolitinos* to oral infection with eight serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus. *Med Vet Entomol* 19:200–207. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0269-283X.2005.00560.x>.
- Elbers ARW, Meiswinkel R, van Weezep E, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Kooi EA. 2013. Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis* 19:106–109. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1901.121054>.
- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter T, Beer M. 2012. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* 18:469–472. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111905>.
- Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bodker R, Botner A. 2012. *Culicoides* as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis* 18:1204–1206. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1807.120385>.
- Planzer J, Kaufmann C, Worwa G, Gavier-Widén D, Hofmann MA, Chagnat V, Thür B. 2011. In vivo and in vitro propagation and transmission of Toggenburg orbivirus. *Res Vet Sci* 91:e163–e168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.03.007>.
- Pinheiro FP, Hoch A, Gomes MDL, Roberts DR. 1981. Oropouche virus. *Am J Trop Med Hyg* 30:172–176.
- Agbolade OM, Akinboye DO, Olateju TM, Ayanbiyi OA, Kuloyo OO, Fenuga OO. 2006. Biting of anthropophilic *Culicoides fulvithorax* (Diptera: Ceratopogonidae), a vector of *Mansonella perstans* in Nigeria. *Korean J Parasitol* 44:67–72. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2006.44.1.67>.
- Asio SM, Simonsen PE, Onapa AW. 2009. *Mansonella perstans* filariasis in Uganda: patterns of microfilaraemia and clinical manifestations in two endemic communities. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:266–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.08.007>.
- Simonsen PE, Onapa AW, Asio SM. 2011. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Trop* 120(Suppl):S109–S120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.014>.
- Udouding NIG, Braide IE, Opara KN, Adie HA. 2007. *Perstans* filariasis in rural communities of Lower Cross River Basin: parasitological observations. *Int J Zool Res* 3:207–212. <http://dx.doi.org/10.3923/ijzr.2007.207.212>.
- Bamba S, Traoré FB, Liance M, Chemla C, Sanou C, Da O, Guiguemdé TR. 2012. Vaginal localisation of *Mansonella perstans*: report of a case at the University Hospital of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Pan Afr Med J* 12:47. (In French.)
- Slama D, Haouas N, Remadi L, Mezhoud H, Babba H, Chaker E. 2014. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit Vectors* 7:51. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-51>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.3989/grlaesia.1996.v52.i0.376>.
- Goffredo M, Meiswinkel R. 2004. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Ital* 40:260–265.
- 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. *Prev Vet Med* 87:55–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.06.005>.
- Delécolle JC. 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Bakhoun MT, Fall M, Fall AG, Bellis GA, Gottlieb Y, Labuschagne K, Venter GJ, Diop M, Mall I, Seck MT, Allène X, Diarra M, Gardès L, Bouyer J, Delécolle JC, Balenghien T, Garros C. 2013. First record of *Culicoides oxystoma* Kieffer and diversity of species within the Schultzei Group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. *PLoS One* 8:e84316. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084316>.
- Balczun C, Vorsprach B, Meiser CK, Schaub GA. 2009. Changes of the abundance of *Culicoides obsoletus* s.s. and *Culicoides scoticus* in Southwest Germany identified by a PCR-based differentiation. *Parasitol Res* 105:345–349. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1412-2>.
- Mathieu B, Perrin A, Baldet T, Delecolle J, Albina E. 2007. Molecular identification of western European species of obsoletus complex (Diptera: Ceratopogonidae) by internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex poly-

- merase chain reaction assay. *J Med Entomol* 44:1019–1025. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[1019:MIOWES\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[1019:MIOWES]2.0.CO;2).
23. Nolan D, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas JF. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.019>.
 24. Schwenkenbecher JM, Mordue AJ, Switek K, Pierniey SB. 2009. Discrimination of *Culicoides* midge larvae using multiplex polymerase chain reaction assays based on DNA sequence variation at the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene. *J Med Entomol* 46:610–614. <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0328>.
 25. Stephan A, Clausen P, Bauer B, Steuber S. 2009. PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitol Res* 105:367–371. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1407-z>.
 26. Wenk CE, Kaufmann C, Schaffner F, Mathis A. 2012. Molecular characterization of Swiss Ceratopogonidae (Diptera) and evaluation of real-time PCR assays for the identification of *Culicoides* biting midges. *Vet. Parasitol.* 184:258–266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.034>.
 27. Mellmann A, Bimet F, Bizet C, Borovskaya AD, Drake RR, Eigener U, Fahr AM, He Y, Ilna EN, Kostrzewa M, Maier T, Mancinelli L, Moussaoui W, Prevost G, Putignani L, Seachord CL, Tang YW, Harmesen D. 2009. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 47:3732–3734. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00921-09>.
 28. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:543–551. <http://dx.doi.org/10.1086/600885>.
 29. Santos C, Paterson RRM, Venancio A, Lima N. 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 108:375–385. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x>.
 30. Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier JC, Gouriet F, Fournier PE, Drancourt M, La Scola B, Raoult D. 2013. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51:2182–2194. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00492-13>.
 31. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* 5:1733–1754. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.127>.
 32. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. 2010. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 48:3482–3486. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00687-09>.
 33. Mazzeo MF, Giulio BD, Guerriero G, Ciarcia G, Malorni A, Russo GL, Siciliano RA. 2008. Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 56:11071–11076. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8021783>.
 34. Caprioli G, Cristalli G, Ragazzi E, Molin L, Ricciutelli M, Sagratini G, Seraglia R, Zuo Y, Vittori S. 2010. A preliminary matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight approach for the characterization of Italian lentil varieties. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24:2843–2848. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.4711>.
 35. Karger A, Kampen H, Bettin B, Dautel H, Ziller M, Hoffmann B, Süß J, Klaus C. 2012. Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Ticks Tick-borne Dis* 3:78–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.11.002>.
 36. Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger J, Raoult D, Parola P. 2013. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol* 51:522–528. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02665-12>.
 37. Campbell PM. 2005. Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Syst Entomol* 30:186–190. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2004.00279.x>.
 38. Feltns R, Gerner R, Kalkhof S, Groger-Arndt H, von Bergen M. 2010. Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *BMC Evol Biol* 10:95. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-95>.
 39. Yssouf A, Parola P, Lindström A, Lilja T, L'ambert G, Bondesson U, Berenger JM, Raoult D, Almeras L. 2014. Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS. *Parasitol Res* 113:2375–2378. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3876-y>.
 40. Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath MO, Sougoufara S, Dehecq JS, Lacour G, Berenger JM, Sokhna CS, Raoult D, Parola P. 2013. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. *PLoS One* 8:e72380. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072380>.
 41. Kaufmann C, Schaffner F, Ziegler D, Pflüger V, Mathis A. 2012. Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology* 139:248–258. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011001764>.
 42. Steinmann IC, Pflüger V, Schaffner F, Mathis A, Kaufmann C. 2013. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for the identification of ceratopogonid and culicid larvae. *Parasitology* 140:318–327. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182012001618>.
 43. Sudia WD, Chamberlain RW. 1962. Battery light trap, an improved model. *Mosquito News* 22:126–129.
 44. Cornet M, Brunhes J. 1994. Révisions des espèces de *Culicoides* apparentées à *C. schultzei* (Enderlein, 1908) dans la région afrotropicale (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomol France* 99:149–164.
 45. Glick JL. 1990. *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol* 27:85–195.
 46. Cornet M, Chateau R. 1970. Les *Culicoides* de l'Ouest africain (2e note) Espèces apparentées à *C. similis* Carter, Ingram et Macfie, 1920 (Diptera, Ceratopogonidae). *Cah ORSTROM Sér Ent Méd Parasitol* 8:141–173.
 47. Simon C, Francesco F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87:651–701.
 48. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 41:95–98.
 49. Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
 50. Perera MR, Vargas RDE, Jones MGK. 2005. Identification of aphid species using protein profiling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Entomol Exp Appl* 117:243–247. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00353.x>.
 51. Müller P, Pflüger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, Lengeler C. 2013. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS One* 8:e57486. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057486>.
 52. Mardulyn P, Goffredo M, Conte A, Hendrick G, Meiswinkel R, Balenghien T, Sghaier S, Lohr Y, Gilbert M. 2013. Climate change and the spread of vector-borne diseases: using approximate Bayesian computation to compare invasion scenarios for the bluetongue virus vector *Culicoides imicola* in Italy. *Mol Ecol* 22:2456–2466. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12264>.
 53. Venter GJ, Paweska JT, Van Dijk A, Mellor PS, Tabachnick WJ. 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.
 54. Mellor PS, Hamblin C. 2004. African horse sickness. *Vet Res* 35:445–466. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2004021>.
 55. Venter GJ, Koekemoer JJ, Paweska JT. 2006. Investigations on outbreaks of African horse sickness in the surveillance zone in South Africa. *Rev Sci Tech* 25:1097–1109.
 56. Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Núñez JJ. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.020>.
 57. Augot D, Sauvage F, Joutet D, Simphal E, Veuille M, Couloux A, Kaltenbach ML, Depaquit J. 2010. Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect Genet Evol* 10:629–637. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.016>.

b) Résultats obtenus hors article

Echantillonnage et détermination morphologique des *Culicoides*

Sur les 3397 spécimens de *Culicoides* collectés dans les 3 sites, 3202 spécimens ont été identifiés jusqu'au niveau espèces et 195 individus non identifiés (Tableau 4). Les *Culicoides* identifiés appartiennent à 13 espèces différentes. Parmi les *Culicoides* déterminés, 31,5 % (1009/3202) proviennent du site du Sine Saloum, où les espèces les plus rencontrées sont les *C. enderleini*, *C. wanson*, *C. imicola* et *C. oxystoma*. À Mlomp nous avons identifié 7 espèces circulantes et représentant 26,61 % (852/3202) de l'échantillon total. Les espèces dominantes sont les *C. enderleini*, *C. imicola* et *C. wanson*. Dans le site de Kédougou, 42,0 % (1341/3202) de la taille de l'échantillon proviennent de la zone de Kédougou. Les espèces *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. fulvithorax* sont les plus fréquemment rencontrées. La faune culicoidienne dans les trois sites d'étude est majoritairement dominée par les *C. enderleini*, *C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. wanson*, *C. fulvithorax* et *C. kingi*.

Tableau 4. : Résultats des identifications morphologiques

Espèces	Sine Saloum	Mlomp	Kédougou	Total/espèce
<i>C. enderleini</i>	533	630	502	1665
<i>C. oxystoma</i>	43	8	396	447
<i>C. kingi</i>	12	0	106	118
<i>C. nevillei</i>	22	0	0	22
<i>C. wanson</i>	178	65	0	243
<i>C. magnus</i>	26	0	9	35
<i>C. milnei</i>	3	49	0	52
<i>C. fulvithorax</i>	56	9	100	165
<i>C. imicola</i>	101	79	195	375
<i>C. moreli</i>	4	0	0	4
<i>C. distinctipennis</i>	12	0	21	33
<i>C. simulis</i>	10	0	12	22
<i>C. neavi</i>	9	12	0	21
<i>C. spp</i>	87	8	100	195
Total/Site	1096	860	1441	3397

Discussion de l'étude n°1

La spectrométrie de masse par la variante MALDI-TOF est une méthode qui sépare et identifie des molécules selon leur masse et leur charge. Les applications de la spectrométrie de masse sont nombreuses et touchent des domaines différents (Perera *et al.*, 2005). La méthode est devenue une approche des laboratoires de routine pour l'identification des insectes et se positionne comme le test de première ligne, pour des insectes d'intérêt médical et vétérinaire (Kaufmann *et al.*, 2011; 2012a; 2012b; Yssouf *et al.*, 2013b; 2014a; 2014b; Stainmann *et al.*, 2013 ; Uhlmann *et al.*, 2014). La méthode fut évaluée comme un outil entomologique rentable et économique surtout pour des études à grande échelle (Kaufmann *et al.*, 2012b). La présente étude a utilisé le MALDI-TOF MS pour l'identification et établi la première base de données de référence des *Culicoides* hématophages en Afrique de l'Ouest. La base de données créée permettra une identification fiable et rapide des *Culicoides* avec une spécificité élevée. A l'heure actuelle, 12 espèces de *Culicoides* sont enregistrées dans le logiciel SARAMIS Premium, avec 6 SuperSpectres validés et activés dans la base. La plupart des espèces étudiées (*C. imicola*, *C. fulvithorax*, *C. kingi*, et *C. enderleini*) sont connues dans la transmission de divers virus d'intérêt vétérinaire et de pathogènes d'intérêt clinique (Mellor *et al.*, 2000; Mellor and Hamblin, 2004; Mardulyn *et al.*, 2013; Slama *et al.*, 2014). Ces données sont d'une importance capitale et mettent en évidence la nécessité du MALDI-TOF aux vétérinaires et cliniciens pour l'identification des espèces de *Culicoides*. L'approche MALDI-TOF est adaptée à l'identification des espèces de *Culicoides* morphologiquement semblables ou indiscernables et reste la méthode de choix pour traquer un échantillon de grande taille. Cependant la PCR est une approche qui est utilisée pour étudier un faible échantillon des espèces d'intérêt (Kaufmann *et al.*, 2012b). Descy *et al.* (2010) ont établi une étude comparative sur les coûts (des consommables et temps de manipulation) entre la spectrométrie de masse MALDI-TOF et la biologie moléculaire (PCR et séquençage) (Tableau 5). Ils estiment que le coût de l'appareil constitue un investissement, comparable à celui d'autres équipements d'un laboratoire de bactériologie, et que celui-ci est rapidement rentabilisé par le faible coût des consommables (Descy *et al.*, 2010).

Toutefois, le MALDI-TOF serait relativement peu intéressant sans une base de données précise, adaptée, et pouvant être régulièrement mise à jour. L'affinement et l'enrichissement des bases de données sont des éléments essentiels pour développer l'efficacité et la précision de la technique.

Tableau 5 : Tableau comparatif de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la Méthode d'identification par biologie Moléculaire.

	MALDI-TOF MS	Biologie Moléculaire
Durée de préparation	5 - 20 minutes	60 minutes à 24heures
Durée d'identification	4 minutes	45 minutes à 48 heures
Coût (consommables)	0,1 - 0,5 €/échantillons	30-50 €/échantillons
Identifications possibles	Toutes théoriquement ^a	Toutes théoriquement ^b
Compétence requise	Basique	Elevée

^a : à condition de disposer d'une base validée, activée pour l'espèce en question

^b : à condition de savoir ce que l'on cherche et de disposer des amorces adéquates

Etude n°2 : Identification de Pathogènes chez les *Culicoides*

Etude n°2 : Identification de Pathogènes chez les *Culicoides*

Introduction

Depuis une dizaine d'années, les populations pathogènes sont de plus en plus étudiées par des techniques de spectrométrie de masse. En effet, l'étude des populations par isolement de bactéries sur milieux de culture permet de mettre en évidence une très faible portion des espèces bactériennes présentes (Nocker *et al.*, 2007). D'après Cases et de Lorenzo (2000), 0,5 à 10% des espèces bactériennes existantes ont été identifiés. La majorité des espèces n'étant connu que par séquençage génomique (Cases and Lorenzo, 2000). Ces techniques génomique ont été appliquées à l'étude de la biodiversité pour la première fois par Norman et collaborateurs (Lane *et al.*, 1985; Stahl *et al.*, 1985; Olsen *et al.*, 1986). Depuis, les techniques d'amplification et d'études de l'ADN des populations pathogènes ont fait l'objet de plusieurs publications dans des domaines variés de la recherche fondamentale. Aujourd'hui, de nouveaux outils rapides pour le diagnostic des pathogènes ont émergés. Plusieurs types de PCR (PCR 'classique', PCR à temps réel) ont été développées pour améliorer le diagnostic de ces pathogènes. De plus, au cours de la dernière décennie une nouvelle approche MALDI-TOF fiable, reproductible et rapide fut développée comme outil de routine à l'identification de pathogènes dans les laboratoires cliniques.

Cependant, au Sénégal, plusieurs maladies bactériennes (rickettsioses, bartonelloses, fièvre Q) ont été diagnostiquées dans 5 sites ruraux par l'Unité de Recherche des Maladies Infectieuses Tropicales et Tropicales (URMITE/IRD198). Une étude très récente a montré une distribution à grande échelle avec une forte prévalence des infections à *Rickettsia felis* en Afrique Sub-saharienne (Mediannikov *et al.*, 2013). Au Sénégal, les prévalences des infections à *R. felis*, sont passées de 4,4% en 2010 (Socolovschi *et al.*, 2010) à 15% en 2013 (Mediannikov *et al.*, 2013). Ces maladies sont probablement à transmission vectorielle. L'URMITE a commencé à étudier l'épidémiologie de ces maladies depuis 2010, mais le test des arthropodes suspectés (puces, tiques, glossines) était toujours négatif (Mediannikov *et al.*, 2010a; Mediannikov *et al.*, 2012; Roucher *et al.*, 2012; Sambou *et al.*, 2014).

Cette étude utilise différentes techniques de détection de pathogènes pour déterminer l'implication des *Culicoides* dans la distribution de *Mansonella perstans* et des maladies bactériennes dont l'URMITE cherche à expliquer l'épidémiologie. Mais aussi elle cherche à déterminer le rôle des espèces de *Culicoides* dans le cycle biologique des virus géants infectant les amibes et en particulier celui du virus Faustovirus.

Les résultats de cette étude sont publiés dans les revues scientifiques « *the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* » (Partie A) et « *Frontiers in Microbiology* » (Partie B).

Résumé de l'étude n°2 (Partie A).

Les filaires du genre *Mansonella* sont largement répartis, principalement en Afrique tropicale et en Amérique Equatoriale. Ces filaires sont fréquemment rencontrés chez l'homme et ils sont très mal décrits. *Mansonella perstans* est l'un de ces filaires fréquemment rencontré dans le Sénégal oriental. Les moucheron du genre *Culicoides* ont été suspectés dans la transmission de *M. perstans* dans divers régions d'Afrique. Cependant, au Sénégal, aucune étude n'a été menée pour confirmer ou expliquer l'implication des espèces de *Culicoides* dans la transmission et la répartition de ce parasite. Notre étude a été réalisée dans le Sénégal oriental où *M. perstans* est endémique. La détection de l'ADN des microfilaires a été réalisée par PCR en temps réel spécifique à partir de gouttes épaisses sanguines et de *Culicoides*. Les résultats de l'étude rétrospective montrent une prévalence de 14,5% chez les patients fébriles et non fébriles. Les prévalences les plus élevées (22%) sont rencontrées chez la population adulte (> 30 ans). Sur les 1159 échantillons de *Culicoides* étudiés, 8 sont positifs pour *Mansonella* spp. L'analyse spécifique de ces 8 spécimens pour la détection de *M. perstans* a montré un résultat négatif. Le séquençage des amplicons de 2 échantillons de *C. enderleini* positifs a permis d'identifier une nouvelle espèce de filaire qui appartient probablement au genre *Mansonella*. L'approche moléculaire utilisée dans cette étude est pertinente pour la détection des filaires. Elle nous a permis de montrer qu'au Sénégal, les espèces du genre *Culicoides* ne jouent pas un rôle important dans la transmission de *M. perstans*.

BASSENE AND OTHERS

MANSONELLA PERSTANS IN RURAL SENEGAL

High Prevalence of *Mansonella perstans* Filariasis in Rural Senegal

Hubert Bassene, Masse Sambou, Florence Fenollar, Siân Clarke, Sawdiatou Djiba, Gaël Mourembou, Alioune Badara L. Y., Didier Raoult, and Oleg Mediannikov*

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), Aix Marseille Université, Marseille, France, and Campus Universitaire UCAD-IRD de Hann, Dakar, Senegal; London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom; Ministry of Health, Fann Résidence, Rue Aimé Césaire, Dakar, Senegal

* Address correspondence to Oleg Mediannikov, Campus Universitaire UCAD-IRD, Route des Pères Maristes, BP 1386 CP 18524 Hann, Dakar, Senegal. E-mail: oleg.mediannikov@ird.fr

Abstract.

Large parts of African and American countries are colonized by *Mansonella*, a very common but poorly described filarial nematode. Bloodsucking flies of the genus *Culicoides* are suspected to be the vector of *Mansonella perstans*, but no study in Senegal has confirmed that *Culicoides* can transmit the parasite. Designed specific real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) can be used to identify microfilaria in stained blood smears. This study was performed in July and December 2010 in the southeastern Senegal, which is known to be endemic for *M. perstans*. We analyzed 297 blood smears from febrile and afebrile resident people by qPCR. The global prevalence of *M. perstans* was approximately 14.5% in both febrile and afebrile individuals. The age group of > 30 years had the highest prevalence (22.0%). No *Culicoides* among 1,159 studied specimens was positive for *M. perstans* and its vector in Senegal still requires identification.

INTRODUCTION

Mansonella perstans is a human filarial nematode that is highly prevalent in some areas across sub-Saharan Africa and South America.^{1,2} The prevalence of this nematode is often very high in endemic areas, even in children, and increases with age. Four species of filariasis-causing nematodes belonging to the genus *Mansonella* are responsible for human mansonellosis, *M. perstans*, *M. streptocerca*, *M. ozzardi*, and *M. rodhaini*,^{3,4} three of which have been described in Africa. *M. perstans* is considered to be the most frequent in Africa and is endemic in a large portion of sub-Saharan Africa, from Senegal to Uganda and south to Zimbabwe, as well as in South America.¹ Overall, more than 100 million people may be infected, and approximately 600 million people lived in the 33 countries are at high risk for *M. perstans* infection in Africa alone.¹

Adult nematodes are 35–80 mm long, live in the coelomic cavity, pericardium, mesentery, and perirenal and retroperitoneal connective tissues of humans.⁵ The microfilariae are nonperiodic and circulate in the blood in equal amounts throughout the day and night. They can also often be found in salivary gland abscesses,⁶ an intraocular position,⁷ and the conjunctiva.⁸ A vaginal localization was also reported by Bamba in 2012 in Burkina Fasso.⁹ The longevity of adult *M. perstans* worms in humans is unknown, but the microfilariae persist for approximately 4 months.¹⁰ *M. perstans* is currently considered to be of little pathogenicity and almost always asymptomatic. This might be partially explained by a modulated immune response because of

repeated exposure to the parasite, as was previously shown for loiasis.¹¹ No studies showing statistically proved association of *M. perstans* infection with clinical symptoms have been performed to date, *M. perstans* could be the cause of hypereosinophilia in infected expatriates.¹² The reservoir of *M. perstans* is humans, and transmission appears to occur through the bite of bloodsucking *Culicoides* flies, which are abundant in tropical ecosystems. Research on *M. perstans* vectors has allowed Sharp¹³ to identify *Culicoides grahami* as a potential vector. Because studies performed in Cameroon have described *C. grahami*, *C. austeni*, and *C. ornatipennis* as potential vectors,^{14–16} additional studies were performed in different countries to search for vectors of this parasite in endemic areas, including Rhodesia,¹⁷ Congo,¹⁸ and Nigeria.¹⁹ In east Africa, Khamala and Kettle²⁰ studied the taxonomy of *Culicoides*, identifying 61 species that had no local role in the transmission of *M. perstans*. Despite the prevalence reported by Pfister in 1954²¹ and Hocquet and others in 1964,²² no preliminary study has been conducted to identify the vector of *M. perstans* in Senegal, west Africa.

The goal of this retrospective study was to evaluate the prevalence of this neglected parasite in a rural area of Senegal and to lay a foundation for future studies on the documentation of symptoms related to *M. perstans* infection.

MATERIALS AND METHODS

Study site.

The Bandafassi study area is located in the region of Kedougou, eastern Senegal, near the border between Senegal, Mali, and Guinea. It belongs to the Sudano–Guinean savannah ecological zone. The region is disadvantaged in comparison with average rural areas in Senegal because it is far away from the capital, Dakar (700 km), and it is the country's most poorly equipped region in terms of health infrastructure and programs. The local roads are bad, often impracticable during the rainy season, which lasts half of the year. The entire population is rural, with farming, including cereal crops (sorghum, maize, and rice), peanuts, and cotton, as the main activity. The water is drawn from collective wells and there is no electricity. The majority of dwellings are huts covered with thatched roofs and most of the compounds have no toilet facilities. There is one public health post within the area, located in the village of Banadafassi, managed by a public nurse. The closest hospital is at Tambacounda (250 km from the area).

Before the beginning of these studies, all participants, including parents or legal guardians of all children, provided written, individual informed consent. The national ethics committee of Senegal approved the project (program of identification of emergent pathogens—No. 00.87 MSP/DS/CNERS, June 2, 2010; malaria in school children—0000-91/MSP/DS/CNERS, June 3, 2010).

Blood specimen collection and examination.

We conducted interviews and sampling in July and December 2010 in rural Senegalese villages in the Kedougou region. The villages were included in a longitudinal prospective study to investigate malaria in school children in Senegal, including epidemiological risk, burden of disease, and control strategies, and a program for the identification of emergent pathogens. Medical examination and blood smear were performed for each child (school children) who had a fever > 37.5°C. For the second program (IDEPATH), 200 µL capillary blood was collected and combined with anticoagulant for molecular examination.²³ For each study, a specific designed

questionnaire was completed. To determine the prevalence in healthy children, a transversal sampling was performed. Blood smears were stained with Giemsa and analyzed by microscopy to identify malarial trophozoites and gametocytes and the presence of microfilaria.^{5,24}

On each slide, 200 oil-immersion fields (~0.5 µL blood) were examined, and the filarial:leukocyte ratio was measured.^{25,26}

Arthropod collection.

Insects were collected using a modified CDC light trap, as previously reported.²⁷ In brief, the tulle net pockets were replaced with pockets of Terylene cloth, which traps tiny insects. The arthropods were collected in nine villages of Kedougou in April 2013 and April 2014. The traps were placed in different habitats, resulting in important variations in their qualitative and quantitative performance. In each habitat, we placed two traps, one inside a room occupied by a sleeper to capture endophilic *Culicoides* spp. and another outside to catch exophilic *Culicoides* spp.

Morphological identification.

Using a stereomicroscope, *Culicoides* spp. were separated from other insects and sorted into the following groups based on wing morphology: *schultzei*, *imicola*, *magnus*, *milnei*, and other *Culicoides*.^{28,29} Species identification was achieved by microscopic analyses of wing patterns and observation of different body parts (head, legs, and wing).^{28–30} After identification, the insects were stored individually at –80°C for further analysis.

Molecular identification.

For molecular identification, blood smears were scratched, and DNA was extracted using a modified 2.0% cetyl-trimethyl ammonium bromide (CTAB) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) method, as described previously.³¹ Before extraction, samples were digested with proteinase K at +56°C for 1 hour. The final elution volume of DNA was 200 µL. The quality of the samples was controlled using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) targeting the human β-actin gene, as described previously.³²

DNA from *Culicoides* spp. was extracted as follows: body parts of midges were ground in 180 µL 2.0% CTAB and 20 µL proteinase K (activity equal to 600 mAU/mL solution or 40 mAU/mg of protein). The ground material was lysed by heating in a water bath at 56°C for 1 hour. Two hundred microliters of chloroform was added to the lysed material and the supernatant was recovered after centrifugation at 12,000 rpm for 5 minutes. The nucleic acids were precipitated with 200 µL isopropanol after 15 minutes of centrifugation at 12,000 rpm. The pellet was washed with 200 µL of 70.0% ethanol and centrifuged under the above condition for 5 minutes to remove the residual salt. Finally, the pellet was dried in a Speed Vac for 3–4 minutes, and the DNA was dissolved in 100 µL elution buffer TE and stored at 4°C until further use.

We designed two new sets of primers and Taqman[®] probes based on an alignment of the internal transcribed spacer 1 (ITS1, 18S-5.8S) of *Mansonella* spp., primarily *M. perstans* (5 sequences) and *M. ozzardi* (3 sequences), as well as *Wuchereria bancrofti* ITS1. Previously, only standard PCR developed by Keiser and others in 2008 and based on the internal transcribed spacer was proposed for identification of *M. perstans*.³³ The first set was designed to be specific for the genus *Mansonella* and consists of a forward primer, 5'-

CCTGCGGAAGGATCATTAAC-3', a reverse primer, 5'- ATCGACGGTTTAGGCGATAA-3', and a probe, 6-FAM-CGGTGATATTCGTTGGTGTCT-TAMRA. The second in silico set is specific for *M. perstans*, with a forward primer, 5'-AGGATCATTAACGAGCTTCC-3', a reverse primer, 5'-CGAATATCACCGTTAATTTCAGT-3', and a probe, 6-FAM-TTCACTTTTATTTAGCAACATGCA-TAMRA. After qPCR validation, all samples were tested first with qPCR specific for *Mansonella* spp., and the positive samples were tested for *M. perstans*.

Molecular analyses of the biting midges were performed using the primers MansoITS-r and MansoITS-f, which amplify 240 bp of the *ITS* gene. The PCR consisted of DNA purification at 50°C for 2 minutes and an initial heating phase at 95°C for 15 seconds, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 10 seconds) and annealing (60°C for 45 seconds). A negative control was used to detect possible contamination and a positive control was used to ensure that the amplification conditions were appropriate. All amplifications were performed in a total reaction volume of 20 µL containing 10 µL master mix Takyon® (Eurogentec France, Angers, France), 1 µL of each primer, 1 µL probe, 2 µL distilled water, and 5.0 µL DNA template. We performed all PCR reactions using the thermal cycler CFX96 Touch detection system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

The specificity of the PCR was tested with 100 blood samples collected from febrile French residents hospitalized at La Timone Hospital (Marseille, France) who had not visited an endemic zone for *Mansonella*.

PCR validation.

To validate the PCR, we scratched and tested 54 blood smears from Senegal: five samples with microscopically identified *M. perstans* filariae (only these five slides were reported to be *Mansonella* positive during the routine examination in the malaria in schoolchildren research program) and 49 microscopically negative specimens collected from the malaria in-school program performed in Kedougou. The examination of the blood smears was performed by microscopy (×100 with immersion oil). The DNA extracted from the blood samples of 100 febrile French residents without blood *Mansonella* microfilariae and without a history of travel in endemic areas all tested negative. A comparison of the microscopy and PCR gave following results: five samples were positive by microscopy and PCR, no sample was positive by microscopy and negative by PCR, three samples were positive by PCR and negative by microscopy, and 46 samples were negative by both tests.

In brief, the sensitivity of the proposed qPCR compared with the microscopic examination was 100%, as we could detect all positive samples. Moreover, three samples for which we detected the presence of *Mansonella* genes by qPCR did not reveal microfilariae during microscopic examination, suggesting the higher sensitivity of the qPCR technique. The sensitivity of blood smear microscopy for the diagnostics of mansonellosis was only 63% compared with qPCR. The specificity of the proposed method is also very high: none of the febrile patients from non-endemic regions produced positive results. In total, both techniques were concordant.

We sequenced the 240-bp portion of ITS from 10 randomly selected patients, including three samples negative by microscopy. All sequences were identical and to all *M. perstans* sequences deposited in GenBank (KJ631373 and others).

Statistical analysis.

The data were analyzed using Epi Info software, version 7.0.8.0 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

Entomological examination.

A total of 1,159 *Culicoides* spp. were captured (509 in 2013 and 650 in 2014), the majority of which were females. We caught the most midges in the villages of Laminia and Banding, representing 66.2% (767/1,159) of the captures. After microscopic identification, we identified 10 species of *Culicoides*. *C. enderleini* and *C. oxystoma* were the most prevalent, representing approximately 34.1% (395/1,159) and 15.0% (174/1,159), respectively, of the captured species. *C. enderleini* was well distributed in the study area, whereas *C. oxystoma* was localized in Laminia and Samekouta, the two villages closest to each other (Figure 1). The details of the *Culicoides* spp. captured during the study are presented in Table 1.

Using PCR, we found that none of the 1,129 *Culicoides* tested positive for *Mansonella*. All positive and negative controls gave proper results.

Analysis of blood specimens.

A total of 297 blood smears were analyzed by PCR: 201 from febrile people (febrile people series) who requested care in health posts in the study areas and 96 from blindly selected healthy children (afebrile population series). The sex ratio (male/female) was 50%, and the age group was from 7 months to 45 years. We identified *M. perstans* in 29 specimens from the febrile people series; this represents a prevalence of 14.4% (29/201). In the afebrile population series, we identified 14 positive representing 15.0% (14/96). The global prevalence of *M. perstans* in this area was about 14.5% (43/297).

M. perstans is widely distributed in this area, with only a few villages having a low prevalence. The highest prevalence was observed in Nathia, Bundukundi, and Baraboye. Overall, although *M. perstans* was found to be highly prevalent among people older than 29 years (33.3%). No case was detected among children younger than 12 months (Table 2), no statistically significant difference was observed.

DISCUSSION

The results of the comparison of techniques for detecting *M. perstans* showed that qPCR could be successfully used to identify microfilaria in the samples used, revealing excellent sensitivity and specificity. Indeed, the sensitivity of qPCR was even higher than that of microscopy. For the three cases in which qPCR rendered a positive result for a microscopically “negative” slide, we suggest that the filariae were actually either missed (or misinterpreted) during examination or destroyed during slide preparation or that *Mansonella* DNA was present inside phagocytes. It is known that the microfilariaemia may quite low in up to 70% of infected persons.³⁴ It is also well known that molecular methods are much more sensitive for the detection of parasitaemia (plasmodia)³⁵ and bacteremia (borreliae)³⁶ compared with microscopic examination. This also appears to be the case for mansonellosis. Unfortunately, the entire sample on the slides was used for DNA extraction and thus cannot be reexamined. Despite its cost,

qPCR was found to be very interesting for a retrospective study of *M. perstans* in this locality. On the basis of all these elements, we used qPCR for this study of filariasis in rural Senegal.

This retrospective study carried out using samples from the Kedougou area showed that *M. perstans* is widespread in this region. This wide distribution of microfilaria could be explained by the abundance of its vector and a good vectorial capacity. However, the vector of this microfilaria has not yet been identified in Senegal. Previous studies in other countries cited biting midges as vectors of *M. perstans*,^{37–39} but our study did not identify *M. perstans* in 1,129 *Culicoides* spp. collected in the same region where the human blood samples were studied. Most villages were located beside either a waterway or a depression that filled with water during the rainy season, thus constituting larval lodgings for the vector.^{40,41} *M. perstans* filariasis was found to affect all segments of the population, from school-age children to adults. The fact that the prevalence is higher among adults gave the impression that the immune response of the body against filariasis was absent as individuals infected in the second year (study results) should have ample time to develop antibodies against this parasite. However, as noted in other studies,¹ adults were infected as frequently as children. The fact that the prevalence is higher among adults (Table 2) indicates that they were more exposed than children, or this may be explained by a cumulative effect. Except for the village of Samecoute, where this parasite was absent, all other villages showed infection, suggesting that *M. perstans* is endemic in this area. Further studies could identify if the 0% of prevalence in Samecoute represents an actual difference by this community and possible explanations of this phenomenon. The Iwol village, at an elevation 440 m higher than Ibel, had a prevalence of 25%. This could be explained by the number of samples obtained in Iwol (4).

Despite of the number (1,159) of *Culicoides* spp. tested, we did not identify *M. perstans* in studied arthropods. Many investigated species of *Culicoides* are considered to be anthorophophilic (*C. imicola*, *C. enderleini*, *C. oxystoma*, and *C. kingi*) in Senegal, and even to be implicated in the transmission of mansonellosis in Africa (*C. fulvithorax*).¹⁹ All midges were collected in April, the month when the maximum frequency of microfilaria in human blood smears was identified (data not shown). This limited collection, even performed in the possible transmission season, limits this study. Systematic screening of *Culicoides* midges for *M. perstans* throughout a year would have been preferred. The fact that all *Culicoides* tested by PCR were negative may suggest the role of another vector of *M. perstans* in this area such as *Simuliidae*, *Tabanidae*, or *Culicidae*.

Although *M. perstans* is highly prevalent in some areas in Senegal, it is not associated with febrile conditions. Proposed real-time PCR specific for *M. perstans* allows the identification of these filariae in the stained blood smears. Further investigations are needed to determine the clinical impact of *M. perstans* among the population and to identify the vectors of this highly prevalent nematode.

Received January 20, 2015.

Accepted for publication April 6, 2015.

Acknowledgments:

We thank the Wellcome Trust for the support of the prospective study to investigate malaria in schoolchildren in Senegal and the national and local health authorities who supported the implementation of this research. We thank Gilles Chauvancy for technical support, the population of the study area for their participation in these studies and health officials for their support and cooperation, and members of the field research team.

Financial support: This work was financially supported by Agence National de Recherche grant 2010 (MALEMAF) and the IHU Méditerranée Infection.

Authors' addresses: Hubert Bassene, Masse Sambou, Sawdiatou Djiba, and Oleg Mediannikov, Campus Universitaire UCAD-IRD de Hann, Route des Pères Maristes, Dakar, Senegal, E-mails: hubert.bassene@ird.fr, masse.sambou@ird.fr, sawdiadjiba@yahoo.fr, and olegusss1@gmail.com. Florence Fenollar, Gaël Mourembou, and Didier Raoult, Faculté de Médecine, Aix Marseille Université, Marseille Cedex, France, E-mails: florence.fenollar@univ-amu.fr, gaelmourembou@yahoo.fr, and didier.raoult@gmail.com. Siân Clarke, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom, E-mail: sian.clarke@lshtm.ac.uk. Alioune Badara L. Y., Ministry of Health, Fann Résidence, Rue Aimé Césaire Dakar, Senegal, E-mail: alioune_lyb@yahoo.fr.

REFERENCES

- <jrn>1. Simonsen PE, Onapa AW, Asio SM, 2011. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Trop* 120 (Suppl 1): S109–S120.</jrn>
- <jrn>2. Downes BL, Jacobsen KH, 2010. A systematic review of the epidemiology of mansonelliasis. *Afr J Infect Dis* 4: 7–14.</jrn>
- <jrn>3. Gbary AR, Guiguemde TR, Ouedraogo JB, Lechuga P, 1987. Filarial multiparasitism in the savannah zone in Burkina Faso. *Med Trop* 47: 329–332.</jrn>
- <jrn>4. Bregani ER, Tantardini F, Rovellini A, 2007. *Mansonella perstans* filariasis. *Parassitologia* 49: 23–26.</jrn>
- <jrn>5. Walther M, Muller R, 2003. Diagnosis of human filariases (except onchocerciasis). *Adv Parasitol* 53: 149–153.</jrn>
- <jrn>6. Mateu L, Sopena N, Giménez M, Valerio L, 2008. *Mansonella perstans* isolated on aspiration puncture of a salivary gland. *Acta Otorrinolaringol Esp* 59: 145–147.</jrn>
- <jrn>7. Cohen J, Ribeiro J, Martins M, 2008. Ocular manifestations in mansonelliasis. *Arq Bras Oftalmol* 71: 167–171.</jrn>
- <jrn>8. Baird J, Neafie R, Connor D, 1988. Nodules in the conjunctiva, bung-eye, and bulge-eye in Africa caused by *Mansonella perstans*. *Am J Trop Med Hyg* 38: 553–557.</jrn>
- <jrn>9. Araki Y, Bamba T, Mukaisho K, Kanauchi O, Ban H, Bamba S, Andoh A, Fujiyama Y, Hattori T, Sugihara H, 2012. Dextran sulfate sodium administered orally is depolymerized in the stomach and induces cell cycle arrest plus apoptosis in the colon in early mouse colitis. *Oncol Rep* 28: 1597–1605.</jrn>
- <jrn>10. Asio SM, Simonsen PE, Onapa AW, 2009. Analysis of the 24-h microfilarial periodicity of *Mansonella perstans*. *Parasitol Res* 104: 945–948.</jrn>

- <jrn>11. Klion AD, Massougbojji A, Sadeler BC, Ottesen EA, Nutman TB, 1991. Loiasis in endemic and nonendemic populations: immunologically mediated differences in clinical presentation. *J Infect Dis* 163: 1318–1325.</jrn>
- <jrn>12. Fux CA, Chappuis B, Holzer B, Aebi C, Bordmann G, Marti H, Hatz C, 2006. *Mansonella perstans* causing symptomatic hypereosinophilia in a missionary family. *Travel Med Infect Dis* 4: 275–280.</jrn>
- <jrn>13. Sharp NAD, 1927. Development of *Microfilaria perstans* in *Culicoides grahami*; a preliminary note. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 27: 70.</jrn>
- <jrn>14. Sharp NAD, 1928. *Filaria perstans*; its development in *Culicoides austeni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 21: 371–396.</jrn>
- <jrn>15. Hopkins CA, 1952. Notes on the biology of certain *Culicoides* studied in the British Cameroons, west Africa, together with observations on their possible role as vectors of *Acanthocheilonema perstans*. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 165–172.</jrn>
- <jrn>16. Hopkins CA, Nicholas WL, 1952. *Culicoides austeni*, the vector of *Acanthocheilonema perstans*. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 276–283.</jrn>
- <jrn>17. Clarke Vde V, Harwin R, MacDonald D, Green C, Rittey D, 1971. Filariasis: *Dipetalonema perstans* infections in Rhodesia. *Cent Afr J Med* 17: 1–11.</jrn>
- <jrn>18. Noireau F, Itoua A, Carme B, 1990. Epidemiology of *Mansonella perstans* filariasis in the forest region of south Congo. *Ann Trop Med Parasitol* 84: 251–254.</jrn>
- <jrn>19. Agbolade OM, Akinboye DO, Olateju TM, Ayanbiyi OA, Kuloyo OO, Fenuga OO, 2006. Biting of anthropophilic *Culicoides fulvithorax* (Diptera: Ceratopogonidae), a vector of *Mansonella perstans* in Nigeria. *Korean J Parasitol* 44: 67–72.</jrn>
- <jrn>20. Khamala C, Kettle D, 1971. The *Culicoides latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) of east Africa. *Trans R Entomol Soc Lond* 123: 1–95.</jrn>
- <jrn>21. Pfister R, 1954. Résultats d’une enquête sur les porteurs de microfilarie en Afrique Occidentale Française. *Bull Soc Pathol Exot* 47: 408–411.</jrn>
- <jrn>22. Hocquet P, Lariviere M, Camerlynck P, Diallo S, 1964. Contribution a l’étude de la repartition des filarioses humaines au Senegal: enquetes dans la region de Damantan (Senegal oriental) et la Region cotiere de Casamance. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr* 9: 398–405.</jrn>
- <jrn>23. Sokhna C, Mediannikov O, Fenollar F, Bassene H, Diatta G, Tall A, Trape J-F, Drancourt M, Raoult D, 2013. Point-of-care laboratory of pathogen diagnosis in rural Senegal. *PLoS Negl Tropical Dis* 7: 1–10.</jrn>
- <jrn>24. Wanji S, Tendongfor N, Esum M, Ndindeng S, Enyong P, 2003. Epidemiology of concomitant infections due to *Loa loa*, *Mansonella perstans*, and *Onchocerca volvulus* in rain forest villages of Cameroon. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 192: 15–21.</jrn>

- <jrn>25. Trape JF, Tall A, Sokhna C, Ly AB, Diagne N, Ndiath O, Mazenot C, Richard V, Badiane A, Dieye-Ba F, Faye J, Ndiaye G, Diene Sarr F, Roucher C, Bouganali C, Bassene H, Toure-Balde A, Roussilhon C, Perraut R, Spiegel A, Sarthou JL, da Silva LP, Mercereau-Puijalon O, Druilhe P, Rogier C, 2014. The rise and fall of malaria in a west African rural community, Dielmo, Senegal, from 1990 to 2012: a 22 year longitudinal study. *Lancet Infect Dis* 14: 476–488.</jrn>
- <jrn>26. Roucher C, Rogier C, Sokhna C, Tall A, Trape JF, 2014. A 20-year longitudinal study of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* prevalence and morbidity in a west African population. *PLoS One* 9: e87169.</jrn>
- <jrn>27. Sudia W, Chamberlain R, 1962. Battery light trap, an improved model. *Mosq News* 22: 126–129.</jrn>
- <jrn>28. Cornet M, Brunhes J, 1994. Révisions des espèces de *Culicoides* apparentées à *C. schultzei* (Enderlein, 1908) dans la région afrotropicale (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomol Fr* 99: 149–164.</jrn>
- <jrn>29. Glick J, 1990. *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol* 27: 85–195.</jrn>
- <bok>30. Cornet M, 1969. Les *Culicoides* (Diptera Ceratopogonidae) de l'Ouest africain (1ère note). *Cah ORSTOM, sér Ent méd Parasitol VII*: 341–364.</bok>
- <jrn>31. Sambou M, Faye N, Bassene H, Diatta G, Raoult D, Mediannikov O, 2014. Identification of rickettsial pathogens in ixodid ticks in northern Senegal. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 552–556.</jrn>
- <jrn>32. Socolovschi C, Mediannikov O, Sokhna C, Tall A, Diatta G, Bassene H, Trape J, Raoult D, 2010. *Rickettsia felis*-associated uneruptive fever, Senegal. *Emerg Infect Dis* 16: 1140–1142.</jrn>
- <jrn>33. Keiser PB, Coulibaly Y, Kubofcik J, Diallo AA, Klion AD, Traore SF, Nutman TB, 2008. Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella perstans*. *Mol Biochem Parasitol* 160: 123–128.</jrn>
- <jrn>34. Raccurt CP, Brasseur P, Ciceron M, Boncy J, 2014. Epidemiologic survey of *Mansonella ozzardi* in Corail, Haiti. *Am J Trop Med Hyg* 90: 1167–1169.</jrn>
- <jrn>35. Andrews L, Andersen R, Webster D, Dunachie S, Walther R, Bejon P, Hunt-Cooke A, Bergson G, Sanderson F, Hill AVS, Gilbert SC, 2005. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg* 73: 191–198.</jrn>
- <jrn>36. Parola P, Diatta G, Socolovschi C, Mediannikov O, Tall A, Bassene H, Trape J-F, Raoult D, 2011. Tick-borne relapsing fever borreliosis, rural Senegal. *Emerg Infect Dis* 17: 883–885.</jrn>
- <jrn>37. Noireau F, Itoua A, Carme B, 1990. Epidemiology of *Mansonella perstans* filariasis in the forest region of south Congo. *Ann Trop Med Parasitol* 84: 251–254.</jrn>
- <jrn>38. Sharp N, 1928. *Filaria perstans*; its development in *Culicoides austeni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 21: 371–396.</jrn>

- <jrn>39. Agbolade O, Akinboye D, 2001. Loa loa and *Mansonella perstans* infections in Ijebu North, western Nigeria: a parasitological study. *Jpn J Infect Dis* 54: 108–110.</jrn>
- <jrn>40. Hopkins C, 1952. Notes on the biology of certain *Culicoides* studied in the British Cameroons, west Africa, together with observations on their possible role as vectors of *Acanthocheilonema perstans*. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 165–172.</jrn>
- <jrn>41. Hopkins C, Nicholas W, 1952. *Culicoides austeni*, the vector of *Acanthocheilonema perstans*. *Ann Trop Med Parasitol* 46: 276–283.</jrn>

FIGURE 1. Study site in Senegal, with the prevalence of *Mansonella perstans* among the population in parentheses when available. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

TABLE 1

Biting midges diversity in the Kedougou region

	Bandafassi	Banding	Bundukundi	Ibel	Indar	Thiabadji	Nathia	Samékouta	Laminia	Total
<i>Culicoides distinctipennis</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>C. enderleini</i>	12	116	1	35	2	140	20	12	57	395
<i>C. fulvithorax</i>	1	1	4	7	1	0	1	0	0	15
<i>C. imicola</i>	2	26	40	14	7	0	5	12	13	119
<i>C. kingi</i>	0	4	2	10	0	0	11	4	33	64
<i>C. leucostictus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. oxystoma</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	170	174
<i>C. schultzei</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>C. simulis</i>	0	13	0	0	0	0	0	0	0	13
<i>Culicoides</i> sp. (group distinctipennis)	0	0	0	0	0	0	13	0	0	13
<i>Culicoides</i> sp. (group similis)	0	0	6	0	0	0	3	0	2	11
<i>Culicoides</i> spp.	1	115	2	3	1	0	6	3	3	134
<i>C. subschultzei</i>	0	71	0	0	0	0	1	4	83	159
<i>Alluaudomyia</i> spp.	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14
<i>Forcipomyia</i> spp.	0	8	0	0	0	0	0	0	0	8
NI	0	0	0	0	0	0	0	0	36	36
Total	16	369	55	71	11	140	60	39	398	1,159

NI = none identified.

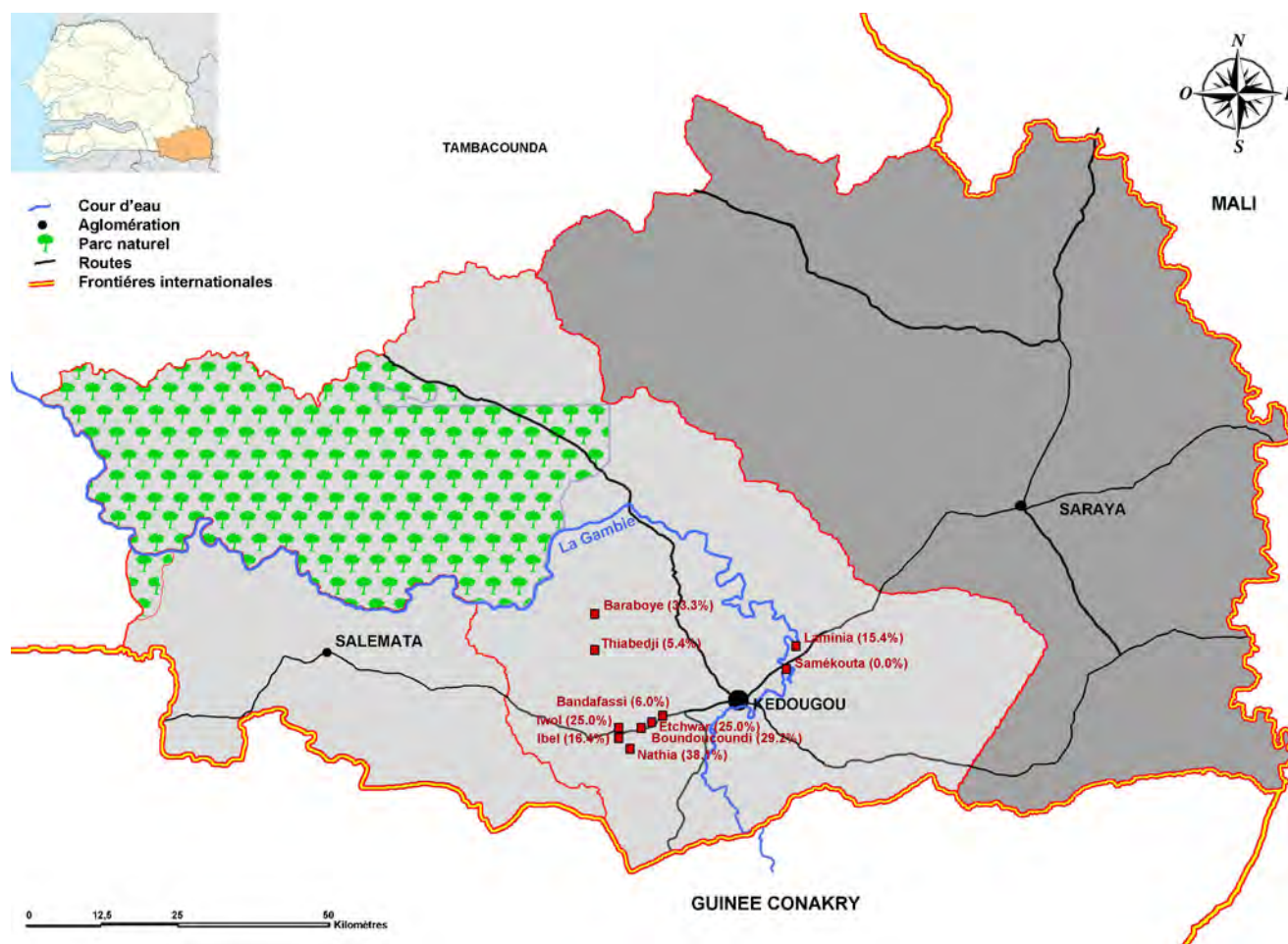
TABLE 2

Mansonella perstans prevalence rates for age groups

	< 12 months	1–3 years	4–6 years	7–15 years	16–29 years	30–45 years	NA	Total
Bandafassi	0.0% (0/5)	6.2% (1/16)	0.0% (0/14)	4.5% (1/22)	0.0% (0/2)	50.0% (1/2)	10.0% (1/10)	6.0% (4/71)
Baraboye	–	–	–	33.3% (1/3)	–	–	–	33.3% (1/3)
Boundoucoundi	0.0% (0/2)	0.0% (0/1)	0.0% (0/6)	54.0% (7/13)	–	0.0% (0/1)	0.0% (0/1)	29.2% (7/24)
Etchwar	–	0.0% (0/1)	0.0% (0/1)	50.0% (1/2)	–	–	–	25.0% (1/4)
Ibel	0.0% (0/1)	22.2% (2/9)	16.7% (2/12)	10.0% (3/31)	0.0% (0/1)	0.0% (0/1)	33.3% (4/12)	16.4% (11/67)
Iwol	–	–	33.3% (1/3)	0.0% (0/1)	–	–	–	25.0% (1/4)
Laminia	–	–	–	15.4% (2/13)	–	–	–	15.4% (2/13)
Nathia	0.0% (0/1)	100.0% (1/1)	0.0% (0/1)	41.2% (7/17)	0.0% (0/1)	–	–	38.1% (8/21)
Samecouta	–	0.0% (0/1)	–	0.0% (0/20)	–	–	–	0.0% (0/21)
Thiabedji	0.0% (0/1)	0.0% (0/7)	0.0% (0/9)	14.3% (2/14)	–	–	0.0% (0/6)	5.4% (2/37)
Other villages	0.0% (0/2)	40.0% (2/5)	0.0% (0/4)	20.0% (1/5)	20.0% (1/5)	50.0% (1/2)	11.1% (1/9)	19.0% (6/32)
Total	0.0% (0/12)	15.0% (6/41)	6.0% (3/50)	18.0% (25/141)	11.1% (1/9)	33.3% (2/6)	16.0% (6/38)	14.5% (43/297)

– = no data; NA = any information about the age.

Figure 1



b) Résultats obtenus hors article

Détection de bactéries par PCR

Nous avons analysé 2500 spécimens de *Culicoides* pour la détection des bactéries des genres *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Erhlichia* et *Anaplasma* avec les qPCR spécifique; mais aucune trace d'ADN de ces bactéries n'a été détectée.

Isolement de bactéries par culture bactérienne

Un total de 61 individus de *Culicoides* qui appartiennent à 4 espèces différentes (*Culicoides enderleini*, *C. magnus*, *C. wansoni* et *C. oxystoma*) ont été étudiées pour l'isolement de souches bactériennes sur gélose Cos. L'analyse au MALDI-TOF des souches résultantes a permis l'identification de *Staphylococcus capitis*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *Bacillus nealsonii* et *Micrococcus luteus* et 13 souches non identifiées.

Détection de filaires

Nous avons testé en biologie moléculaire 1159 échantillons de *Culicoides* pour la détection de filaires. Dans la première étape, les ADN extraits ont été testés en qPCR spécifique pour le genre *Mansonella* (**Tableau 6**).

Au total, 0,7% (8/1159) de *Culicoides* ont été positifs pour *Mansonella* spp. par qPCR dont 2 *C. enderleini* de Dielmo et 6 *C. oxystoma* de Kédougou. Par contre, les amplifications par qPCR spécifique à *M. perstans* sur ces 8 échantillons étaient négatives à plusieurs reprises.

Nous avons procédé à des réactions de séquençage pour les deux échantillons provenant de Dielmo en utilisant des couples d'amorces adaptés à l'ampliation des gènes 5S et ITS1. Ces gènes sont spécifiques pour l'identification et la caractérisation des espèces filariennes.

L'analyse des séquences de ces deux échantillons basée sur le gène 5S a révélé 87% de similarité entre les séquences obtenues et celle de *M. ozzardii* (JF412305) déposée dans GenBank. Les résultats de cette analyse ne correspondent pas à aucune des espèces de *Mansonella* dont les séquences sont déposées dans GenBank (**figure 26**).

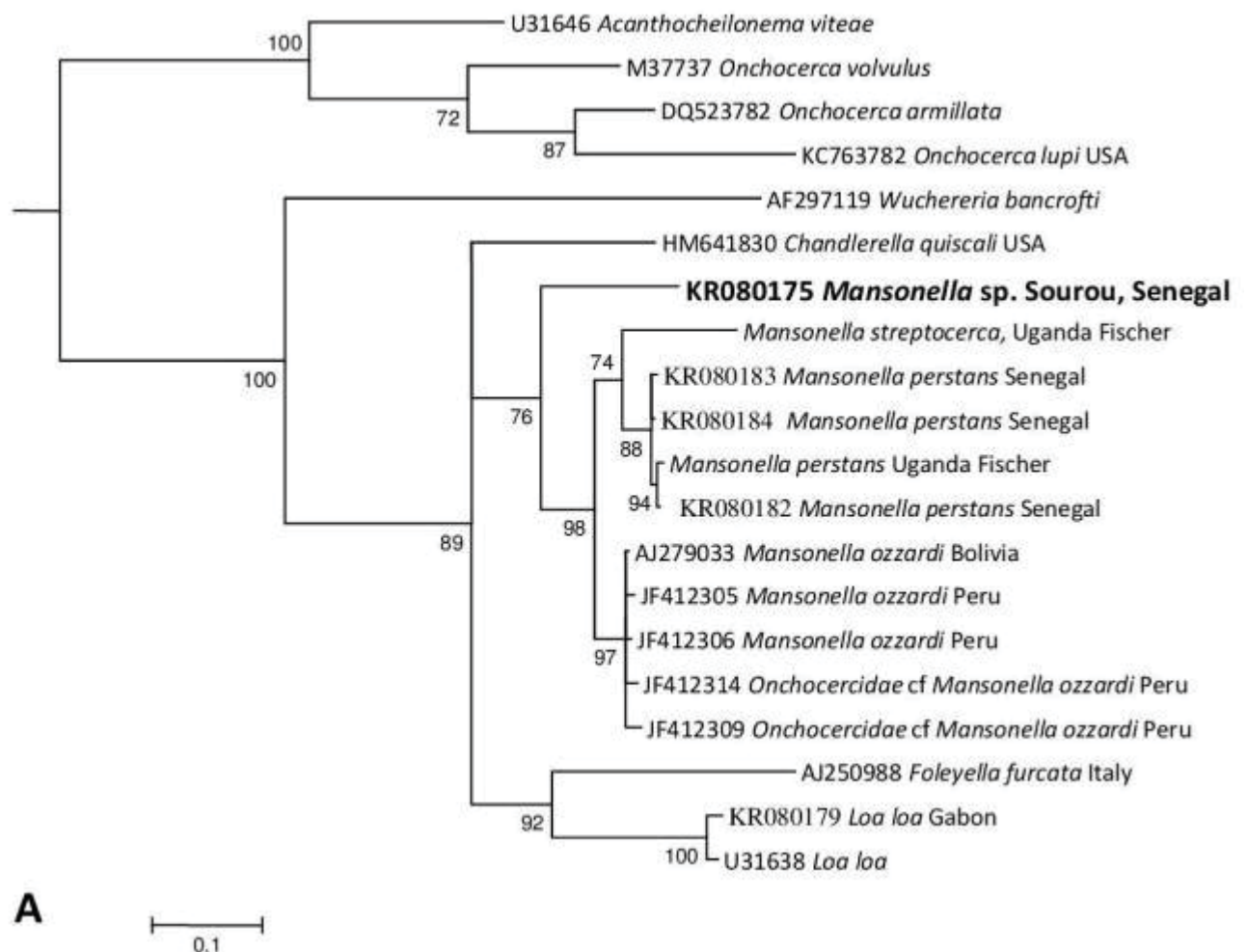


Figure 26. : Arbre phylogénétique montrant les relations entre la filaire étudiée et les espèces de la famille des *Onchocercidae*, se basant sur la comparaison des séquences du gène 5S.

Les séquences utilisées de GenBank sont indiquées par leur numéro d'accèsion. Les séquences sont ensuite en utilisant ClustalW et les inférences phylogénétiques sont obtenues en utilisant la méthode phylogénétique bayésienne avec le logiciel TOPALi 2.5 (Biomathematics and Statistics Scotland, Edinburgh, UK), intégrant l'application MrBayes avec comme model de substitution HKY. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sur les nœuds des branches. La taille finale de chaque séquence est de 380 paires de bases. La provenance géographique des filaires est indiquée après le nom de l'espèce.

Une seconde analyse des séquences de ces deux échantillons utilisant le gène ribosomal ITS1 a révélé 85% de similarité entre les séquences obtenues et celle de *M. ozzardii* (EU272180) déposée dans GenBank. L'analyse de l'arbre phyllogénétique construit à partir de ces séquences obtenues et des séquences du genre *Mansonella* publiées dans GenBank, révèle que notre séquence ne correspond pas à aucune des espèces de *Mansonella* déposées dans GenBank (**figure 27**).

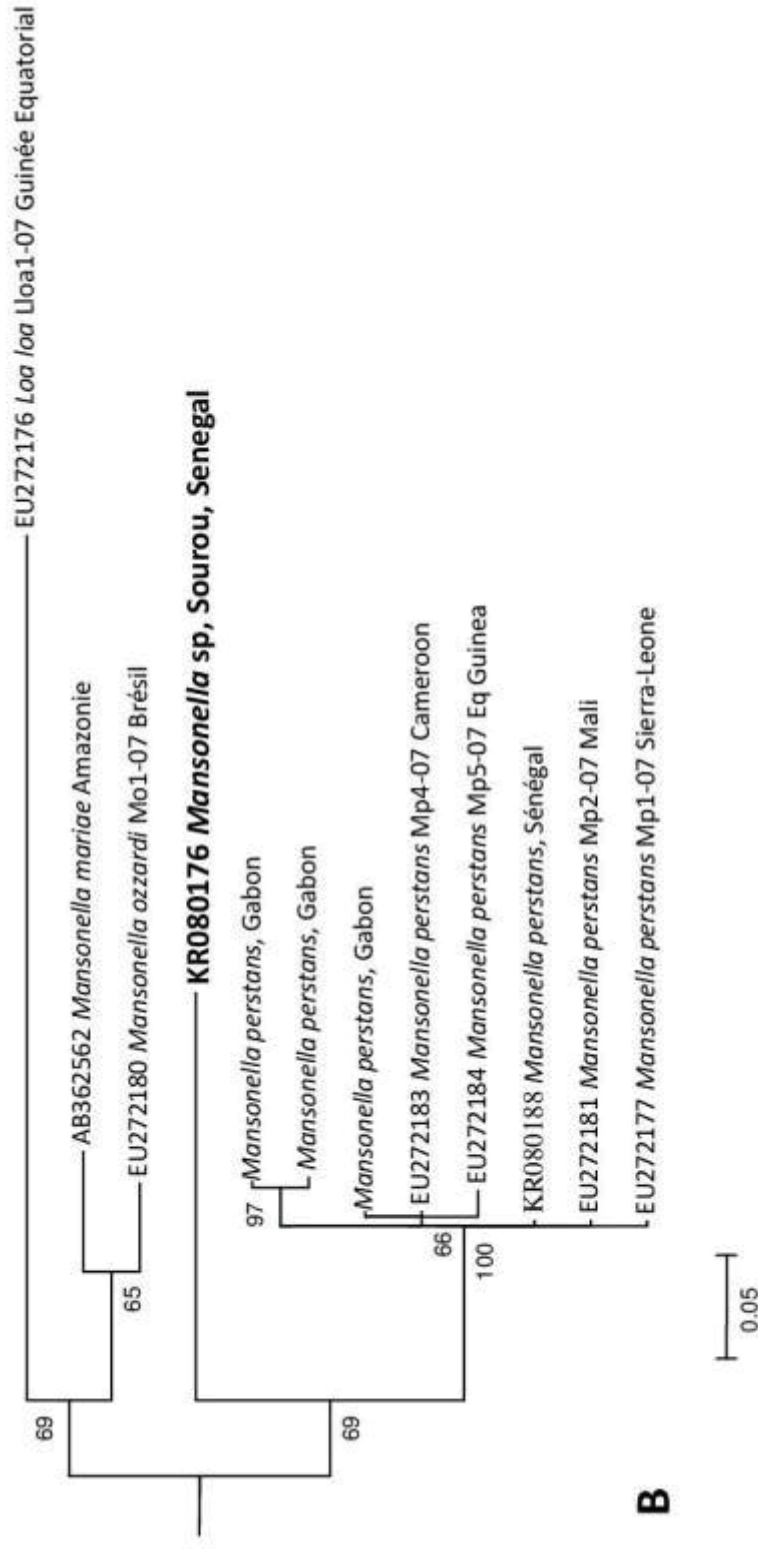


Figure 27. : Arbre phyllogénétique montrant les relations entre la filaire étudiée et les espèces de la famille des *Onchocercidae*, se basant sur la comparaison des séquences du gène ITS1.

Les séquences utilisées de GenBank sont indiquées par leur numéro d'accèsion. Les séquences sont ensuite alignées en utilisant ClustalW et les inférences phyllogénétiques sont obtenues en utilisant la méthode phyllogénétique bayésienne avec le logiciel TOPALi 2.5 (Biomathematics and Statistics Scotland, Edinburgh, UK), intégrant l'application MrBayes avec comme modèle de substitution HKY85. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sur les nœuds des branches. La taille finale de chaque séquence est de 437 paires de bases. La provenance géographique des filaires est indiquée après le nom de l'espèce.

Les résultats du séquençage de ces gènes sont très intéressants. Les deux gènes ont montré des résultats similaires : (1) les gènes amplifiés ne présentent aucune topologie appartenant à une espèce de *Mansonella* dont les séquences sont déposées dans Genbank ; (2) présentent une topologie appartenant au genre *mansonella*.

Nous avons comparé la séquence de 5S de cette filaire avec la séquence de *M. streptocerca* publiée par Fischer et al (1998) et avons trouvé que les séquences sont différentes (Fischer *et al.*, 1998).

Les arbres phylogénétiques à la base des séquences de gènes ITS1 et 5S sont présentés sur les figures (figure 26 et 27) ci-dessus.

Les séquences obtenues, à partir des gènes 5S et ITS1 de la filaire, sont déposés dans Genbank sous les numéros suivants : KR080175 pour 5S et KR080176 pour ITS1

Discussion de l'étude n°2 (Partie A)

Les résultats de notre étude ont montré que la technique qPCR est la méthode de choix pour la détection des filaires en comparaison de la méthode microscopique. L'approche PCR, par sa variante qPCR, présentait une sensibilité plus élevée que celle de la microscopie. Les faux négatifs de la microscopie pourraient être dus à des raisons multiples : soit le microscopiste à mal lu la lame ; soit les filaires étaient écrasées lors de la préparation de la lame et ou les filaires se trouvaient dans les cellules phagocytaires. De plus, Andrews et collègues ont rapporté que les méthodes moléculaires sont plus sensibles que l'examen microscopique pour la détection de la parasitémie (Andrews *et al.*, 2005). Cependant, malgré le coût élevé de la qPCR, nous avons jugé nécessaire de l'utiliser pour mener notre étude rétrospective dans la localité de Kédougou. Cette étude a montré que *Mansonella perstans* est largement distribué dans cette région.

Cette large diffusion des microfilaires pourrait s'expliquer par l'abondance de son vecteur. Des études antérieures menées dans divers pays avaient incriminé les *Culicoides* dans la transmission de *M. perstans* au Nigeria (Noireau *et al.*, 1990; Agbolade and Akinboye, 2001; Agbolade *et al.*, 2006). Dans notre étude, nous avons testé 1159 échantillons de *Culicoides* pour la détection de *Mansonella perstans*, mais aucun de ces échantillons n'a été positif. Parmi ces échantillons 100 spécimens de *C. fulvitorax*, le vecteur potentiel connus dans la transmission de *M. perstans* (Agbolade *et al.*, 2006), étaient également négatifs. Nos résultats montrent que les *Culicoides* ne jouent pas un rôle important dans la transmission de *M. perstans* au Sénégal.

L'épidémiologie des maladies bactériennes intéressées par URMITE en particulier la fièvre boutonneuse due à l'infection de *R. felis* reste toujours confuse. Roucher et collaborateurs (2012), ont collecté 232 spécimens de puce qui appartiennent à 3 espèces (*Ctenocephalides felis*, *Echinophaga gallinacae* et *Synosternus pallidus*). Le test de ces puces pour la détection de *R. felis* a été négatif. La même année, 70 glossines ont été étudiées par Mediannikov et collègues, mais toutes les glossines étaient négatives pour *R. felis* (Mediannikov *et al.*, 2012). La bactérie a été identifiée chez les moustiques *Aedes albopictus* et *Anopheles gambiae* (Socolovschi *et al.*, 2012), mais le rôle de ces espèces de moustiques dans la transmission de la bactérie n'est pas encore décrit. Alors que les prévalences des infections causées par *R. felis* dans les sites d'études sont d'autant plus élevées (Mediannikov *et al.*, 2013). Une autre étude menée chez 1169 tiques appartenant à 5 espèces (*Amblyomma*

variegatum, *Hyalomma impeltatum*, *H. marginatum rufipes*, *Rhipicephalus evertsi evertsi* et *Rh. Guilhoni*), a été négatives pour le test *R. felis* (Sambou *et al.*, 2014). Dans cette thèse, 2500 spécimens de *Culicoides* ont été testés en PCR pour la détection de bactéries, mais tous étaient négatifs. Ce résultat a été confirmé par la culture bactérienne à partir des *Culicoides* sur gélose au sang. En effet, les 61 échantillons de *Culicoides*ensemencés en culture bactérienne ont tous étaient négatifs à *R. felis*.

Notre étude montre également que, le séquençage des deux échantillons de Dielmo, révèle que la filaire détectée est vraisemblablement une nouvelle espèce. La topologie des arbres phylogénétiques construits montre que la filaire identifiée chez *Culicoides enderleini* de Dielmo est probablement une espèce du genre *Mansonella* non décrite ou pas séquencée. Sa position dans nos arbres phylogénétiques approuve qu'elle appartienne au genre *Mansonella*, mais pas aux espèces *M. perstans*, *M. ozzardi* et *M. streptocerca*. Les espèces *Mansonella gorillae*, *Mansonella leopoldi*, *Mansonella lopeensis*, *Mansonella rodhaini* et *Mansonella vanhoofi* sont décrites en Centre Afrique principalement chez les gorilles et chimpanzés (singes). Alors que dans la zone du Sine Saloum, il n'y a pas de gorilles ni de chimpanzés. Ce qui explique que la filaire identifiée n'est pas une de ces espèces de filaires. L'identification génétique n'est, malheureusement, pas possible dans ce cas, à cause de l'absence des gènes de cette espèce dans la base de données génétique Genbank.

Ces résultats sont soumis pour publication dans la revue scientifique « ***Emerging Infectious Diseases*** ».

Résumé de l'étude n°2 (Partie B): Identification de « virus géants » chez les *Culicoides* par métagénomique virale.

Les « virus géants » sont des virus à ADN double brin formant un groupe monophylétique ayant des caractéristiques communes de taille de particule, de taille de génome et de répllication nucleocytoplasmique. Ces virus appelés aussi girus appartiennent à l'ordre des *Megavirales* et répartis dans 7 familles que sont : *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Marseilleviridae*, *Mimiviridae* et *Asfarviridae*. Plusieurs de ces virus sont associés aux amibes ont été principalement retrouvés dans des prélèvements environnementaux et son caple d'infecter l'homme à l'exemple du *Faustovirus*, premier virus de la famille des *Asfaridae* isolé chez une amibe. Cependant, l'analyse métagénomique des communautés virales à génome ADN de *Culicoides* hématophages collectés à Dielmo/Diop (Sénégal) nous a permis de mettre en évidence une grande abondance et une importante diversité de séquences apparentées à des génomes de virus géant d'amibes chez des culicoïdes adultes. Les séquences majoritaires sont principalement prochent du *Faustovirus*, un virus géant de la famille des *Asfarviridae* récemment découvert dans des prélèvements d'égouts et se cultivant sur des amibes du genre *Hartmanella*. L'analyse des résultats phylogénétique nous a permis de montrer que les séquences de virus obtenues chez les culicoïdes du Sénégal sont apparentés à celle du *Faustovirus* isolé dans les égouts de Dakar, au Sénégal. Les résultats de cette analyse sont confirmés par ceux de la microscopie électronique montrant des particules de taille et de phorme compatible à celles du *Faustovirus*. Ainsi, les virions de la nouvelle souche « *Faustovirus-Culicoides* » ont été isolés chez l'hôte reconnu du *Faustovirus* (*Hartmanella vermiformis*).

En outre, l'analyse protéomique du repas sanguin des même *Culicoides* a révélé des origines trophiques chez des bovins, des rongeurs et des humains. L'analyse des prélèvements provenant de ces préférences throphiques a montré la présence du *Faustovirus*. L'identification confirmée du virus chez les hotes préférentiels des *Culicoides* pourrait suggérer une infection possible de *Culicoides* chez les hotes infectés lors de leur repas sanguin.

En somme, cette étude nous a permis d'accréménter le répertoire des virus associés aux culicoïdes, mais également de mettre en évidence le rôle des faunes domestique, sauvage et culicoïdien dans le cycle de maintien du virus dans l'environnement.



Faustovirus-Like Asfarvirus in Hematophagous Biting Midges and Their Vertebrate Hosts

Sarah Temmam¹, Sonia Monteil-Bouchard¹, Masse Sambou², Maxence Aubadie-Ladrix², Saïd Azza¹, Philippe Decloquement¹, Jacques Y. Bou Khalil¹, Jean-Pierre Baudoin¹, Priscilla Jardot¹, Catherine Robert¹, Bernard La Scola^{1,3}, Oleg Y. Mediannikov¹, Didier Raoult^{1,3} and Christelle Desnues^{1*}

¹ Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM63 Centre National de la Recherche Scientifique 7278 IRD 198 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1095, Aix-Marseille Université, Marseille, France, ² Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM63 Centre National de la Recherche Scientifique 7278 IRD 198 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1095, Aix-Marseille Université, Dakar, Senegal, ³ Fondation IHU Méditerranée Infection, Pôle des Maladies Infectieuses et Tropicales Clinique et Biologique, Fédération de Bactériologie-Hygiène-Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire Timone, Méditerranée Infection, Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Gilbert Greub,
University of Lausanne, Switzerland

Reviewed by:

Vincent Thomas,
BIOASTER, France
Santhosh Chakkaramakkil Verghese,
Oregon Health and Science University,
USA

*Correspondence:

Christelle Desnues
christelle.desnues@univ-amu.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 17 September 2015

Accepted: 25 November 2015

Published: 16 December 2015

Citation:

Temmam S, Monteil-Bouchard S, Sambou M, Aubadie-Ladrix M, Azza S, Decloquement P, Bou Khalil JY, Baudoin J-P, Jardot P, Robert C, La Scola B, Mediannikov OY, Raoult D and Desnues C (2015) Faustovirus-Like Asfarvirus in Hematophagous Biting Midges and Their Vertebrate Hosts. *Front. Microbiol.* 6:1406. doi: 10.3389/fmicb.2015.01406

Faustovirus, a new *Asfarviridae*-related giant virus, was recently isolated in *Vermamoeba vermiformis*, a protist found in sewage water in various geographical locations and occasionally reported in human eye infection cases. As part of a global metagenomic analysis of viral communities existing in biting midges, we report here for the first time the identification and isolation of a Faustovirus-like virus in hematophagous arthropods and its detection in their animal hosts. The DNA virome analysis of three pools of *Culicoides* sp., engorged female *Culicoides imicola* and non-engorged male/female *C. imicola* biting midges collected in Senegal, revealed the presence of amoeba-infecting giant viruses and, among them, a majority of sequences related to Faustovirus. Phylogenetic analyses conducted on several structural genes of Faustovirus confirmed the clustering of the arthropod-borne Faustovirus with sewage-borne Faustoviruses, with a distinct geographical clustering of Senegalese Faustovirus strains. Transmission electron microscopy identified viral particles with morphologies and diameters which were compatible with Faustovirus. The presence of infectious arthropod-borne Faustovirus was finally confirmed by successful isolation on *V. vermiformis* amoeba. Global proteomic analysis of biting midges identified that arthropods' blood meal originating from cattle, rodents and humans. Further screening of cattle sera and rodent tissue resulted in prevalence of Faustovirus being estimated at 38% in rodents and 14% in cattle, suggesting a possible origin of Faustovirus presence in arthropods via the ingestion of contaminated blood meal. Viral loads were the highest in rodents' urine and kidney samples, suggesting a possible excretion of viral particles into the environment. Faustovirus DNA polymerase-related sequences were also detected in more than 9 and 11% of febrile patients and healthy Senegalese human sera, respectively. Our study thus, highlights the need to investigate the role of arthropods, wildlife, and domestic animals in the lifecycle of amoeba-infecting giant viruses and, in particular, the environmental cycle of Faustovirus.

Keywords: biting midges, giant virus, faustovirus, bloodmeal host, environment

INTRODUCTION

Large double-stranded (ds)DNA viruses, also known as “giant viruses,” form a monophyletic group consisting of *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Asfarviridae*, *Mimiviridae*, and *Marseilleviridae* families and are classified under the proposed *Megavirales* order (Colson et al., 2012, 2013). More recently, discovery of *Pandoravirus* and *Pithovirus* genera has been reported (Philippe et al., 2013; Legendre et al., 2014).

Protozoans, and especially amoebas, have been largely used as tools to isolate and cultivate a wide variety of micro-organisms, due to their lack of receptor-dependent infection and the ability of some bacteria and viruses to resist phagocytosis and to multiply in these organisms (Greub and Raoult, 2004). So far, giant viruses have been isolated on amoebae from various environments all over the world, mostly from water samples (Pagnier et al., 2013). Recently Faustovirus, a new virus closely related to the *Asfarviridae* family, has been isolated on *Vermamoeba vermiformis* protists in sewage water in various geographical locations (Reteno et al., 2015). *Asfarviridae* are a family of dsDNA viruses consisting of a unique member: the African swine fever virus (ASFV), the only known dsDNA virus transmitted by hematophagous arthropods, i.e., ticks.

Ceratopogonidae, and especially the genus *Culicoides*, are well-known vectors of several parasites (Agbolade et al., 2006; Slama et al., 2014) and viruses (Mellor et al., 2000) infecting animals and human (i.e., Bluetongue virus, African Horse Sickness virus, Epizootic Hemorrhagic Disease virus, and Oropouche virus, the only known human virus transmitted by biting midges). In sub-Saharan countries such as Senegal, biting midges usually feed on livestock but also on humans. Larval stages of *Culicoides* sp. are found in semi-aquatic environments (Harrup et al., 2013), leading to possible contact with amoebae and their associated giant viruses.

In the present study, we report for the first time the detection, isolation, and environmental exploration of Faustovirus in adult *Culicoides* sp. biting midges.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection and Ethical Statement Arthropods

Biting midges were collected using a modified CDC light trap as previously described (Sambou et al., 2015), in the villages of Dielmo and Ndiop in the Sine-Saloum region of Senegal, in November 2013 (Figure 1). Traps were placed near places where cattle rested and were left overnight. Morphological identification of the arthropods was conducted the next morning, as previously described by Sambou et al. (2015). Three types of arthropod pools were created: the STE0043 pool consisted of more than 200 adult *Culicoides* sp., with no distinction between male and female, nor their gorged status; STE0044 and STE0045 pools consisted of 15 engorged female and 100 non-engorged male and female *Culicoides imicola*, respectively. Arthropods were immediately stored in liquid nitrogen directly in the field.

All these pools were collected from the same concession in Dielmo during the same night.

Hard ticks collected from cattle were harvested and directly stored in liquid nitrogen in pools according to their animal origin.

Cattle

Cattle sera were collected from animals at the same location as the CDC light traps used to sample biting midges. These were also immediately stored in liquid nitrogen.

Rodents

Rodent trapping was conducted at the same place: traps were left open overnight, and small mammals were sacrificed the next morning by cervical dislocation, according to the guidelines for the handling of wild mammals (Sikes and Gannon, 2011). All animal procedures carried out in this study were approved by the IRD Local Ethics Committee. The spleen, lungs, kidney, liver, brain, bladder, intestine, and serum were collected from trapped animals and directly stored individually in liquid nitrogen. Species identification of trapped small mammals was conducted by sequencing the 18S rRNA, as previously described (Breitbart and Rohwer, 2005).

Water

Drinking water collected from wells in the two rural villages of Dielmo and Ndiop, and water collected from the Néma river in Dielmo were filtered through a 0.80- μ m filter, followed by a 0.45- μ m filter (Millipore, Molsheim, France). 10% (w/v) of PolyEthylenGlycol (PEG6000, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 300 mM NaCl (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were then added to precipitate viral particles and were incubated overnight at +4°C. After centrifugation at 12,000 g for 20 min, the final pellet was resuspended in 2 mL of 0.02 μ m-filtered PBS and stored in aliquots at –80°C.

Human

Human sera were collected through the Point-of-Care (POC) laboratory in Dielmo (Sokhna et al., 2013). One hundred and twelve sera from febrile people with no known etiology and 51 sera from healthy people were collected between November 2013 and June 2014. The National Ethics Committee of Senegal approved the most recent protocol, including the POC laboratory and activities, under the “Avis éthique et scientifique n°00081 du 04 juin 2012.”

Sample Processing

Fifty microliters of cattle sera, up to 20 μ L of rodent urine and 100 μ L of PEGylated water pellets were used to extract total nucleic acids using the High Pure Viral Nucleic Acids kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions.

Approximately 0.5 cm³ of rodent tissues and up to five hard ticks were crushed in pools with two 3-mm tungsten beads and a TissueLyser at 25 Hz for 2 min (Qiagen, Courtaboeuf, France) in 2 mL of sterile EMEM (Life Technologies, Saint Aubin,



FIGURE 1 | Sampling sites.

France). Two hundred microliters of clarified supernatant was then processed for nucleic acid extraction as for cattle sera.

Total nucleic acids from human sera were previously extracted within the POC laboratory in Dielmo. Briefly, 200 μ L of human capillary blood was extracted using the Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France), according to the manufacturer's recommendations.

Virome Preparation

The three pools of arthropods were crushed with two 3-mm tungsten beads and a TissueLyser at 25 Hz for 2 min (Qiagen, Courtaboeuf, France). The clarified supernatant was subsequently used as a template for virome preparation.

DNA viromes were prepared to purify viral particles from their complex sample. Briefly, the clarified supernatant was filtered through a 0.45- μ m filter (Millipore, Molsheim, France), and free nucleic acids were digested with a cocktail of nucleases, i.e., 20U of Turbo DNase (Life Technologies, Saint Aubin, France), 25U of RNase A (Roche Diagnostics, Meylan, France), 25U of Benzonase[®] (Merck Millipore, Molsheim, France) and 20U of Exonuclease I (New England Biolabs, Évry, France), as previously described (Temmam et al., 2015). Finally, the digested supernatant was purified onto a discontinuous 66–30% sucrose gradient and ultracentrifuged at 130,000 g for 2 h at +4°C on a MLS-50 rotor (Beckman-Coulter, Villepinte, France). The viral fraction was harvested at the interphase between the 66 and 30% sucrose layers.

DNA was extracted from the purified viral fraction using Trizol LS[®] reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France), according to the manufacturer's recommendations, and was randomly amplified using a Genomiphi V3 kit (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) in two independent reactions. Amplification products were pooled and purified with Agencourt AMPure Beads (Beckman-Coulter, Villepinte, France) according

to the manufacturer's protocol, eluted to a final volume of 15 μ L and sequenced using MiSeq Technology with the paired-end and barcode strategies according to a Nextera XT library kit in a 2 $\times$ 300 bp format (Illumina Inc., San Diego, USA).

Bioinformatic Analyses of Viromes

Raw reads were imported in pairs into CLC Genomics Workbench 6.0.1 program (CLC Bio, Aarhus, Denmark) and trimmed according to their quality score, the presence of ambiguities, and their length (reads <50 nt long were discarded). The pre-processed viral metagenomes are publicly available on the Metavir server (<http://metavir-meb.univ-bpclermont.fr>) under the project "Arthrovirome" project and on the MG-RAST server (<http://metagenomics.anl.gov/>) with the identifiers 4604224.3, 4604225.3, and 4604226.3 for the STE0043, STE0044, and STE0045 DNA viromes, respectively.

Cleaned paired reads were assembled into contigs with the CLC Genomics program using the following parameters: a word size of 20 nt, minimum contig length of 200 nt, mismatch cost of 2, insertion/deletion cost of 3, length fraction of 0.5, and similarity fraction of 0.8. Contigs and non-assembled reads were then compared to the NCBI nucleotide database using the BlastN algorithm, with a minimum coverage of 50%, minimum identity of 50%, and an *E*-value <10^{−5}. Sequences with no significant hits according to the criteria described above were classified as "unknown." Contigs were then compared to the *Megavirales* database (Verneau et al. [METADIG: an automated pipeline to search for giant virus-related sequences in metagenomes. *In revision*]) using the BlastX program with a minimum coverage of 50%, minimum identity of 50%, and an *E*-value <10^{−5}. To confirm the specificity of the BlastX result, contigs were finally compared to the NCBI RefSeq viral database and to the whole NCBI database under the same criteria. The taxonomic

assignment of contigs was conducted by selecting the best BlastX score result between the three Blasts run for each contig.

Phylogenetic Analyses

Contigs matching with amoeba-infecting giant viruses were extracted and translated using the FragGeneScan tool (Rho et al., 2010), according to the “short” and “complete” parameters. Predicted Open Reading Frames (ORF) were then compared to the *Megavirales* database using the BlastP program to identify *Megavirales* core genes. Phylogenetic analyses were performed on the amino-acid sequences of the RNA diphosphate reductase large sub-unit and the nucleotide sequence of the sub-unit common to RNA polymerase I–II–III, the DNA topoisomerase and the putative helicase C962R of Faustovirus.

Amino-acid and nucleotide sequences were retrieved from the GenBank database and aligned with the MUSCLE aligner (Edgar, 2004) implemented through MEGA6 (Tamura et al., 2013). The DNA/amino-acid substitutions model that best fitted the data were performed on MEGA6 (Tamura et al., 2013) and were considered for all phylogenetic analyses. We selected the best substitution model using the corrected Akaike information criterion. Phylogenetic trees were constructed by Maximum Likelihood (ML) implemented through the MEGA6 package software, according to the selected substitution model. Nodal support was evaluated by 1000 bootstrap replicates.

Detection of Faustovirus in Animal, Human, and Environmental Samples

Quantitative SYBR Green real-time PCR targeting the DNA polymerase of Faustovirus was performed with the Quantitect SYBR Green qPCR kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's recommendations, except that 400 nM of forward (5'-CAAAGGCTATTGAGGCGATTG-3') and reverse (5'-ATGATTGTGCTGCTAGGATACC-3') primers were used and mixed with 5 µl of DNA. Annealing temperature was defined as 58°C.

A standard curve was generated after extraction of serial dilutions of a flow cytometer-quantified Faustovirus. Briefly, the quantification was realized using a suspension of concentration-calibrated Cytocount™ fluorescent beads (Dako, Les Ulis, France) and the following formula: (number of counted particles / number of counted beads) × bead concentration (i.e., 1100 beads/µL), as previously reported (Khan et al., 2010). The resulting count was expressed in Virus-Like Particles (VLP) per mL. Dilutions of the quantified virus were performed, and nucleic acids were extracted from each dilution and further used as template for the qPCR standard curve.

Primers targeting Faustovirus RNA polymerase and DNA topoisomerase were designed according to the metagenomes sequences: Fausto_RNApol_F (5'-TACGTCAAGCAGTAG CCAACG-3'), Fausto_RNApol_R (5'-CTACTTGCCG CACAACAGCC-3'), Fausto_DNAtopo_F (5'-CCAGC ACCATATGACACGCG-3') and Fausto_DNAtopo_R (5'-AATGTATGCGTTCGATTGCGC-3'). PCR targeting Faustovirus RNA polymerase, DNA topoisomerase and capsid (Reteno et al., 2015) were performed using the Hot

Star Taq DNA polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France). Annealing temperatures were 57°C, 57°C, and 58°C, respectively.

All PCR products were further analyzed on a 2% agarose gel, and bands of the expected size were extracted from the gel, purified using the QIAex Gel Extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sequenced with a Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Saint Aubin, France) and an ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, Saint Aubin, France).

Total Protein Extraction, Western Blot, and Global Proteomic Analyses

Approximately 50 mg of arthropods from the STE0043 sample were crushed in 300 µL of lysis buffer (Tris-HCl 40 mM pH 7.5, SDS 2% (w/v), DTT 60 mM) with two 3-mm tungsten beads and a TissueLyser at 25 Hz for 2 min (Qiagen, Courtaboeuf, France) before heating at 95°C for 5 min. Proteins from the clarified supernatant were precipitated using the PlusOne 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). The final pellet was resuspended in 200 µL of solubilization buffer (Urea 8M, Thiourea 2M, 100 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8.2) and dialyzed twice using Slide-ALyzer Dialysis Cassettes 2K MWCO (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) against 1 L of 50 mM ammonium bicarbonate pH 7.4, Urea 1M (7 h and overnight). Dialyzed fractions were collected and proteins were quantified by Bradford assay using Coomassie (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The dialyzed fraction was subsequently used as a template for global proteomics and western blot analyses.

Two hundred micrograms of soluble proteins were fractionated on a 12% polyacrylamide gel electrophoresis then revealed by silver staining. Additionally, resolved proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Trans-blot Transfer Medium, Biorad, Hercules, CA, USA) at 100 V for 1 h using a semi-dry transfer unit (Hoefer TE 77, GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). Membranes were then blocked in PBS supplemented with 0.3% Tween-20 and 5% non-fat dried milk (PBS-Tween-Milk) for 90 min, and incubated with mouse polyclonal anti-Faustovirus antibodies (1:1000). The immunoreactive bands were detected using a peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) diluted to 1:5000 in the blocking buffer for 1 h at room temperature. Three fifteen minutes washes were applied between each step. Immunostained bands were visualized with the chemiluminescence-based kit, as described by the manufacturer (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). The resulting signal was captured by a Fusion FX7 imaging system (Vilber Lourmat, France).

Six pieces corresponding to immunoreactive bands were excised from silver stained gel and subject to mass spectrometry (MS) analysis. Briefly, after several washes, the proteins extracted from the gel were reduced, alkylated and digested with trypsin, as described above. Tryptic peptides were extracted with acetonitrile 100%; the extraction solution was collected and incubated at 45°C to evaporate the acetonitrile and to concentrate it prior to MS analysis. An additional global proteomic analysis was conducted. Briefly, 200 µg of total soluble proteins were

reduced and alkylated with iodoacetamide. Protein digestion was performed by adding 8 µg of sequencing-grade trypsin solution (Promega, Charbonnières, France) to alkylated proteins and incubated overnight at 37°C. The digested sample was then desalted using Pierce Detergent Removal Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and analyzed by mass spectrometry, as described hereafter.

A NanoAcquity UPLC System (Waters, Saint-Quentin En Yvelines, France) was coupled with a Synapt-G2 Si HDMS with Traveling-Wave-Ion-Mobility Mass Spectrometry instrument (TWIM-MS; Waters, Saint-Quentin En Yvelines, France). Chromatographic separation was performed on an NanoAcquity UPLC BEH130 C18 column (1.7 µm, 100 µm × 100 mm; Waters, Saint-Quentin En Yvelines, France) preceded by a Symmetry C18 trapping column (5 µm, 180 µm × 20 mm); both were placed in a 40°C oven. The injection volume was set to 2 µL for the digested soluble proteins (200 ng/µL) and 4 µL for gel-extracted proteins. The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B) both in 0.1% formic acid. Samples were trapped over 3 min with 99.9% A and 0.1% B. The separation gradient was as follows: 0–100 min, linear from 95% A, 5% B, to 60% A, and 40% B; 100–107 min. Mass spectrometry experiments were performed in positive ion mode and in resolution mode. The settings of the instruments were automatically optimized to obtain the best resolution. The ion source parameters were capillary voltage 3 kV, sampling cone voltage 40 V, ion source temperature 90°C and cone gas flow 50 L/h. Transfer collision low energy was set to 5 V while trap collision low energy was set to 4 V. The high energy ramp was applied from 4 to 5 V for the trap collision and from 19 to 45 V for the transfer collision, enabling fragmentation of the ions after the ion mobility cell and before the time-of-flight (TOF) MS. The instrument was previously calibrated in the mass range of 50–2000 Da using GFP fragments (0.2 pmol/µL). Data were processed using ProteinLynx Global Server version 3.0.1 (Waters, Saint-Quentin En Yvelines, France). Processing parameters were 250 counts for the low energy threshold, 100 counts for the elevated energy threshold and 750 counts for the intensity threshold.

Databases used to compare spectra combined data from Mammalia (2015/Feb/09, Swissprot, 66,370 sequences), Diptera (2015/Feb/09, Swissprot, 6607 sequences), and giant viruses (2015/Feb/06, TrEMBL and not published giant viruses sequences, 14,866 sequences). An additional database was generated using predicted ORFs generated following the FragGeneScan analysis of giant viral contigs of the three metagenomes. A cut-off was used to remove the matches with only one and two peptides and the option of Merge Data was used with the six gel pieces.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Approximately 50 mg of arthropods from the STE0043 sample were washed in 70% ethanol, as previously described (Slimani et al., 2013) and crushed in 2 mL of sterile EMEM medium (Life Technologies, Saint Aubin, France) using two 3-mm tungsten beads and a TissueLyser at 25 Hz for 2 min (Qiagen, Courtaboeuf, France). The supernatant was harvested after a low speed clarification and subsequently filtered through a 0.8-µm filter

(Millipore, Molsheim, France). The resulting supernatant was purified onto a discontinuous 66–30% sucrose gradient and ultracentrifuged at 130,000 g for 2 h at +4°C, as described above.

The viral fraction was harvested at the interphase between the 66 and 30% sucrose layers and fixed for 1 h at +4°C with 2% final glutaraldehyde. The fixed viral fraction was then diluted to a final volume of 4 mL in PBS, and adsorbed directly onto formvar carbon films on 400 mesh nickel grids (FCF400-Ni, EMS) by ultracentrifugation at 130,000 g for 1 h at +4°C, as previously described (Sime-Ngando et al., 1996). Grids were stained for 10 s with 1% molybdate solution in filtered water at room temperature. Electron micrographs were obtained on a Tecnai G2 transmission electron microscope (FEI) operated at 200 keV equipped with a 4096 × 4096 pixel resolution Eagle camera (FEI).

Isolation of Viruses on Amoebae

Approximately 50 mg of arthropods from the STE0043 sample were washed in 70% ethanol, as previously described (Slimani et al., 2013), then with sterile Page's amoebal saline (PAS) solution, and finally crushed in 3 mL of PAS buffer.

V. vermiformis (CDC19 strain) amoebae were used to isolate giant viruses from arthropods, as reported by Pagnier et al. (2013), except that Vancomycin 10 µg/mL, Ciprofloxacin 20 µg/mL, Imipenem/cilastatin 10 µg/mL, Doxycycline 20 µg/mL, and Voriconazole 20 µg/mL were added to the amoebal suspensions to prevent bacterial and fungal contamination. Briefly, amoebae were cultivated in peptone-yeast extract-glucose (PYG) medium and sub-cultured every 2 days. 5×10^5 amoebae/mL were concomitantly plated in a 12-well microplate with 100 µL of the sample suspension and incubated at 30°C for 3 days. At Day 3 post-infection, the primo-culture was sub-cultured onto a fresh amoebal microplate suspension under the same conditions. The primary cultures and sub-cultures were screened daily for a cytopathogenic effect (CPE) using an inverted microscope and if CPEs were observed, fresh amoeba cells were cytopinned with 100 µL of viral supernatant and further stained with Gimenez and Gram stains, followed by additional Hemacolor staining (Merck, Darmstadt, Germany).

Additionally, 100 µL of positive CPE supernatant was used to extract DNA using the phenol chloroform isoamyl alcohol extraction procedure (Life Technologies, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's protocol, and PCRs targeting Faustovirus were conducted, as described above.

RESULTS

Presence and Diversity of Sequences Related to Giant Viruses in the Virome of Biting Midges

The DNA virome of the STE0043, STE0044, and STE0045 samples were sequenced using Illumina MiSeq technology. After trimming, the total number of reads was 1,517,965, 2,163,868, and 2,265,552 reads, respectively (Table 1), with 46.29, 76.01, and 48.50% of sequences having homologies after BlastN

TABLE 1 | Sequencing data of the virome datasets.

	STE0043 <i>Culicoides</i> sp.	STE0044C. <i>imicola</i> ♀engorged	STE0045 C. <i>imicola</i> ♂♀non-engorged
Raw reads	1,520,202	2,173,228	2,267,752
Cleaned reads	1,517,965	2,163,868	2,265,552
Contigs	19,771	29,995	28,309
Singletons	85,185	134,230	122,805
Average contig length	615 bp	587 bp	581 bp
Total assigned reads:	702,730	1,644,792	1,098,862
eukaryote	576,221	1,457,350	781,498
prokaryote (bacteria + archaea)	122,075	164,982	303,928
virus	4434	22,460	13,436
Total giant viruses:	3465	20,745	4684
Faustovirus	3146	8383	3490
Mimiviridae	317	12,362	1164
Non-classified giant viruses	2	0	30
Other viruses:	969	1715	8752
Nudiviridae	307	0	6237
Poxviridae	182	42	34
Siphoviridae	182	503	808
Non-classified phages	156	277	240
Myoviridae	60	554	785
Papillomaviridae	41	100	2
Iridoviridae	29	0	0
Podoviridae	4	45	29
Phycodnaviridae	2	90	133
Polydnaviridae	2	0	0
Retroviridae	2	92	16
Non-classified plant viruses	2	0	0
Ascoviridae	0	12	2
Herpesviridae	0	0	315
Inoviridae	0	0	149
Iflaviridae	0	0	2

against GenBank nt database, respectively. Eukaryotic sequences represented more than 70% of the total assigned reads in the STE0043, STE0044, and STE0045 metagenomes, mainly identified as human and arthropod reads (Table 1).

Among the total assigned reads, 4434 (STE0043), 22,460 (STE0044), and 13,434 (STE0045) sequences were related to viruses (Table 1). Most viral sequences were identified as double-stranded DNA viruses, and single-stranded DNA viral sequences were only detected in STE0045 non-engorged male and female *C. imicola* virome. Sequences related to amoeba-infecting giant viruses from the *Mimiviridae* family, Faustovirus and the non-taxonomically classified Pandoravirus represented the majority of viral reads, with more than 78, 92, and 34% of total viral reads,

respectively, for STE0043, STE0044, and STE0045 viromes. The most represented virus was Faustovirus, with more than 90, 40, and 74% of total giant viral reads, respectively (Table 1).

The presence of Faustovirus in each sample was confirmed by PCR specifically targeting the DNA polymerase, the viral capsid, the RNA polymerase and the DNA topoisomerase genes of the virus. PCR amplification products were obtained for the three metagenomes (see Supplemental Figure 1 for the capsid amplification) and Faustovirus amplifications were confirmed by sequencing.

The presence of amoeba-infecting giant viral sequences was searched on previously published arthropods metagenomes available in public databases (Table 2). Sequences from both hematophagous (mosquitoes, hard ticks, and body lice) and non-hematophagous (termites and whiteflies) arthropods were assembled into contigs and compared to an in-house giant viral database. Mosquito microbiomes showed the presence of *Mimiviridae* and *Pandoraviridae*-related contigs in all of the five studies, although these came from arthropods sampled at different time points in different locations. Hard ticks and experimentally-infected body lice metagenomics revealed also the presence of *Mimiviridae*-related contigs. In contrast, termites and whiteflies metagenomic datasets did not present any amoeba-infecting giant viral contigs. No Faustovirus-related sequences were retrieved in metagenomes, either from hematophagous or non-hematophagous arthropods.

Phylogenetic Analyses of the Faustovirus-Like Virus Identified in the Virome of Biting Midges

Contigs matching with Faustovirus sequences were extracted and translated. Results of the predicted ORFs are presented in Table 3. Phylogenetic reconstructions were performed on several conserved genes: the RNA diphosphate reductase large sub-unit and the sub-unit common to RNA polymerase I–II–III that were found in the three biting midges' metagenomes, the DNA topoisomerase only detected on the STE0043 *Culicoides* sp. virome and the putative helicase C962R, both present in the STE0044 *C. imicola* engorged female and the STE0045 *C. imicola* non-engorged male/female viromes.

Phylogenetic analyses performed on the sub-unit common to RNA polymerase I–II–III (Figure 2A) and on the RNA diphosphate reductase large sub-unit genes (Figure 2B) showed that the biting midges' Faustovirus grouped with other Faustoviruses isolated from French, Senegalese and Lebanese sewage. More precisely, Senegalese biting midges' Faustovirus formed a cluster with Dakar sewage Faustovirus, supported by high bootstrap nodes (100 and 95, respectively). These results were confirmed with phylogenetic analyses performed on the DNA topoisomerase (Supplemental Figure 2A) and the putative helicase C962R (Supplemental Figure 2B) genes.

Phylogeny performed on the RNA diphosphate reductase large sub-unit gene allowed distinguishing a specific cluster composed of biting midges Faustovirus only within the Senegalese Faustovirus clade, with a high bootstrap value of 78 (Figure 2B).

TABLE 2 | Search for the presence of amoeba-infecting giant viral sequences in the metagenomes of other arthropods.

Arthropods	Nb of total reads	Nb of contigs	Sequencing method	Type of metagenome	Amoeba-infecting giant viral contig (nb)	References
Mosquitoes	1,575,043	1964	Roche 454 FLX	RNA shotgun	<i>Mimiviridae</i> (1)	Bishop-Lilly et al., 2010
	1,961,290	16,321	Roche 454 GS20	DNA shotgun	<i>Mimiviridae</i> (1) <i>Pandoraviridae</i> (1)	Dinsdale et al., 2008
	26,403,284	89,744	Illumina GA II	RNA shotgun	<i>Mimiviridae</i> (8) <i>Pandoraviridae</i> (10)	Chandler et al., 2014
	217,330,434	311,750	Illumina HiSeq 2000	RNA shotgun	<i>Mimiviridae</i> (13) <i>Pandoraviridae</i> (19)	Chandler et al., 2015
	1,576,489	15,666	Roche 454 GS20	DNA shotgun	<i>Mimiviridae</i> (1) <i>Pandoraviridae</i> (2)	Ng et al., 2011
Body lice	4,403,873	1733	Illumina MiSeq	RNA shotgun	<i>Mimiviridae</i> (5)	Temmam et al., 2015
Whiteflies	1,427,809	193	Illumina GA II	RNA shotgun	0	Rosario et al., 2014
Termites	–	57,641	Sanger	DNA shotgun	0	Warnecke et al., 2007
Hard ticks	350,329	31,881	Roche 454 FLX	DNA shotgun	<i>Mimiviridae</i> (1)	Nakao et al., 2013

TABLE 3 | Predicted ORFs for Faustovirus detected in the three metagenomes.

	STE0043		STE0044		STE0045	
	Short	Complete	Short	Complete	Short	Complete
Total contigs/reads	79/3146		137/8383		114/3490	
TOTAL ORFs	93	87	148	145	127	125
Hypothetical protein	83	70	125	122	105	103
62 kDa polyprotein	–	–	1	1	1	1
Ankyrin containing protein	–	–	1	1	1	1
Bacterial MORN repeat-containing protein	–	2	2	2	–	–
BTB/POZ domain-containing protein	–	–	1	1	2	2
BTB/POZ domain-containing protein 9	1	–	1	1	–	–
Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	–	–	2	2	–	–
DNA topoisomerase small subunit	–	1	–	–	–	–
Glutaredoxin-C3	2	–	–	–	2	2
Helicase	–	–	–	–	1	1
Metallophos_2 containing protein	2	–	–	–	–	–
MORN repeat-containing protein	3	8	2	2	4	4
mRNA-decapping protein g5R	–	1	–	–	–	–
Patatin	–	–	–	–	1	1
Putative ATP-dependent RNA helicase L377	–	1	–	–	–	–
Putative ATP-dependent RNA helicase R563	–	1	–	–	–	–
Putative DNA polymerase family X	–	–	1	1	–	–
Putative DNA-directed RNA polymerase subunit D	–	1	–	–	–	–
Putative helicase C962R	–	–	2	2	2	2
Putative histidinol-phosphate aminotransferase	–	–	–	–	1	1
Putative hydrolase	–	–	1	1	–	–
Putative phosphatidylglycerophosphate synthase	–	–	1	1	–	–
Putative poly(A) polymerase catalytic subunit	–	–	–	–	1	1
Putative T4-like proximal tail fiber	–	–	1	1	–	–
Putative UV-damage endonuclease	–	–	2	2	–	–
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	1	–	2	2	2	2
Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain	–	–	1	1	–	–
RNA polymerase II subunit Rpb5b	–	1	–	–	–	–
Subunit common to RNA polymerases I, II, and III	1	–	2	2	3	3
Translation initiation factor SUI1	–	1	–	–	–	–
Transcription factor S-II-related protein	–	–	–	–	1	1

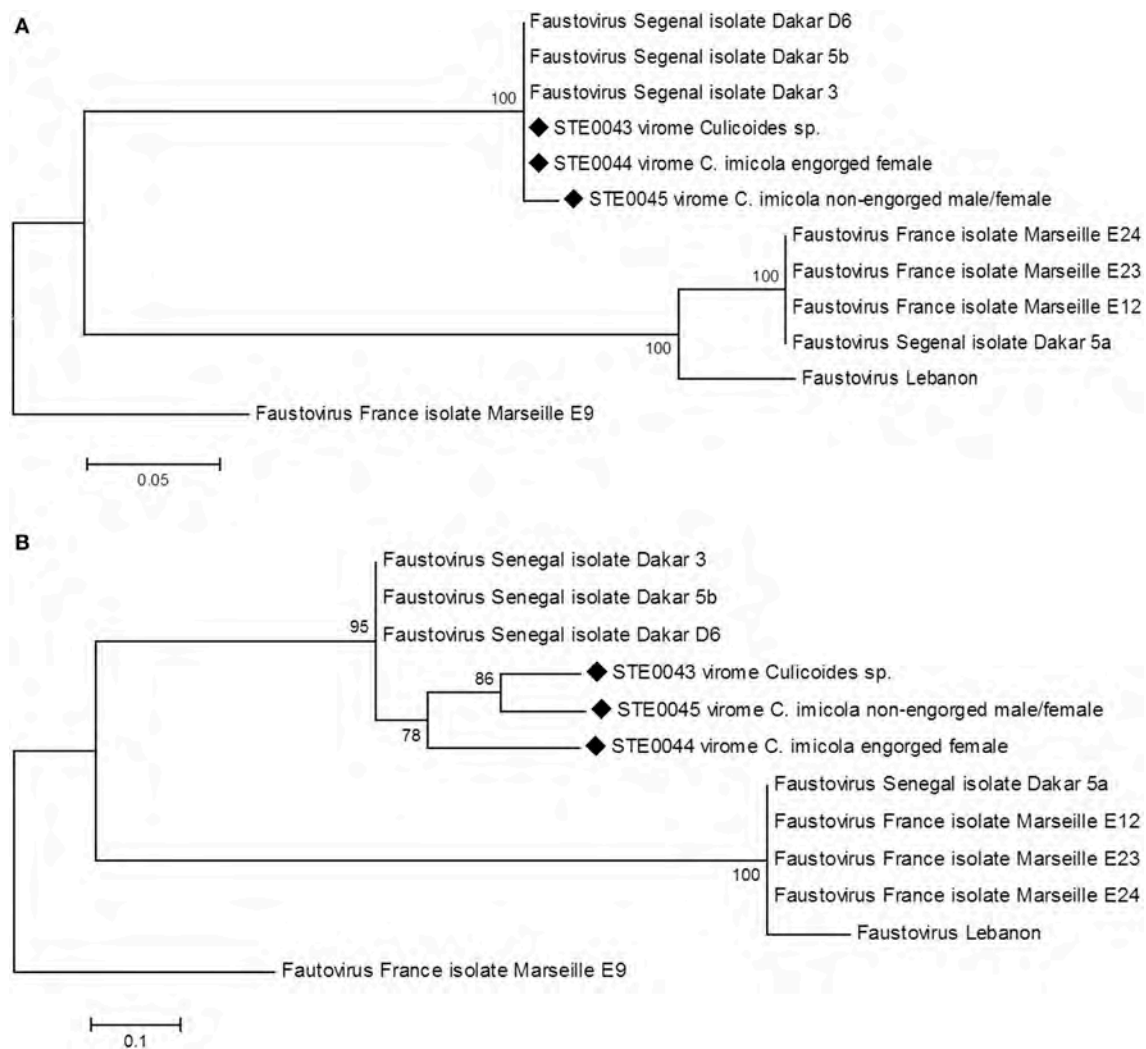


FIGURE 2 | Phylogenetic reconstruction of Faustovirus detected in biting midges' viromes based on the (A) nucleotide sequence of the sub-unit common to RNA polymerase I–II–III (substitution model: Kimura-2-parameters) (B) amino-acid sequence of the RNA diphosphate reductase large sub-unit (substitution model: JTT+G, G = 3).

Observation of Virus-Like Particles by Transmission Electron-Microscopy and Isolation of a Faustovirus-Like Virus from Biting Midges

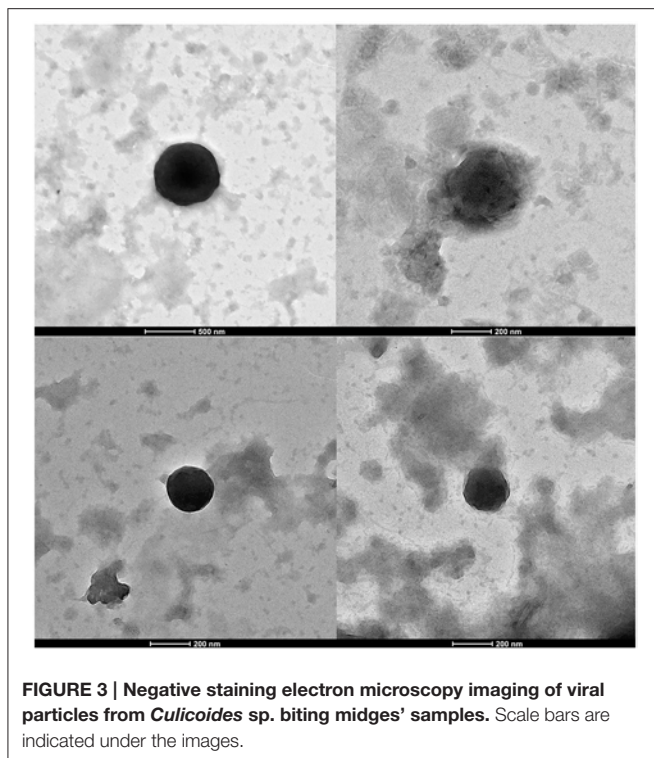
Viral particles purified from biting midges were negatively stained and observed by transmission electron microscopy (Figure 3). Virus-like particles were observed with different morphologies and diameters, ranging from 600 (Figure 3A) to 200 nm (Figure 3D). Some of the observed virions had a diameter (approximately 200 nm) and morphology (icosahedral capsid) compatible with that of Faustovirus (Figure 3D).

V. vermiformis protists was used in an attempt to isolate Faustovirus-related viruses detected in STE0043 *Culicoides* sp. virome. One *V. vermiformis* sub-culture was Faustovirus PCR-positive at Day 3 post-infection, and sequencing of a fraction of the capsid gene confirmed that the isolated virus was Faustovirus.

However, successful viral production was impaired due to the high bacterial load present in the culture, originating from the arthropods' guts.

Global Proteomics of Biting Midges

Western blot analysis of STE0043 proteins revealed an immunoreactive smear, between 260 and 50 kDa, with anti-Faustovirus polyclonal antibodies (Figure 4B). The smear was due to a high load of proteins (200 µg) allowing the detection of viral proteins in very low abundance in these arthropods. As shown in Figure 4C, with a loading of 5 µg, no detection was possible in arthropods, although the positive control revealed reactive bands. Within this smear, a putative band at 60 kDa was observed for Faustovirus, possibly corresponding to the viral capsid (arrow of Figure 4B). Six pieces of electrophoresis-fractionated proteins among the immunoreactive smear were



subsequently extracted from the gel and analyzed by proteomics (Figure 4A).

The global proteomic analysis of the six immunoreactive bands identified 4576 different peptides. Many peptides were not identified, due to incomplete databases. The major identified proteins were related to blood tissues: indeed, nearly a quarter of the total identified peptides represented blood proteins components, i.e., serum albumin, hemoglobin and fibrinogen, which represented 5.44, 15.57, and 0.90% of the total identified peptides, respectively. Numerous arthropod-borne peptides (33.77%) were also identified, and more than two thirds of identified peptides were related to the arthropods' major blood meal hosts: *Bovidae* represented 25.00% of the total identified peptides, 15.77% for humans, and 11.42% for *Rodentia*. Less abundantly, 2.95% of peptides were identified as coming from horses, 2.80% from pets (cats and dogs), 1.99% from *Lagomorpha* (mainly rabbits), 1.17% from swine, 1.05% from primates, and 0.87% from *Chiroptera*. Interestingly and although no peptide matching with Faustovirus was detected, three peptides matched with the viral proteome of Saudian virus, a new giant virus isolated from sewage, were detected.

Similar results were obtained for the whole proteomic analysis, with slight differences in the proportions of identified peptides, except that four and seven peptides were obtained for Kroon virus and Courdo11 *Mimiviridae* proteins, respectively (Yousuf et al., 2014; Boratto et al., 2015). In addition, *Mimiviridae*-related sequences were obtained in the metagenomes (data not shown). No match with Faustovirus was obtained.

No hit were obtained when comparing the peptides to the virome-predicted ORFs database.

Detection of Faustovirus in Animals and Environmental Water

The serum from 14 cattle and their associated hard ticks, 13 rodents (four suckling mice and nine *Arvicanthis* sp.), well water from Dielmo and Ndiop, and Néma river water recovered in Dielmo were collected and used to screen for the presence of Faustovirus.

The presence of Faustovirus was detected in five over 13 rodents tested: two were from suckling mice trapped in Ndiop and three were from *Arvicanthis* sp. rodents trapped in Ndiop ($N = 2$) and Dielmo ($N = 1$) respectively. Additionally, Faustovirus was detected in two over 14 cattle sera (one from Ndiop on a healthy cattle and one from Dielmo on a lumpy skin disease-infected veal). Faustovirus was also present in environmental water in both well and river waters from Dielmo and well water from Ndiop.

Two pools of hard ticks (*Boophilus* sp. and *Rhipicephalus evertsi*) collected from the same cattle in Keur Samba Gueye, a village close to Ndiop, were also positive for Faustovirus although the animal serum was negative. One pool of *Amblyomma* sp. hard ticks, collected from cattle in Ndiop, and one pool of *Ornithodoros sonrai* soft ticks, collected from rodents' nests in Keru Serigne Korka (a village located 12 km north-east of Dielmo) were also positive.

These positive detections were all confirmed by sequencing the portion of the DNA polymerase and the capsid genes of Faustovirus. Phylogenetic analyses of rodent-borne, cattle-borne, and water-borne Faustovirus performed on the capsid gene confirmed the relatedness of environmental and mammalian Faustovirus with arthropod-borne Faustovirus, but was not sufficiently discriminant to specifically define clusters of Senegalese Faustovirus (data not shown).

Viral loads of Faustovirus in PCR-positive animals were estimated according to the tissue sample (Figure 5A) and the animal species (Figure 5B). All harvested organs were positive for Faustovirus, in viral loads ranging from 3.49×10^5 VLP/mL (lung) to 8.01×10^6 VLP/mL (kidney), except for intestine samples which were all negative, even when the extracted DNA was diluted in case of the presence of inhibitors. Interestingly, Faustovirus quantification in kidneys was similar in scale to that in the bladder or urine samples (4.21×10^6 VLP/mL). Faustovirus load in cattle sera was estimated at 5.96×10^6 VLP/mL. Biting midges non-amplified viromes were detected with the highest viral loads, estimated at 2.47×10^7 VLP/mL (Figure 5A). No major difference was observed when analyzing the relative abundance of Faustovirus according to animal species (Figure 5B). *Arvicanthis*-positive animals presented the lowest (1.67×10^6 VLP/mL) and biting midges the highest (2.47×10^7 VLP/mL) Faustovirus load.

Detection of Faustovirus in Humans

The serum of 112 febrile patients with no known etiology and 51 healthy people was screened for the presence of Faustovirus with the DNA polymerase targeted system. A total of 11 out of 112 (9.82%) febrile patients and six out of 51 (11.76%) healthy persons were positive. Sequencing of the small PCR product (99 bp) confirmed the positive detection of Faustovirus on 57 bp.

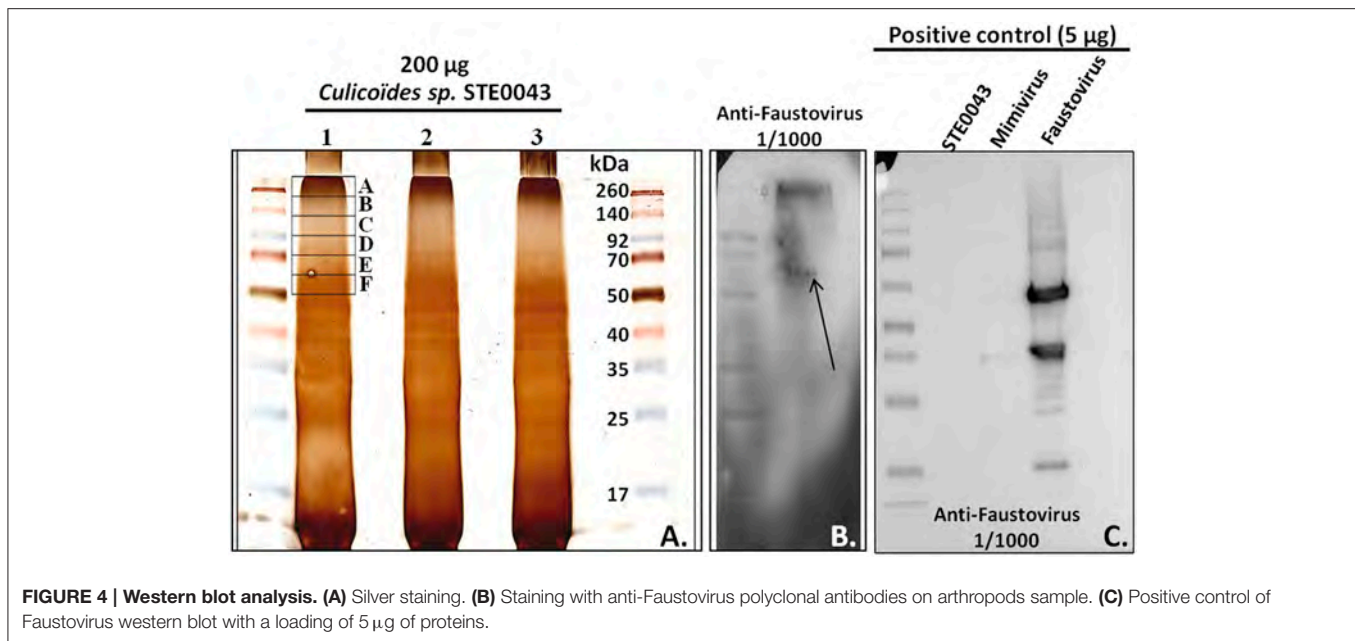


FIGURE 4 | Western blot analysis. (A) Silver staining. **(B)** Staining with anti-Faustovirus polyclonal antibodies on arthropods sample. **(C)** Positive control of Faustovirus western blot with a loading of 5 µg of proteins.

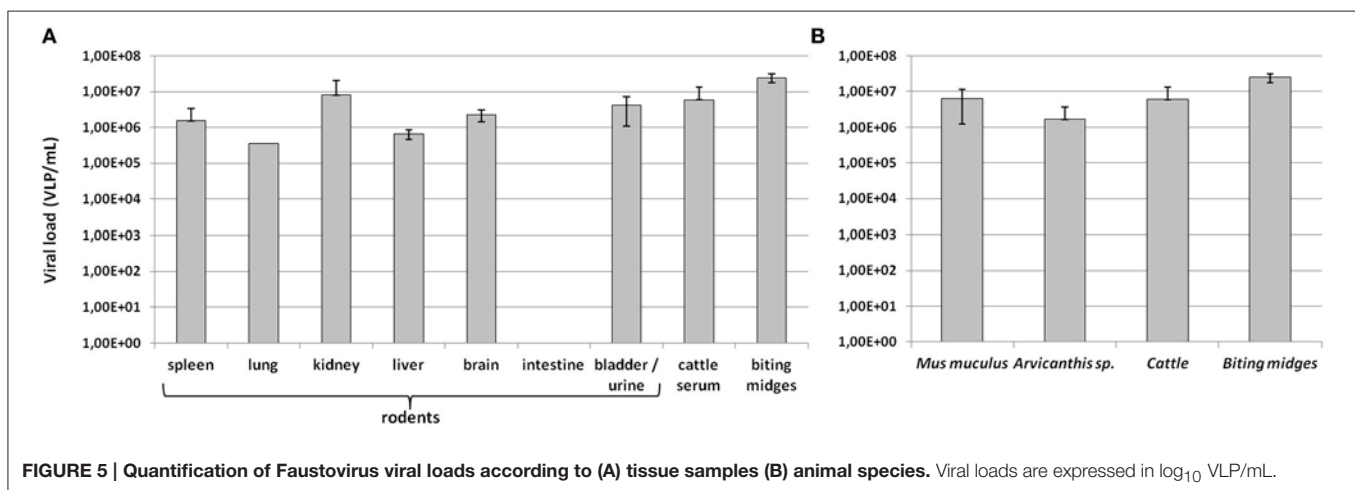


FIGURE 5 | Quantification of Faustovirus viral loads according to (A) tissue samples (B) animal species. Viral loads are expressed in log₁₀ VLP/mL.

Capsid and DNA topoisomerase amplifications of Faustovirus-positive human sera were negative and RNA polymerase amplification of Faustovirus-positive human sera resulted in a non-specific multi-band amplification (data not shown).

DISCUSSION

Amoeba-infecting giant viruses have been isolated in a wide variety of biomes, mostly in environmental (i.e., soil and water) samples (Pagnier et al., 2013). Various amoeba-infecting giant viruses have also been detected in animals, such as in arthropod larvae (Boughalmi et al., 2013a), in the leech *Hirudo medicinalis* (Boughalmi et al., 2013b) or in the sera of cattle and monkeys (Dornas et al., 2014). Recently, the first amoeba-infecting giant virus belonging to the *Asfarviridae* family, Faustovirus, was reported in sewage in various geographical locations (Reteno et al., 2015). The unique other member of the *Asfarviridae* family

is the ASFV, a tick-borne virus. In this study we detected and isolated for the first time Faustovirus in adults biting midges and their blood meal-associated mammals.

As part of a global study of viral communities existing in biting midges, pools of *Culicoides sp.*, engorged female *C. imicola* and non-engorged male and female *C. imicola* were collected and their corresponding DNA viromes were sequenced. Results revealed the presence of sequences related to giant viruses, mainly Faustovirus with more than 90, 40, and 74% of total giant viral reads, respectively. The presence of an amoeba-infecting *Asfarviridae*-like virus in adult biting midges leads us to question on the mode of contamination of adult biting midges. *Ceratopogonidae* are arthropods with an aquatic and semi-aquatic larval stage, leading to possible contact with amoebae and their associated giant viruses during the larval stage, and a putative trans-stadial transmission of free viral particles or infected amoebae. Moreover, Evans and Schwarz (2011) reported

the infection of adult honeybees by *Malpighamoeba mellificae*, a protozoan developing in the Malpighi tubes of honeybees. We can therefore hypothesize that, adult biting midges could either be infected at the larval or during the adult stage, either with free viral particles or infected amoebae. The mode of contamination of adult biting midges is currently unknown but further studies regarding the presence of Faustovirus in all stages of development of arthropods may help to solve this question.

The engorged female *C. imicola* virome showed the highest abundance of sequences related to Faustovirus, with significant differences with the non-engorged metagenome, suggesting a possible additional viral load of the arthropod via the blood meal of female biting midges. We then searched for the presence of sequences related to Faustovirus and other giant viruses in publicly available arthropods metagenomic datasets. Our results showed that, although in low abundance, giant viral contigs were detected in other arthropods, except for Faustovirus, never detected elsewhere than in the biting midges virome. Mosquitoes and body lice presented similar abundances of *Mimiviridae*- and *Pandoraviridae*-related contigs and hard ticks presented similar abundance of *Mimiviridae*-related contigs, whereas termites and whiteflies present no giant viral sequence. One should note that mosquitoes, body lice and hard ticks are hematophagous arthropods whereas termites and whiteflies are non-hematophagous arthropods, suggesting again the putative role of blood meal in the presence of giant viruses in adult arthropods. Further proteomic analysis of the pool of *Culicoides* sp. revealed the presence of *Bovidae*, *Rodentia*, and human blood-related proteins. As a consequence we subsequently screened for the presence of Faustovirus in human sera, cattle sera and rodent organs, and detected five Faustovirus-positive rodents and two Faustovirus-positive cattle, confirming the possible contamination of female biting midges via their blood meal. Additionally, we detected three Faustovirus-positive cattle-associated engorged hard ticks, again confirming possible infection of arthropods via their blood meal.

Interestingly, we reported high levels of Faustovirus either in rodent tissue or cattle sera (Figure 5), and the highest viral loads were found in rodents' kidney and urine samples, suggesting a possible excretion of Faustovirus by rodents in the environment. Finally, the Néma River and the well water from Dielmo and Ndiop were all positive for Faustovirus, suggesting a possible source of contamination of humans and animals via recreational or drinking water. In sub-Saharan countries, such as Senegal, biting midges usually feed on livestock but also on humans, resulting in the vector-borne transmission of pathogens to animals and humans. In this study we reported the detection of Faustovirus in human sera harvested from febrile patients and from healthy people, with no significant difference in the prevalence between the two groups. Although we could not conclude on a putative pathogenic role of Faustovirus, the questions of the mode of infection to humans have to be addressed: is Faustovirus vector-transmitted? And if so, what kind of arthropod can transmit the virus? Or do humans acquire Faustovirus via an environmental source (water, urines of rodents, etc)? The possible reservoir role of rodents in the viral cycle of Faustovirus, both in humans and arthropods, requires

further investigations, as for the vector competence of arthropods for Faustovirus.

Faustovirus-related sequences were the most abundant in all viromes. Although no capsid sequence was detected in the metagenomes, we successfully amplified a fragment of the capsid gene and confirmed by sequencing (Supplemental Figure 1). Western blot analysis of *Culicoides* sp. proteins using Faustovirus antibodies highlighted a band at the expected size of the capsid protein (Figure 4B), and further mass spectrometry sequencing identified giant viral peptides, although not related to Faustovirus. Additionally, the observation of viral particles by transmission electron microscopy with a size and shape compatible with Faustovirus, and further successful isolation of Faustovirus conducted on *V. vermiformis*, a protist commonly found in human environments (Nazar et al., 2012; Coşkun et al., 2013; Niyiyati et al., 2014), confirmed the presence of infectious viral particles in the *Culicoides* sp. pool of biting midges. Phylogenetic analyses performed on several core genes revealed that Faustovirus-like viruses detected in the three biting midge viromes branch together in a cluster formed by Dakar 5b, Dakar 3, and Dakar D6 Faustovirus (Figure 2), viruses that were previously isolated in sewage from Dakar, Senegal (Reteno et al., 2015). According to the phylogenetic analysis conducted on the capsid gene, rodent-borne, cattle-borne and water-borne Faustovirus clustered together with arthropod-borne Faustovirus. Unfortunately, this portion of the genome of Faustovirus was not sufficiently discriminant to be able to refine the classification of mammalian, arthropod and environmental Faustovirus. Complete full genome sequencing and characterization of these viruses will enable the phylogenetic relationships between arthropod-associated Faustovirus, environmental/mammalian Faustoviruses and human Faustovirus to be refined.

Faustovirus is a recently described giant virus infecting *V. vermiformis* amoebae (Reteno et al., 2015), whose close relative is the ASFV, the only member of the *Asfarviridae* family. *Asfarviridae* are tick-borne dsDNA viruses transmitted by *Ornithodoros* sp. soft ticks and responsible for the African swine fever, a highly contagious and fatal pig infection (Burrage, 2013; Hubálek et al., 2014). Recently, hard ticks have been suspected to be capable of transmitting the virus but without success, although viral DNA was detected up to 8 weeks post-inoculation (de Carvalho Ferreira et al., 2014). In our study we report the detection and isolation of an *Asfarviridae*-like Faustovirus in biting midges, but also in a pool of *O. sonrai* soft ticks and in *Boophilus* sp., *R. evertsi*, and *Amblyomma* sp. pools of hard ticks. Interestingly, *O. sonrai* soft ticks were collected in the dust contained in rodents' nests and were not engorged, whereas hard ticks were collected directly from livestock and were engorged. Additionally, nearly 40% of the rodents tested were Faustovirus-positive, suggesting that *O. sonrai* soft ticks could be a possible vector for Faustovirus, and rodents could be a putative reservoir since no symptoms were observed on the captured rodents and high loads of Faustovirus were detected in their kidneys and urine, resulting in possible excretion of the virus in the environment. The detection of Faustovirus in *Boophilus* sp., *R. evertsi*, and *Amblyomma* sp. hard ticks could reflect the blood

meal of the ticks and the viral persistence of the virus or the viral DNA within the arthropod, as previously reported (de Carvalho Ferreira et al., 2014).

So far, Faustovirus has been only detected in sewage in Marseille, Dakar and in Lebanon and Saudi Arabia (Reteno et al., 2015). In this study, we report for the first time the detection and isolation of Faustovirus in adult biting midges, and the detection of high viral loads of Faustovirus in rodents and cattle. We also reported the detection of Faustovirus in febrile patients and healthy people. This work thus, highlights the need to investigate the role of arthropods and wild or domestic animals on the lifecycle of the *Asfarviridae*-like Faustovirus and, more globally, for the amoeba-infecting giant viruses.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ST, BL, OM, DR, CD designed the experiments. ST, SM, SA, PD, JBK, JB, PJ, CR performed the experiments. ST, MS, MA collected the samples. ST, SA, PD, JBK, JB, OM wrote the article. BL, OM, DR, CD revised the article.

FUNDING

This work was conducted under the frame of the ANR-13-JSV6-0004 awarded to Christelle Desnues.

REFERENCES

- Agbolade, O. M., Akinboye, D. O., Olataju, T. M., Ayanbiyi, O. A., Kuloyo, O. O., and Fenuga, O. O. (2006). Biting of anthrophilic *Culicoides fulvithorax* (Diptera: *Ceratopogonidae*), a vector of *Mansonella perstans* in Nigeria. *Korean J. Parasitol.* 44, 67–72. doi: 10.3347/kjp.2006.44.1.67
- Bishop-Lilly, K. A., Turell, M. J., Willner, K. M., Butani, A., Nolan, N. M., Lentz, S. M., et al. (2010). Arbovirus detection in insect vectors by rapid, high-throughput pyrosequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e878. doi: 10.1371/journal.pntd.0000878
- Boratto, P., Albarnaz, J. D., Almeida, G. M., Botelho, L., Fontes, A. C., Costa, A. O., et al. (2015). *Acanthamoeba polyphaga Mimivirus* prevents amoebal encystment-mediating serine proteinase expression and circumvents cell encystment. *J. Virol.* 89, 2962–2965. doi: 10.1128/JVI.03177-14
- Boughalmi, M., Pagnier, I., Aherfi, S., Colson, P., Raoult, D., and La Scola, B. (2013a). First isolation of a Marseillevirus in the *Diptera Syrphidae Eristalis tenax*. *Intervirology* 56, 386–394. doi: 10.1159/000354560
- Boughalmi, M., Pagnier, I., Aherfi, S., Colson, P., Raoult, D., and La Scola, B. (2013b). First isolation of a giant virus from wild *Hirudo medicinalis* leech: *Mimiviridae* isolation in *Hirudo medicinalis*. *Viruses* 5, 2920–2930. doi: 10.3390/v5122920
- Breitbart, M., and Rohwer, F. (2005). Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. *Biotechniques* 39, 729–736. doi: 10.2144/000112019
- Burridge, T. G. (2013). African swine fever virus infection in *Ornithodoros* ticks. *Virus Res.* 173, 131–139. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.010
- Chandler, J. A., Liu, R. M., and Bennett, S. N. (2015). RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria, and fungi. *Front. Microbiol.* 6:185. doi: 10.3389/fmicb.2015.00185
- Chandler, J. A., Thongsripong, P., Green, A., Kittayapong, P., Wilcox, B. A., Schroth, G. P., et al. (2014). Metagenomic shotgun sequencing of a *Bunyavirus* in wild-caught *Aedes aegypti* from Thailand informs the evolutionary and genomic history of the Phleboviruses. *Virology* 464–465, 312–319. doi: 10.1016/j.virol.2014.06.036

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Samia Benamar for providing Faustovirus genome sequences, Ti Thien Nguyen and Noémie Labas for their help in preparing the Illumina libraries, Dr. Nicolás Rascovan for his critical comments and advice on the project, Jean-Michel Bérenger for his help in the morphological identification of ticks, Dr. Georges Diatta for the collection of soft ticks and the veterinarian Babacar Ndao for his help in animal sampling on the field.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01406>

Supplemental Figure 1 | Electrophoresis of PCR targeting the Faustovirus capsid conducted on biting midges viromes.

Supplemental Figure 2 | Phylogenetic reconstruction of Faustovirus detected in biting midges viromes based on the (A) nucleotide sequence of the DNA topoisomerase small sub-unit (substitution model: HKY) (B) nucleotide sequence of the putative helicase C962R (substitution model: HKY).

- Colson, P., de Lamballerie, X., Fournous, G., Raoult, D. (2012). Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order *Megavirales*. *Intervirology* 55, 321–332. doi: 10.1159/000336562
- Colson, P., de Lamballerie, X., Yutin, N., Asgari, S., Bigot, Y., Bideshi, D. K., et al. (2013). “*Megavirales*,” a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Arch. Virol.* 158, 2517–2521. doi: 10.1007/s00705-013-1768-6
- Coşkun, K. A., Özçelik, S., Tutar, L., Eladi, N., and Tutar, Y. (2013). Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed. Res. Int.* 2013:675145. doi: 10.1155/2013/675145
- de Carvalho Ferreira, H. C., Tudela Zúquete, S., Wijnveld, M., Weesendorp, E., Jongejans, F., Stegeman, A., et al. (2014). No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 5, 582–589. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.12.012
- Dinsdale, E. A., Edwards, R. A., Hall, D., Angly, F., Breitbart, M., Brulc, J. M., et al. (2008). Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* 452, 629–632. doi: 10.1038/nature06810
- Dornas, F. P., Rodrigues, F. P., Boratto, P. V., Silva, L. C., Ferreira, P. C., Bonjardim, C. A., et al. (2014). Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon Region, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 469–472. doi: 10.3201/eid2003.131050
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Evans, J. D., and Schwarz, R. S. (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19, 614–620. doi: 10.1016/j.tim.2011.09.003
- Greub, G., and Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 413–433. doi: 10.1128/CMR.17.2.413-433.2004
- Harrup, L. E., Purse, B. V., Golding, N., Mellor, P. S., and Carpenter, S. (2013). Larval development and emergence sites of farm-associated *Culicoides* in the United Kingdom. *Med. Vet. Entomol.* 27, 441–449. doi: 10.1111/mve.12006
- Hubálek, Z., Rudolf, I., and Nowotny, N. (2014). Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv. Virus Res.* 89, 201–275. doi: 10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7

- Khan, M. M., Pyle, B. H., and Camper, A. K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5088–5096. doi: 10.1128/AEM.02932-09
- Legendre, M., Bartoli, J., Shmakova, L., Jeudy, S., Labedie, K., Adrait, A., et al. (2014). Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 4274–4279. doi: 10.1073/pnas.1320670111
- Mellor, P. S., Boorman, J., and Baylis, M. (2000). Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 307–340. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.307
- Nakao, R., Abe, T., Nijhof, A. M., Yamamoto, S., Jongejan, F., Ikemura, T., et al. (2013). A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. *ISME J.* 7, 1003–1015. doi: 10.1038/ismej.2012.171
- Nazar, M., Haghighi, A., Taghipour, N., Ortega-Rivas, A., Tahvildar-Biderouni, F., Nazemalhosseini Mojarad, E., et al. (2012). Molecular identification of *Hartmannella vermiformis* and *Vannella persistens* from man-made recreational water environments, Tehran, Iran. *Parasitol. Res.* 111, 835–839. doi: 10.1007/s00436-012-2906-x
- Ng, T. F., Willner, D. L., Lim, Y. W., Schmieder, R., Chau, B., Nilsson, C., et al. (2011). Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. *PLoS ONE* 6:e20579. doi: 10.1371/journal.pone.0020579
- Niyati, M., Rahimi, F., Lasejerdi, Z., and Rezaeian, M. (2014). Potentially pathogenic free-living amoebae in contact lenses of the asymptomatic contact lens wearers. *Iran J. Parasitol.* 9, 14–19.
- Pagnier, I., Reteno, D. G., Saadi, H., Boughalmi, M., Gaia, M., Slimani, M., et al. (2013). A decade of improvements in *Mimiviridae* and *Marseilleviridae* isolation from amoeba. *Intervirology* 56, 354–363. doi: 10.1159/000354556
- Philippe, N., Legendre, M., Doutre, G., Couté, Y., Poirot, O., Lescot, M., et al. (2013). Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science* 341, 281–286. doi: 10.1126/science.1239181
- Reteno, D. G., Benamar, S., Bou Khalil, J., Andreani, J., Armstrong, N., Klose, T., et al. (2015). Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J. Virol.* 89, 6585–6594. doi: 10.1128/JVI.00115-15
- Rho, M., Tang, H., and Ye, Y. (2010). FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Res.* 38, e191. doi: 10.1093/nar/gkq747
- Rosario, K., Capobianco, H., Ng, T. F., Breitbart, M., and Polston, J. E. (2014). RNA viral metagenome of whiteflies leads to the discovery and characterization of a whitefly-transmitted carlaviruses in North America. *PLoS ONE* 9:e86748. doi: 10.1371/journal.pone.0086748
- Sambou, M., Aubadie-Ladrix, M., Fenollar, F., Fall, B., Bassene, H., Almeras, L., et al. (2015). Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for identification of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. *J. Clin. Microbiol.* 53, 410–418. doi: 10.1128/JCM.01855-14
- Sikes, R. S., and Gannon, W. L. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J. Mammal.* 92, 235–253. doi: 10.1644/10-MAMM-F-355.1
- Sime-Ngando, T., Mignot, J. P., Amblard, C., Bourdier, G., Desvillettes, C., Quiblier-Lloberas, C., et al. (1996). Characterization of planktonic virus-like particles in a French mountain lake: methodological aspects and preliminary results. *Ann. Limnol.* 32, 259–263. doi: 10.1051/limn/1996025
- Slama, D., Haouas, N., Remadi, L., Mezhoud, H., Babba, H., and Chaker, E. (2014). First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit. Vectors* 7:51. doi: 10.1186/1756-3305-7-51
- Slimani, M., Pagnier, I., Boughalmi, M., Raoult, D., and La Scola, B. (2013). Alcohol disinfection procedure for isolating giant viruses from contaminated samples. *Invervirology* 56, 434–440. doi: 10.1159/000354566
- Sokhna, C., Mediannikov, O., Fenollar, F., Bassene, H., Diatta, G., Tall, A., et al. (2013). Point-of-care laboratory of pathogen diagnosis in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e1999. doi: 10.1371/journal.pntd.0001999
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Temmam, S., Monteil-Bouchard, S., Robert, C., Pascalis, H., Michelle, C., Jardot, P., et al. (2015). Host-associated metagenomics: a guide to generating infectious RNA viromes. *PLoS ONE* 10:e0139810. doi: 10.1371/journal.pone.0139810
- Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., et al. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450, 560–565. doi: 10.1038/nature06269
- Yoosuf, N., Pagnier, I., Fournous, G., Robert, C., La Scola, B., and Raoult, D. (2014). Complete genome sequence of Courdo11 virus, a member of the family *Mimiviridae*. *Virus Genes* 48, 218–223. doi: 10.1007/s11262-013-1016-x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Temmam, Monteil-Bouchard, Sambou, Aubadie-Ladrix, Azza, Declouement, Bou Khalil, Baudoin, Jardot, Robert, La Scola, Mediannikov, Raoult and Desnues. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DISCUSSION GENERALE

Discussion Générale

L'objectif de notre projet de thèse était d'identifier la diversité des *Culicoides* au Sénégal, de proposer un nouveau schéma de détermination pour les *Culicoides* d'intérêt et enfin d'améliorer les connaissances sur le rôle vectoriel de ces minuscules insectes. Cette thèse s'articule sur quatre grandes questions.

Quel est l'état des connaissances sur les Ceratopogonidae en particulier les Culicoides ?

La revue de la littérature portant sur la biologie, les outils de détermination des *Culicoides* adultes et leur implication dans la transmission de pathogènes, a permis de constater que malgré l'intérêt suscité par ces petits moucheron, en tant qu'insectes nuisibles et vecteurs à travers le monde et en particulier depuis l'émergence de la fièvre catarrhale ovine au Sénégal, de nombreux points restent à explorer. Bien que, quelques études ont été entreprises récemment, les méthodes utilisées sont lourdes, ce qui a conduit à limiter la taille de l'échantillon.

Quels types de pièges permettent de rentabiliser les captures de Culicoides ?

Les pièges lumineux sont couramment utilisés pour collecter des insectes. Le piège lumineux de type OVI est l'un des plus efficaces, ainsi que le plus sélectif, dans la capture des espèces de *Ceratopogonidae*. Ces pièges lumineux donnent des indications sur la population de cécidomyie dans une zone, ce qui peut être très utile pour l'étude de leur diversité dans une région. La capture sur appât vivant permet de collecter uniquement les femelles et de définir leurs hôtes préférentiels (Silver and Service, 2008). Mais cette collecte directe sur animaux, réalisée classiquement chez les *Culicoides*, est relativement difficile à réaliser et techniquement lourde. Le biais entraîné par des facteurs limitants, comme le type d'animal utilisé, est à prendre en compte. La capture sur appât animal est plus adaptée pour une étude sélective des préférences trophique. De plus, pour chaque méthode, les résultats des collectes vont dépendre des conditions climatiques (température, humidité, intensité lumineuse et vitesse du vent), de la disponibilité et de l'accessibilité aux hôtes (Garcia-Saenz *et al.*, 2011; Baylis *et al.*, 2010). Une étude comparative, des méthodes de captures de *Culicoides* a montré que le piège OVI est une méthode de choix pour étudier la diversité des *Culicoides* dans une région donnée (Smeets *et al.*, 2012). Cette technique de piège OVI, simple à mettre en œuvre,

est donc très largement utilisée pour échantillonner les populations de *Culicoides*. Toutefois, il est à noter que les données d'abondance et de diversité obtenues avec ce piège concernent essentiellement des espèces ayant une activité crépusculaire et/ou nocturne.

Après une évaluation de ces deux méthodes, nous avons comparés les biais pour chacune de ces méthodes. Les pièges à appât sont assez contraignants, nécessitent une intervention humaine fréquente et nous paraissent plus coûteux. Les pièges à lumière ultraviolette capturent sans distinction les espèces hématophages et non hématophages. Nous avons décidé que le piège à lumière ultraviolette (piège OVI) est celui qui répond le mieux à notre problématique. Ce piège lumineux capture des quantités importantes de *Culicoides* et est facile d'utilisation pour répertorier les espèces présentes sur une zone d'expérimentation (Fall *et al.*, 2015). Il permet de collecter non seulement les espèces en recherche d'hôte, mais aussi des mâles et femelles gravides.

Ainsi, pour maximiser nos chances de collecter les *Culicoides* hématophages, nous avons posé nos pièges à proximité immédiate des populations humaines (i.e. à l'intérieur des cases et dans des concessions) et des cheptels (i.e. enclos d'animaux). Nos travaux sont menés dans des zones rurales du Sénégal où les troupeaux sont généralement gardés dans ou près des concessions. Cette particularité de la vie rurale ne nous permet pas de différencier la préférence des *Culicoides* pour l'humain ou l'animal. Les mêmes espèces sont capturées à la fois dans les cases et les concessions/enclos. Lors de nos collectes de pièges, nous avons remarqué un nombre faible de mâles. L'abondance des *Culicoides* femelles vis-à-vis des mâles lors des piégeages lumineux s'explique en grande partie par la différence de régime alimentaire entre les deux sexes (Zimmer *et al.*, 2009). Les mâles floricoles fréquentent préférentiellement la végétation et le sommet des arbres, ils sont logiquement retrouvés en plus faible quantité au niveau des pièges lumineux, disposés à environ 1 m du sol. Les femelles hématophages au contraire, se retrouvent majoritairement au niveau du sol, à proximité du bétail et donc du piège lumineux. Ces observations ont été rapportées dans plusieurs études antérieures (Fassotte *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2009).

Quelles méthodes utilisées pour la caractérisation rapide fiable et rentable des *Culicoides* ?

L'apparition du virus de la peste équine (AHS) en 2007 au Sénégal a exposé un manque de compétences et ressources disponibles dans cette région pour permettre l'identification morphologique précise des espèces de *Culicoides* Latreille, dont certains sont les principaux vecteurs de ce pathogène. La compréhension des cycles de transmission et le développement de modèles pour prévoir les zones et les périodes à risque ne sont possibles que si l'identification des espèces impliquées dans la transmission des pathogènes est correcte. Le diagnostic morphologique des *Culicoides* est difficile du fait de la petite taille de l'insecte, de l'existence de caractères diagnostiques variables et d'une grande diversité. Afin d'étudier l'importance des différentes espèces de *Culicoides* en ce qui concerne leur rôle comme vecteurs, des outils pour leur identification rapide et aisée sont nécessaires. Dans nos travaux nous avons utilisé les approches morphologique, moléculaire et MALDI-TOF pour réaliser notre étude. Jusqu'à aujourd'hui, les études récentes portant sur l'identification des *Culicoides*, ont toujours utilisés les caractères morphologiques pour les diagnostiquer (Cornet, 1974; Glick, 1990; Diarra *et al.*, 2014; Fall *et al.*, 2015), hormis l'étude de Bakhoun *et al.* (2013) qui ont utilisé les outils moléculaire pour étudier la diversité des espèces du groupe *Culicoides schultzei* présentes au Sénégal (Bakhoun *et al.*, 2013).

En outre, les travaux réalisés sur la détermination des espèces de *Culicoides* en Afrique, reposent essentiellement sur les caractères morphologiques. Ces études ont été publiées dans des revues spécialisées ou des thèses de doctorat, qui souvent ne sont pas disponibles pour les nouveaux utilisateurs. La méthode d'identification morphologique des espèces de *Culicoides* est très fastidieuse dans sa procédure et connue difficile dans de nombreux cas, si bien même pour les experts taxonomistes (Meiswinkel *et al.*, 2008). La technique est très limitée pour la caractérisation des espèces cryptiques i.e. qui se ressemblent morphologiquement (Pagès *et al.*, 2009). Cependant, l'existence des espèces cryptiques génétiquement différenciable, a été récemment décrite (Pagès *et al.*, 2009). Plusieurs études ont démontré les limites des identifications morphologiques en utilisant les outils moléculaires. Baldet et collègues (2008) ont démontré qu'il est impossible de distinguer morphologiquement les femelles des *Culicoides obsoletus* et *Culicoides scoticus* (Baldet *et al.*, 2008). Leur étude a été confirmée deux ans plus tard par Garros *et al.*, (2010). Dès lors, la biologie moléculaire fut la méthode de choix pour la détermination des espèces de *Culicoides*. Différentes PCR furent développées ciblant des gènes de régions codantes de l'ADN mitochondrial du cytochrome Oxydase I

(COI) et de l'ADN ribosomal ('internal transcribed spacer I et II' ou espaces internes transcrits I et II – ITS1 et ITS2) (Linton *et al.*, 2002; Nolan *et al.*, 2007; Pagès *et al.*, 2009; Schwenkenbecher *et al.*, 2009; Augot *et al.*, 2010). Pour les travaux de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser le gène du cytochrome oxydase I (COI) pour son utilisation facile avec un nombre de séquences de *Culicoides* assez varié et élevé dans GenBank d'environ 111 espèces (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sur les 1400 espèces décrites morphologiquement (Borkent *et al.*, 2014). L'approche moléculaire par la « PCR classique » et le séquençage des amplicons nous a permis de confirmer les identifications morphologiques. Cependant, avec les coûts élevés que nécessite la technique, nous avons juste testé un nombre restreint pour toutes les espèces déterminées morphologiquement. D'où, le développement d'outils d'aide à l'identification morphologique et moléculaire est important pour le maintien de l'expertise taxonomique ciblant la formation des étudiants, des techniciens et des chercheurs.

Nos travaux ont nécessairement suggéré, l'aide d'outils adaptés à l'identification de ces minuscules insectes. Au cours de notre étude, nous avons utilisé la méthode morphologique comme gold standard ou méthode d'identification de base. Pour les identifications au MALDI-TOF MS, 481 spécimens ont été identifiés morphologiquement répartis chez 10 espèces (*C. oxystoma*, *C. milnei*, *C. enderleini*, *C. fulvithorax*, *C. wansoni*, *C. magnus*, *C. moreli*, *C. nevillei*, *C. imicola*, *C. kingi*). L'analyse de ces 481 specimens, nous a permis de mettre en place une base SARAMIS *Culicoides* avec 6 superspectres créés, validés et activés dans le logiciel (*C. magnus*, *C. imicola*, *C. kingi*, *C. enderleini*, *C. fulvithorax* et *C. oxystoma*). Pour la validation de ces 6 SuperSpectres, nous avons fait un test aveugle MALDI-TOF chez 76 spécimens de *Culicoides* identifiés morphologiquement. Les mêmes individus ont été étudiés en utilisant les outils moléculaires (« PCR classique » et séquençage des amplicons). La comparaison des résultats obtenus par les 3 approches, nous a permis de noter quelques biais liés l'outil morphologique. Une espèce de *Culicoides oxystoma* a été identifiée morphologiquement comme étant *Culicoides enderleini*, mais l'analyse de cette espèce par le MALDI-TOF a montré 99,99 % de similarité avec les espèces de *C. oxystoma*. Le séquençage de cette même espèce a confirmé le résultat obtenu par MALDI-TOF. De plus nous avons identifié morphologiquement 3 individus comme étant des espèces de *C. oxystoma*, tandis que leur analyse par spectrométrie de masse a révélé un pourcentage de similarité compris entre 98 et 99,90 % avec les espèces de *C. enderleini*. Le séquençage de ces 3 échantillons nous a permis de confirmer le résultat obtenu par la morphologie pour les 3 individus. Nous pensons que pour les 3 espèces male identifiées par la spectrométrie pourraient être due à une erreur

lors de la préparation des échantillons pour l'analyse au MALDI-TOF. Concernant les autres espèces, nous avons eu 100 % des identifications qui sont correctes. Dans notre étude, nous n'avons pas étudié la différence entre les mâles et femelles par MALDI-TOF, car Kaufmann et collaborateurs (2011) ont montré une forte similarité des sexes au sein d'une même espèce. Cependant, chez les femelles gorgées, la présence de sang a fortement eu un impact sur l'analyse de leurs résultats MALDI-TOF. Leur expérience a montré que cet effet n'était pas détectable chez les insectes 5 jours après l'ingestion du sang. Les comparaisons de l'arbre phylogénétique et le dendrogramme obtenu par le MALDI-TOF (**figure 28**) ont montré une topologie similaire pour *C. kingi*, *C. imicola*, *C. magnus*, *C. fulvithorax*, *C. oxystoma*, *C. nevillei*, *C. moreli* ; *C. milnei* et *C. wansonii*. Une légère différence a été notée chez *C. enderleini*. L'analyse de l'arbre phylogénétique des séquences de *C. enderleini* a révélé 3 clusters, alors que l'analyse du dendrogramme a montré un seul cluster avec une similarité des espèces supérieur à 75 %. Ceci peut s'expliquer par une faible différence entre les protéines de l'espèce formant un seul cluster, et qui représente une variation intraspécifique élevée du gène ciblé. L'outil MALDI-TOF MS est une nouvelle technique entomologique alternative aux approches morphologique et moléculaire pour la caractérisation des arthropodes (Kaufmann *et al.*, 2011; 2012a; 2012b ; Yssouf *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b; Steinmann *et al.*, 2013; Feltens *et al.*, 2010; Cambel, 2005). La méthode fut évaluée comme une approche de choix à l'identification des espèces de *Culicoides* (Kaufmann *et al.*, 2011 ; 2012a; 2012b; Steinmann *et al.*, 2013). Nos résultats confirment que la spectrométrie de masse MALDI-TOF est un outil approprié pour l'identification rapide de ces insectes.

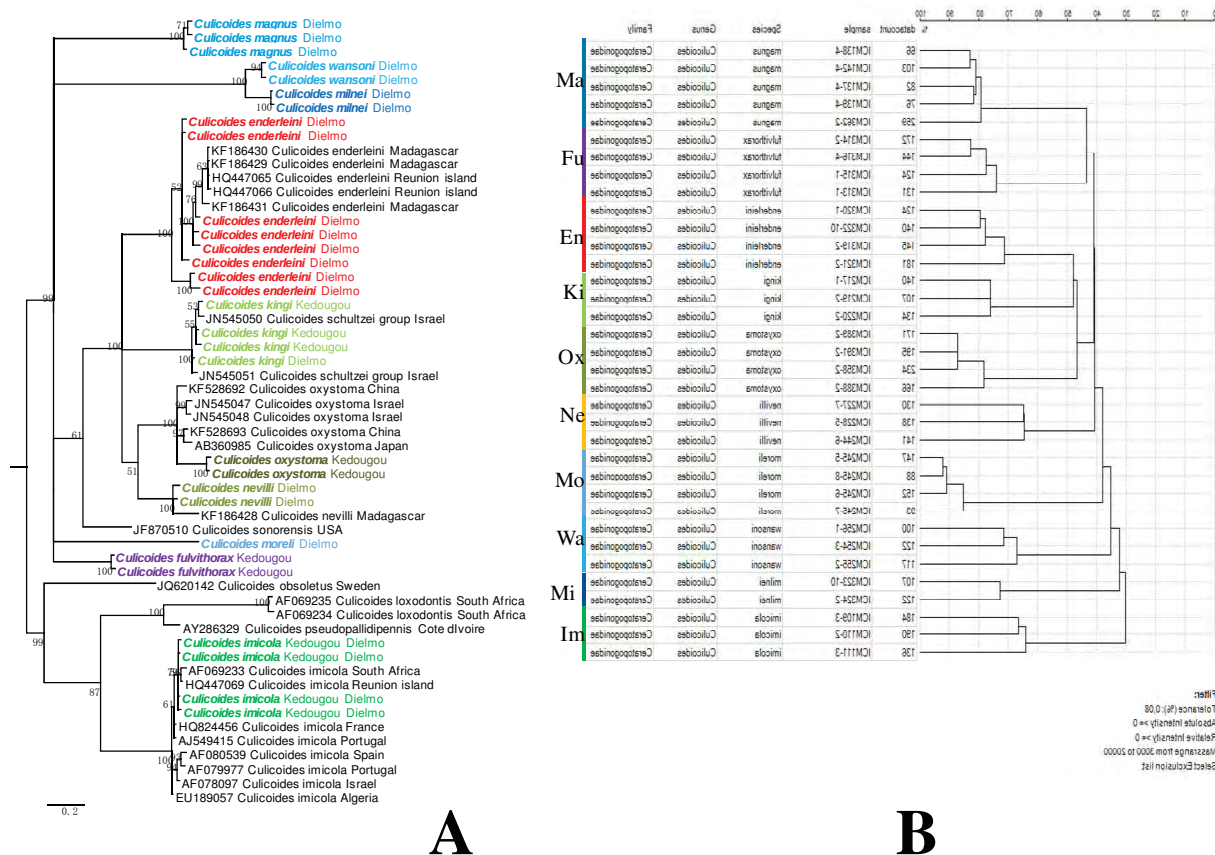


Figure 28 : Comparaison de l'arbre phylogénétique A et du dendrogramme B

Ma, *C. magnus*; Fu, *C. fulvithorax*; En, *C. enderleini*; Ki, *C. kingi*; Ne, *C. nevillei*; Mo, *C. moreli*; Wa, *C. wansoni*; Mi, *C. milnei*; Im, *C. imicola*.

Les *Culicoides* jouent-ils un rôle important dans la transmission de *Mansonella perstans* ?

Notre étude a montré que *Mansonella perstans* est une filaire qui est très répandue dans la région orientale du Sénégal. Les signes cliniques associés à son infection restent toujours mal définis pour deux raisons : i) la détection du pathogène chez des patients asymptomatiques et ; ii) la présence non régulière de symptômes chez les sujets consultants. Considérée comme non pathogène, la mansonellose à *M. perstans* pourrait cependant être à l'origine de troubles cliniques variés avec, en particulier, des manifestations cutanées. Sur le plan biologique, elle peut être responsable d'une importante hyperéosinophilie sanguine (Asio *et al.*, 2009; Fux *et al.*, 2006; Mateu *et al.*, 2008), potentiellement responsable à long terme d'atteintes cardiaques sévères (Pavlovic *et al.*, 2003). Ce qui justifie la nécessité d'un diagnostic et d'une prise en charge thérapeutique précoce. L'Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL) (2014) a classé l'infection à *M.*

parstans comme une mansonellose peu ou pas pathogène. Alors que la filaire a été décrite comme pathogène par plusieurs auteurs (résumés dans Simonsen *et al.*, 2011), bien que les symptômes ne soient pas spécifiques à l'infection. Les connaissances relatives aux infections à *M. perstans* demeurent toutefois insuffisantes à de nombreux égards. Il n'y a pas assez d'études concernant les infections à *M. perstans* au Sénégal. De plus, il y a peu de travaux systématiques sur les vecteurs et les réservoirs de *M. perstans* en Afrique. Les quelques rares études sont en générale réalisées au Nigéria. Plusieurs espèces de *Culicoides* ont été impliquées dans la transmission de *M. perstans*.

Au Nigéria, Agobolade *et al.* (2006), avaient détecté les filaires de *M. perstans* chez *C. fulvithorax* (7/359) soit 1.95%. Ces filaires ont été également identifiées chez *C. grahami*, *C. austeni* et *C. inornatipennis* depuis les années 1950 au Cameroun (résumé dans Simonsen *et al.*, 2011). Cependant, nos travaux ont montré que les *Culicoides* ne jouent pas un rôle important dans la transmission de filaires *M. perstans* au Sénégal. Nous avons testé 1159 espèces de *Culicoides* en PCR pour la détection de toutes espèces de *Mansonella* et de *M. perstans*, mais seulement 8/1159 étaient positifs pour *Mansonella spp.* Toutefois aucune trace d'ADN de *M. perstans* n'a été détectée chez ces 8 spécimens. Une investigation à grande échelle serait importante pour la confirmation de ces résultats. D'autant plus que la filaire est largement répandue dans la zone.

L'approche moléculaire utilisée dans cette étude nous a permis de montrer que la filaire identifiée et caractérisée chez les deux *C. enderleini* de Dielmo est une nouvelle espèce appartenant au genre *Mansonella*. Ce qui montre que les études sur les filaires du genre *Mansonella* et encore moins sur les *Culicoides*, concernant leur importance médicale et vétérinaire sont toujours préliminaires. La revue de Bain *et al.* (2015), montre que plusieurs espèces de filaires affectent divers animaux ainsi que l'homme, mais dont leur impact sur la santé animale et public est très peu étudié.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspective

Cette thèse portant sur l'étude des *Culicoides* de la région Afrotropicale en particulier les outils de caractérisation de ces insectes et leur implication dans la transmission de fièvres non expliquées au Sénégal, a nécessité l'utilisation des approches spectrométrie de masse MALDI-TOF et moléculaire pour la mise en place d'une base SARAMISTM *Culicoides* et la détection de pathogènes chez les *Culicoides*.

Ce travail a permis de montrer qu'en Afrique la caractérisation des espèces de *Culicoides* reste toujours un challenge pour les taxonomistes entomologiques. Très peu d'études se sont intéressées à l'aspect vectoriel de ces minuscules insectes et plus particulièrement à leur biologie, écologie, préférence trophique et surtout à leur détermination. Les rares études concernant leur détermination sont plutôt morphologiques. Les résultats de notre thèse ont permis de mettre en place une base SARAMIS *Culicoides* de 12 espèces dont 6 super-spectres créés, validés et activés dans la base (*C. magnus*, *C. imicola*, *C. kingi*, *C. enderleini*, *C. fulvithorax* et *C. oxystoma*). Le MALDI-TOF MS est un outil fiable, rapide et reproductible pour la détermination des espèces de *Culicoides*. Cette étude est la première étude utilisant la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour caractériser les espèces d'arthropodes (*Culicoides* spp) d'importance clinique et vétérinaire en Afrique. Les résultats de la base validés sont à partager avec les laboratoires entomologiques équipés d'un MALDI-TOF MS. Ils permettront l'identification rapide, fiable des espèces de *Culicoides* sans l'aide d'un expert en taxonomie. La technique MALDI-TOF MS est une méthode économiquement avantageuse pour des études quantitatives et exigeantes des informations détaillées sur une faune d'arthropodes.

La méthode est encore méconnue en Afrique, mais elle est en train de se faire une place de choix au sein des laboratoires d'entomologie clinique et vétérinaire pour l'identification des arthropodes en routine. Les outils moléculaires nous ont servi de contrôle pour les études mener par la spectrométrie de masse MALDI-TOF et morphologique. Mais la méthode moléculaire est limitée par les couts élevés nécessitant et donc très intéressante pour étudier un faible échantillon. Enfin, le MALDI-TOF serait relativement peu intéressant sans une base de données précise, adaptée, et pouvant être régulièrement mise à jour. L'affinement et l'enrichissement des bases de données sont des éléments essentiels pour développer l'efficacité et la précision de la technique.

L'étude rétrospective réalisée à partir des échantillons provenant de Kédougou, a montré que *Mansonella perstans* est très répandue dans la zone orientale du Sénégal. Cette large distribution ne peut être expliquée par l'abondance des espèces impliquées dans la transmission de cette filaire. Des études antérieures ont incriminé les *Culicoides* comme étant les vecteurs de *M. perstans* dans divers pays. Mais notre étude n'a pas identifié *M. perstans* chez 1129 spécimens de *Culicoides* collectés dans la zone de Kédougou. Le fait que tous les *Culicoides* testés soient négatifs montre qu'ils ne jouent pas un rôle important dans la transmission de *M. perstans* dans la zone d'étude de Kédougou. La filaire *M. perstans* affecte toutes les tranches d'âges (adultes et enfants). Les patients infectés par *M. perstans* ne présentaient pas des symptômes spécifiques à l'infection. Il existe donc un besoin urgent de rechercher sur cette infection très répandue dans le Sénégal oriental, mais très négligée afin d'évaluer correctement son importance pour la santé publique et de recommander des moyens et des stratégies pour le traitement et le contrôle optimal.

En résumé les travaux présentés ici portent les nouveautés suivantes :

1. Pour la première fois en Afrique l'approche MALDI-TOF a été utilisée pour l'identification des arthropodes. La première base des données des spectres des *Culicoides* a été créée.
2. Nous avons séquencé et déposé dans Genbank 65 séquences du gène COI des *Culicoides* sénégalais, dont la plupart pour la première fois.
3. Nous avons pu effectuer les travaux sur *Mansonella perstans* au Sénégal pour la première fois depuis 1967. Le rôle de *Culicoides* dans la transmission de *M. perstans* au Sénégal reste douteux.
4. Nous avons identifié et caractérisé par biologie moléculaire une nouvelle espèce (probable) de *Mansonella* chez les *Culicoides enderleini*.

Au terme de nos travaux de thèse, nous avons noté que beaucoup de points sont à explorer pour mieux comprendre l'importance des espèces du genre *Culicoides* en santé publique et vétérinaire. Le manque d'application des outils d'identification appropriés des *Culicoides*, est l'un des principaux obstacles au progrès de la recherche dans la région Afrotropicale.

Plusieurs perspectives d'études peuvent être proposées :

- i) Les méthodes alternatives à la morphologie utilisées dans notre travail sont ci importantes surtout pour le contrôle des maladies vectorielles. Pour inventorier et caractériser toutes les espèces de *Culicoides* au Sénégal par le MALDI-TOF, une combinaison des 3 approches (morphologique, moléculaire et MALDI-TOF MS) est nécessaire et surtout en faisant appel aux experts taxonomistes. Car l'anatomie morphologique est incontournable pour une première étude d'investigation. Ce qui permettait, de travailler un produit fini et consensuel qui serait à la disposition de toutes les équipes intéressées à l'utilisation de la base pour le progrès de la science.
- ii) Une caractérisation des stades immatures par le MALDI-TOF en combinaison avec les autres approches et leurs biotopes permettraient de dégager des stratégies de contrôle et de lutte beaucoup plus efficaces
- iii) Une étude ciblant la préférence trophique des espèces de *Culicoides* serait très intéressante. Une telle étude permettra de bien cadrer une recherche sur les espèces d'intérêts médicales et ou vétérinaires. Donc une bonne stratégie de contrôle sur les maladies potentielles susceptibles d'être transmises par ces moucheron piqueurs.
- iv) Le fait que les pathogènes tels que *Mansonella perstans* et *Rickettsia felis* soient distribués largement dans les zones rurales du Sénégal, montre que les vecteurs de ces pathogènes sont également présents dans ces sites avec une forte densité. Nous nous sommes limités à détecter leurs présences chez les *Culicoides*. De nombreux arthropodes hématophages peuvent être impliqués dans leurs transmissions. Par exemple il serait important d'étudier le rôle des *Simulidae*, *Tabanidae*, *Culex* spp. et autres *Culicidae* dans l'épidémiologie de *Mansonella perstans* et également le rôle des moustiques pour *R. felis*.

Aussi beaucoup reste à faire...

Références Bibliographique

- Abella JA, Manuel M, Cariaso B & Kamiya M, 1994: Abundance and prevalence of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) on some Philippine chicken farms. *J Med Entomol.*, **31**: 45-48.
- Adolph PE, Kagan IG & McQuay RM, 1962: Diagnosis and treatment of *Acanthocheilonema perstans* filariasis. *Am J Trop Med Hyg.*, **11**: 76-88.
- Aebersold R & Mann M, 2003: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**: 198-207.
- Agbolade OM & Akinboye DO, 2001: *Loa loa* and *Mansonella perstans* infections in Ijebu North, Western Nigeria: a parasitological study. *J Infect Dis.*, **54**: 108-110.
- Agbolade OM, Akinboye DO, Olateju TM, Ayanbiyi OA, Kuloyo OO & Fenuga OO, 2006: Biting of anthropophilic *Culicoides fulvithorax* (Diptera: Ceratopogonidae), a vector of *Mansonella perstans* in Nigeria. *Korean J Parasitol.*, **44**: 67-72.
- Akakpo AJ, Toukam WCM, Mankorn A & Ly C, 2011: Impact Economique de L'épizootie de Peste Equine de 2007 au Senegal. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa.*, **59**: 1-16.
- Allison AB, Goekjian VH, Potgieter AC, Wilson WC, Johnson DJ, Mertens PP & Stallknecht DE, 2010: Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in the USA containing RNA segments derived from both exotic (EHDV-6) and endemic (EHDV-2) serotypes. *J Gen Virol.*, **91**: 430-439.
- Ander M, Troell K & Chirico J, 2013: Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Med Vet Entomol.*, **27**: 323-331.
- Andrews L, Andersen RF, Webster D, Dunachie S, Walther RM, Bejon P, Hunt-Cooke A, Bergson G, Sanderson F, Hill AV & Gilbert SC, 2005: Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg.*, **73**: 191-198.
- Anosike JC, 1994: The status of human filariasis in north-western zone of Bauchi State, Nigeria. *Appl Parasitol.*, **35**: 133-140.

- Arcache A, Bensadoun P, Bousquet L, Fremaux I, Gineste R, Labanieh J, Micallef L, Moro M, Pelissier E, Rolland A, Schambourg A, Vidal S & Zouyene N, 2003: Etude protéomique basée sur la spectrométrie de masse. *DESS expression génétique et protéines recombinantes, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.*
- Asio SM, Simonsen PE & Onapa AW, 2009: *Mansonella perstans* filariasis in Uganda: patterns of microfilaraemia and clinical manifestations in two endemic communities. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **103**: 266-273.
- Asnis DS, Conetta R, Waldman G & Teixeira AA, 2001: The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999-2000): from Flushing, New York, to beyond its borders. *Ann N Y Acad Sci.*, **951**: 161-171.
- Aston FW, 1919: A positive-ray spectrograph. *Phil. Mag.*, **38**: 707-715.
- Augot D, Sauvage F, Jouet D, Simphal E, Veuille M, Couloux A, Kaltenbach ML & Depaquit J, 2010: Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect Genet Evol.*, **10**: 629-637.
- Azevedo RS, Nunes MR, Chiang JO, Bensabath G, Vasconcelos HB, Pinto AY, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG & Vasconcelos PF, 2007: Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis.*, **13**: 912-915.
- Bain O, Mutafovchiev Y, Junker K, Guerrero R, Martin C, Lefoulon E & Uni S, 2015: Review of the genus *Mansonella* Faust, 1929 sensu lato (*Nematoda: Onchocercidae*), with descriptions of a new subgenus and a new subspecies. *Zootaxa*, **3918**:151-93.
- Bakhoun MT, Fall M, Fall AG, Bellis GA, Gottlieb Y, Labuschagne K, Venter GJ, Diop M, Mall I, Seck MT, Allène X, Diarra M, Gardès L, Bouyer J, Delécolle JC, Balenghien T & Garros C, 2013: First record of *Culicoides oxystoma* Kieffer and diversity of species within the Schultzei group of *Culicoides* Latreille (*Diptera: Ceratopogonidae*) biting midges in Senegal. *PLoS One*, **8**: e84316.
- Balashov YS, 1999: Evolution of haematophagy in insects and ticks. *Entomological Review*, **79**: 943-954.

- Balczun C, Vorsprach B, Meiser CK & Schaub GA, 2009: Changes of the abundance of *Culicoides obsoletus* s.s. and *Culicoides scoticus* in Southwest Germany identified by a PCR-based differentiation. *Parasitol Res.*, **105**: 345-349.
- 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. *Prev Vet Med.*, **87**: 84-97.
- Balenghien T & Delécolle JC, 2009: Les *Culicoides* mouchérons vecteurs du virus de la fièvre catarrhale ovine. *Insectes*, **154**: 25-30.
- Balenghien T, Fouque F, Sabatier P & Bicout DJ, 2011: Theoretical formulation for mosquito host-feeding patterns: application to a West Nile virus focus of southern France. *J Med Entomol.*, **48**: 1076-1090.
- Barlow A, Green P, Banham T & Healy N, 2013: Serological confirmation of SBV infection in wild British deer. *Vet Rec.*, **172**: 429-429.
- Bastos Mde S, Figueiredo LT, Naveca FG, Monte RL, Lessa N, Pinto de Figueiredo RM, Gimaque JB, Pivoto João G, Ramasawmy R & Mourão MP., 2012: Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.*, **86**: 732-735.
- 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.
- Bazarusanga T, 1995. Contribution à l'étude de l'épidémiosurveillance de la peste équine au Sénégal: enquêtes sérologiques dans les zones de Rufisque, Kaffrine et Dahra., In Veterinary thesis, Université Cheikh Anta Diop de Dakar.
- Beavis RC & Chait BT, 1989: Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **3**: 432-435.
- Beavis RC, Chaudhary T & Chait BT, 1992: Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Organ Mass Spectrom.*, **27**: 156-158.

- Bernardes-Terzian AC, de-Moraes-Bronzoni RV, Drumond BP, Da Silva-Nunes M, da-Silva NS, Urbano-Ferreira M, Sperança MA & Nogueira ML, 2009: Sporadic oropouche virus infection, acre, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, **15**: 348-350.
- Blackburn NK, Searle L & Phelps RJ, 1985: Viruses isolated from *Culicoides* (Dipt.: Cerat.) caught at the Veterinary Research Farm, Mazowe, Zimbabwe. *J. Entomol. Soc. S. Afr.*, **48**: 331-336.
- Boorman J, 1979: Notes on some *Culicoides* (Dipt., Ceratopogonidae) from East Africa, including a new species. *Entomol Mon Mag*, **114**: 67-70.
- Boorman J, 1989: *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna of Saudi Arabia*, **10**: 160-224
- Boorman J, 1993: Biting midges (Ceratopogonidae). In: Lane, R.P., Crosskey, R.W. (Eds.), Medical Insects and Arachnids. Chapman & Hall, London. 289-309.
- Boorman J & Dipeolu OO, 1979: A taxonomic study of adult Nigerian *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species. *Occas. Publ. Entomol. Soc-Nigeria*, **22**: 1-121.
- Boorman JPT & Hagan DV, 2007: A Name List of World *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) http://campus.belmont.edu/cienews/culicoides_worldlist.html.
- Borkent A, 2014: World Species of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae). Available from: <http://www.inhs.illinois.edu/files/8413/4219/9566/CeratopogonidaeCatalog.pdf> (Accessed 09/2014).
- Borkent A & Spinelli GR, 2007: Neotropical *Ceratopogonidae* (Diptera: Insecta). In: Adis J, Arias JR, Rueda-Delgado G & KM Wantzen (Eds.): Aquatic Biodiversity in Latin America (ABLA). Vol. 4. Pensoft, Sofia-Moscow, 198 pp.
- Bourgeade A, Nosny Y, Olivier-Paufique M & Faugère B, 1989: 32 cases of recurrent localized edema on return from the Tropics. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.*, **82**: 21-28.
- Braverman Y & Chechik F, 1996: Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israël. *Revue Scientifi que et Technique de l'Office International des Epizooties*, **15**: 1037-1052.

- Braverman Y, Frish K, Reis M & Mumcuoglu KY, 2012: Host Preference of *Culicoides* spp from Israel Based on Sensory Organs and Morphometry (*Diptera: Ceratopogonidae*). *Entomologia generalis*, **34**: 97-110.
- Burmudez AJ, 2008: Micellaneous and sporadic protozoal infections. In: Diseases of poultry, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, & D. E. Swayne, eds. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA. pp. 1105–1114..
- Calisher CH & Gould EA, 2003: Taxonomy of the virus family *Flaviviridae*. *Adv Virus Res.*, **59**: 1-19.
- Camara M, Caro-Riaño H, Ravel S, Dujardin JP, Hervouet JP, De Meeüs T, Kagbadouno MS, Bouyer J & Solano P, 2006: Genetic and morphometric evidence for isolation of a tsetse (*Diptera: Glossinidae*) population (Loos islands, Guinea). *J Med Entomol.*, **43**: 853-860.
- Cameron AE & Eggers DF, 1948: An Ion “Velocitron”. *Rev Sci Instrum.*, **19**: 605-607.
- Campbell JA & Pelham-Clinton EC, 1960: A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (*Diptera: Ceratopogonidae*). *Proc R Soc Edinb.*, **67**: 181–302.
- Campbell PM, 2005: Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Systematic Entomology*, **30**: 186-190.
- Caprioli G, Cristalli G, Ragazzi E, Molin L, Ricciutelli M, Sagratini G, Seraglia R, Zuo Y & Vittori S, 2010: A preliminary matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight approach for the characterization of Italian lentil varieties. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **24**: 2843-2848.
- Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ & Mellor PS, 2006: Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) from the United Kingdom. *J Med Entomol.*, **43**: 73-78.
- Carpenter S, Wilson A & Mellor PS, 2009: *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol.*, **17**: 172-178.

- Cases I & de Lorenzo V, 2002: The grammar of (micro) biological diversity. *Environ Microbiol.*, **4**: 623-627.
- Cêtre-Sossah C, Baldet T, Delécolle JC, Mathieu B, Perrin A, Grillet C & Albina E, 2004: Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res.*, **35**: 325-337.
- Cêtre-Sossah C, Mathieu B, Setier-Rio ML, Grillet C, Baldet T, Delécolle JC & Albina E, 2008: Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res Vet Sci.*, **85**: 372-382.
- Cêtre-Sossah C, Roger M, Sailleau C, Rieau L, Zientara S, Bréard E, Viarouge C, Beral M, Esnault O & Cardinale E, 2014: Epizootic haemorrhagic disease virus in Reunion Island: Evidence for the circulation of a new serotype and associated risk factors. *Vet Microbiol.*, **170**: 383-390.
- Chaker E, 1983 : Contribution à l'étude de la morphologie et de la diagnose des larves de *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). Université Louis Pasteur de Strasbourg (France).
- Chandellier A, 1995: Structure du génome mitochondrial de l'épicéa commun (*Picea abies* L. Karst) lors de l'embryogenèse somatique in vitro. *Thèse Doct. Sci. agron. Gembloux, Fac. univ. Sci. agron.* 240 p.
- Christophers SRHE & Barraud PJ, 1925: *Culicoides* and kala-azar in Assam. *Indian J Med Res.*, **13**: 175-176.
- ChromasPro version 1.6 (2012), Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.
- Colby SM, King TB & Reilly JP, 1994: Improving the resolution of matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **8**: 865-868.
- Cornet M, 1969: Les *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) de l'ouest africain (1ère note). *Cah.O.R.S.T.O.M., Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **7**: 341-364.

- Cornet M, 1974: Caractères morphologiques utilisés pour l'identification des *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). *Cah.O.R.S.T.O.M., Sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, **XII**: 221-229.
- Cornet M & Brunhes J, 1994: Révision des espèces de *Culicoides* apparentées à *C.schultzei* (Enderlein, 1908) dans la région afrotropicale (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomol Fr.*, **99**: 149-164.
- Cornet M, Nevill EM & Walker AR, 1974: Note sur les *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) du groupe de *C. milnei* Austen 1909, en Afrique orientale et australe. *Cah.O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, **XII**: 231-243.
- Cybinski DH & Muller MJ, 1990: Isolation of arboviruses from cattle and insects at two sentinel sites in Queensland, Australia, 1979–1985. *Aust. J. Zool.*, **38**: 25-32.
- Dallas JF, Cruickshank RH, Linton YM, Nolan DV, Patakakis M, Braverman Y, Capela R, Capela M, Pena I, Meiswinkel R, Ortega MD, Baylis M, Mellor PS & Mordue Luntz AJ, 2003: Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Med Vet Entomol.*, **17**: 379-387.
- Davies FG & Walker AR, 1974: The isolation of ephemeral fever virus from cattle and *Culicoides* midges in Kenya. *Vet Rec.*, **95**: 63-64.
- De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Madder M, Geysen D, Smeets F, Losson B, van den Berg T & Cay AB, 2012: Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.*, **59**: 471-475.
- Delécolle, JC, 1985 : Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Université Louis Pasteur,
- Delecolle JC & Schaffner F, 2003 : Vecteurs des arboviroses. In: Lefevre PC, Blancou J & Chermette R, editors. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes. Tec & Doc Lavoisier ed. Paris. p. 123-128.
- Descy J, Meex C, Melin P, Hayette MP, Huynen P & De Mol P, 2010: Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. *Revue Médicale de Liège*, **65**: 29-34.

- Diarra M, Fall M, Fall AG, Diop A, Seck MT, Garros C, Balenghien T, Allène X, Rakotoarivony I, Lancelot R, Mall I, Bakhoun MT, Dosum AM, Ndao M, Bouyer J & Guis H, 2014: Seasonal dynamics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges, potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in the Niayes area of Senegal. *Parasit Vectors*, **7**: 147.
- Ditchfield J, Debbie JG & Karstad LH, 1964: The virus of epizootic hemorrhagic disease of deer. *Transactions of the North American Wildlife Natural Resources Conference*, **29**: 196-201.
- Dostálová A & Volf P, 2012: *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*, **5**: 276.
- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K & Walton SF, 2011: Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol.*, **41**: 571-579.
- Du Toit RM, 1944: The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Veterinary Journal*, **19**: 7-16.
- Dujardin JP, Beard B & Rykman R, 2007: The relevance of wing geometry in entomological surveillance of *Triatominae*. *Infect. Genet. Evol.*, **7**: 161-167.
- Dujardin JP, Le Pont F & Baylac M, 2002: Geographic versus interspecific differentiation of sandflies: a landmark data analysis. *Bull Entomo. Res.*, **93**: 87-90.
- Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM & Kooi EA, 2013: Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis.*, **19**: 106-109.
- Fall M, Fall AG, Seck MT, Bouyer J, Diarra M, Lancelot R, Gimonneau G, Garros C, Bakhoun MT, Faye O, Baldet T, Balenghien T, 2015: Host preferences and circadian rhythm of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in Senegal. *Acta Trop.*, **149**: 239-245.
- Fassotte C, Delécolle JC, Cors R, Defrance T, De Deken R, Haubruge E & Losson B, 2008: *Culicoides* trapping with Rothamsted suction traps before and during the bluetongue epidemic of 2006 in Belgium. *Prev Vet Med.*, **87**: 74-83.

- Feliciangeli MD, Sanchez-Martin M, Marrero R, Davies C & Dujardin JP, 2007: Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). *Acta Trop.*, **101**: 169-177.
- Feltens R, Görner R, Kalkhof S, Gröger-Arndt H & von Bergen M, 2010: Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *BMC Evol Biol.*, **10**: 95.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF & Whitehouse CM, 1989 Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**: 64-71.
- Fischer P, Büttner DW, Bamuhiiga J & Williams SA, 1998: Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain reaction-based assay. *Am J Trop Med Hyg.*, **58**: 816-820.
- Formica S & Botto C, 1990: Filariasis focus due to *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Federal Territory of Venezuela. *J Trop Med Hyg.*, **93**: 160-165.
- Fux CA, Chappuis B, Holzer B, Aebi C, Bordmann G, Marti H, Hatz C, 2006: *Mansonella perstans* causing symptomatic hypereosinophilia in a missionary family. *Travel Med Infect Dis.*, **4**: 275-80.
- 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.
- Garigliany MM, Hoffmann B, S. Dive M, artelet 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, Mathieu B, Balenghien T, Cêtre-Sossah C & Delécolle JC, 2010: Suggesting synonymies? Comments on Kiehl et al. (2009) "the European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?". *Parasitol Res.*, **107**: 731-734.
- Glick JI, 1990: *Culicoides* biting midges (*Diptera: Ceratopogonidae*) of Kenya. *J Med Entomol.*, **27**: 85-195.

- Glukhovva M, 1977: [The subgeneric classification of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (*Diptera*, *Ceratopogonidae*), including morphological characters of the larva]. *Parazitologicheskii Sbornik*, **27**: 112-118.
- Goffredo M & Meiswinkel R, 2004: Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Ital.*, **40**: 260-265.
- Goller KV, Höper D, Schirrmeier H, Mettenleiter TC & Beer M, 2012: Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg Infect Dis.*, **18**: 1644-1646.
- Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, Goffredo M & Gasperi G, 2006: Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol.*, **20**: 229-238.
- Hendry G & Godwin G, 1988: Biting midges in Scottish forestry: a costly irritant or a trivial nuisance? *Scot Forest*, **42**: 113-119.
- Henni LH, Sauvage F, Ninio C, Depaquit J & Augot D, 2014: Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (*Diptera*: *Ceratopogonidae*: *Culicoides*) in France. *Infect Genet Evol.*, **21**: 110-117.
- Hoch AL, Roberts DR & Pinheiro FP, 1990: Host-seeking behavior and seasonal abundance of *Culicoides paraensis* (*Diptera*: *Ceratopogonidae*) in Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.*, **6**: 110-114.
- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC & Beer M, 2012: Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis.*, **18**: 469-472.
- Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chagnat V, Worwa G & Thuer B, 2008: Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis.*, **14**: 1855-1861.
- Holmes IH, Boccardo G, Estes MK & Furuichi MK (1995). Family *Reoviridae*, in: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses., Springer, Wien, New York, Arch. **Viol. Suppl.** **10**.

- Horta MC, Labruna MB, Durigon EL & Schumaker TT, 2006: Isolation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. *Appl Environ Microbiol.*, **72**: 1705-1707.
- Hubálek Z, Rudolf I & Nowotny N, 2014: Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res.*, **89**: 201-275.
- Hutcheson HJ, Gorham CH, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, James AM, Marlenee NL, Winn B, Beaty BJ & Blair CD, 2005: Experimental transmission of West Nile virus (*Flaviviridae: Flavivirus*) by *Carios capensis* ticks from North America. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **5**: 293-295.
- Jack C, Anstaett O, Adams J, Noad R, Brownlie J & Mertens P, 2012: Evidence of seroconversion to SBV in camelids. *Vet Rec.*, **170**: 603-603.
- Jennings DM & Mellor PS, 1989: *Culicoides*: biological vectors of Akabane virus. *Vet. Microbiol.*, **21**: 125-131.
- Karas M & Hillenkamp F, 1988: Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. *Anal Chem.*, **60**: 2299-2301.
- Kaufmann C, Schaffner F, Ziegler D, Pflüger V & Mathis A, 2012a: Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology*, **139**: 248-258.
- Kaufmann C, Steinmann IC, Hegglin D, Schaffner F & Mathis A, 2012b: Spatio-temporal occurrence of *Culicoides* biting midges in the climatic regions of Switzerland, along with large scale species identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Parasit Vectors*, **5**: 246.
- Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pflüger V & Mathis A, 2011: Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Med Vet Entomol.*, **25**: 32-38.
- Kedmi M, Galon N, Herziger Y, Yadin H, Bombarov V, Batten C, Shpigel NY & Klement E, 2011: Comparison of the epidemiology of epizootic haemorrhagic disease and bluetongue viruses in dairy cattle in Israel. *Vet J.*, **190**: 77-83.

- Keiser PB, Coulibaly Y, Kubofcik J, Diallo AA, Klion AD, Traoré SF & Nutman TB, 2008: Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella perstans*. *Mol Biochem Parasitol.*, **160**: 123-128.
- Keita AK, Mediannikov O, Ratmanov P, Diatta G, Bassene H, Roucher C, Tall A, Sokhna C, Trape JF, Raoult D & Fenollar F, 2013: Looking for *Tropheryma whipplei* source and reservoir in rural Senegal. *Am J Trop Med Hyg.*, **88**: 339-343.
- Kettle DS, 1984: *Ceratopogonidae* (Biting midges) In: Medical and Veterinary Entomology, Bristol, Leaper and Gard Ltd, 137-159.
- Kettle DS, 1962: The bionomics and control of *Culicoides* and *Leptoconops* (Diptera, *Ceratopogonidae*=*Heleidae*). *Annual Review of Entomology*, **7**: 401-418.
- Kiehl E, Walldorf V, Klimpel S, Al-Quraishy S & Mehlhorn H, 2009 The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA? *Parasitol Res.*, **105**: 331-336.
- King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB., 2011: Virus taxonomy: 9th report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier, San Diego.
- King NJ, Getts DR, Getts MT, Rana S, Shrestha B & Kesson AM, 2007: Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol Cell Biol.*, **85**: 33-42.
- Kirkeby C & Dominiak P, 2014: *Culicoides (Avaritia) gornostaevae* Mirzaeva, 1984 (Diptera: *Ceratopogonidae*)--a possible vector species of the *Obsoletus* group new to the European fauna. *Parasit Vectors*, **7**: 445.
- Kozek WJ, Palma G, Henao A, García H & Hoyos M, 1983: Filariasis in Colombia: prevalence and distribution of *Mansonella ozzardi* and *Mansonella* (= *Dipetalonema*) *perstans* infections in the Comisaría del Guainía. *Am J Trop Med Hyg.*, **32**: 379-384.
- Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnar Z, Csohan A, Ban E, Zoldi V & Kaszas K, 2008: West Nile virus infections in Hungary, August–September 2008. *Euro Surveill.*, **13** pii: 19030.

- Lane DJ, Stahl DA, Olsen GJ, Heller DJ & Pace NR, 1985: Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J Bacteriol.*, **163**: 75-81.
- Lassen SB, Nielsen SA, Skovgård H & Kristensen M, 2012: Molecular differentiation of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the subgenus *Culicoides* Latreille in Denmark. *Parasitol Res.*, **110**: 1765-1771.
- Lassen SB, Nielsen SA, Skovgård H & Kristensen M, 2011: Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitol Res.*, **108**: 823-829.
- Lee DH, Jang JH, Kim BY, Kwon YK, Gomis S, Lee JB, Park SY, Choi IS & Song CS, 2014: Diagnosis of *Leucocytozoon caulleryi* infection in commercial broiler breeders in South Korea. *Avian Dis.*, **58**: 183-186.
- Lewis SE, Rice A, Hurst GD & Baylis M, 2014: First detection of endosymbiotic bacteria in biting midges *Culicoides pulicaris* and *Culicoides punctatus*, important Palaearctic vectors of bluetongue virus. *Med Vet Entomol.*, **28**: 453-456.
- Linto YM, Mordue Luntz AJ, Cruickshank RH, Meiswinkel R, Mellor PS & Dallas JF, 2002: Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Med Vet Entomol.*, **16**: 139-146.
- Lyimo IN & Ferguson HM, 2009: Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol.*, **25**: 189-196.
- Maan NS, Maan S, Belaganahalli MN, Ostlund EN, Johnson DJ, Nomikou K & Mertens PP, 2012: Identification and differentiation of the twenty six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *PLoS ONE*, **7**: e32601.
- Maan S, Maan NS, Nomikou K, Batten C, Antony F, Belaganahalli MN, Samy AM, Reda AA, Al-Rashid SA, El Batel M, Oura CA & Mertens PP, 2011: Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg Infect Dis.*, **17**: 886-889.
- Maclachlan NJ & Guthrie AJ, 2010: Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet Res.*, **41**: 35.

- Mamyrin BA, 1994: Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom.* **131**: 1-19.
- Mardulyn P, Goffredo M, Conte A, Hendrickx G, Meiswinkel R, Balenghien T, Sghaier S, Lohr Y & Gilbert M, 2013: Climate change and the spread of vector-borne diseases: using approximate Bayesian computation to compare invasion scenarios for the bluetongue virus vector *Culicoides imicola* in Italy. *Mol Ecol.*, **22**: 2456-2466.
- Mateu L, Sopena N, Giménez M, Valerio L, 2008: [*Mansonella perstans* isolated on aspiration puncture of a salivary gland]. [Article in Spanish]. *Acta Otorrinolaringol Esp.*, **59**:145-7.
- Mathieu B, Cêtre-Sossah C, Garros C, Chavernac D, Balenghien T, Carpenter S, Setier-Rio ML, Vignes-Lebbe R, Ung V, Candolfi E & Delécolle JC, 2012: Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasit Vectors*, **5**: 137.
- Mathieu B, Perrin A, Baldet T, Delécolle JC, Albina E & Cêtre-Sossah C, 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.
- Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T & Noda H, 2009: Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Med Vet Entomol.*, **23**: 47-55.
- Mazzeo MF, Giulio BD, Guerriero G, Ciarcia G, Malorni A, Russo GL & Siciliano RA, 2008: Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Agric Food Chem.*, **56**: 11071-11076.
- Mediannikov O, Audoly G, Diatta G, Trape JF & Raoult D, 2012: New *Rickettsia* sp. in tsetse flies from Senegal. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, **35**: 145-150.
- Mediannikov O, Diatta G, Fenollar F, Sokhna C, Trape JF & Raoult D, 2010a: Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis.*, **4**: e821.

- Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, Diatta G, Bassene H, Molez JF, Sokhna C, Trape JF & Raoult D., 2010b: *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis.*, **4**: e65.
- Mediannikov O, Socolovschi C, Edouard S, Fenollar F, Mouffok N, Bassene H, Diatta G, Tall A, Niangaly H, Doumbo O, Lekana-Douki JB, Znazen A, Sarih M, Ratmanov P, Richet H, Ndiath MO, Sokhna C, Parola P & Raoult D, 2013: Common epidemiology of *Rickettsia felis* infection and malaria, Africa. *Emerg Infect Dis.*, **19**: 1775-1783.
- Mediannikov O, Socolovschi C, Bassene H, Diatta G, Ratmanov P, Fenollar F, Sokhna C & Raoult D, 2014: *Borrelia crocidurae* infection in acutely febrile patients, Senegal. *Emerg Infect Dis.*, **20**: 1335-1338.
- Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S & Schmahl G, 2008: Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitol Res.*, **103**: S79-S86.
- 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. *Prev Vet Med.*, **87**: 55-63.
- Meiswinkel R, Gomulski LM, Delécolle JC, Goffredo M & Gasperi G, 2004: The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. *Vet. Ital.*, **40**: 151-159.
- Meiswinkel R, Nevill EM & Venter GJ, 1994: 'Vectors: *Culicoides* spp.', in Coetzer JAW, Thomson GR & Tustin RC (eds.), Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa, Oxford University Press, Cape Town, pp. 68-89.
- Meiswinkel R, van Rijn P, Leijns P & Goffredo M, 2007: Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec.*, **161**: 564-565.
- Meiswinkel R, 1989: Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (*Diptera: Ceratopogonidae*) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.*, **56**: 23-39.
- 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. *Prev Vet Med.*, **87**: 55-63.

- Mellor PS, Baylis M & Mertens PPC, 2009: Bluetongue. *Elsevier*, UK, London, 484 p.
- Mellor PS, Boned J, Hamblin C & Graham S, 1990: Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. *Epidemiology and Infection*, **105**: 447-454.
- Mellor PS, Boorman J & Baylis M, 2000: *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.*, **45**: 307-340.
- Mellor PS, Boorman JPT, Wilkinson PJ & Martinez-Gomez F, 1983: Potential vectors of bluetongue and African horse sickness viruses in Spain. *Veterinary Record*, **5**: 229.
- Mellor PS & Hamblin C, 2004: African horse sickness. *Vet Res.*, **35**: 445-466.
- Mellor PS, Osborne R & Jennings DM, 1984: Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan. *J Hyg. (Lond)*, **93**: 621-628.
- Mellor PS & Wittmann EJ, 2002: Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet J.*, **164**: 20-37.
- Méroc E, De Regge N, Riocreux F, Caij AB, van den Berg T & van der Stede Y, 2014: Distribution of Schmallenberg virus and seroprevalence in belgian sheep and goats. *Transbound Emerg Dis.*, **61**: 425-431.
- Mildenberg Z, Westcott D, Bellaiche M, A. Dastjerdi, Steinbach F & Drew T, 2009: Equine encephalosis virus in Israel. *Transbound Emerg Dis.*, **56**: 291.
- Mohammed ME & Mellor PS, 1990: Further studies on bluetongue and bluetongue-related orbiviruses in the Sudan. *Epidemiol Infect.*, **105**: 619-632.
- Monath TP, Cropp CB & Harrison AK, 1983: Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab. Invest.*, **48**: 399–410.
- Morii T, Shiihara T, Lee YC, Manuel MF, Nakamura K, Iijima T & Hoji K, 1981: Seroimmunological and parasitological surveys of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens in several Asian countries. *Int J Parasitol*, **11**: 187-190.
- Mullen GR, 2009: Biting midges (*Ceratopogonidae*) In: Mullen GR & Lance A, *Medical and Veterinary Entomology*, **2nd edition**. Elsevier, New York, 163-183.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H, 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, **51**: 263-273.
- Muñoz-Muñoz F, Talavera S & Pagès N, 2011: Geometric morphometrics of the wing in the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): from practical implications to evolutionary interpretations. *J Med Entomol.*, **48**: 129-139.
- Murray KO, Baraniuk S, Resnick M, Arafat R, Kilborn C, Shallenberger R, York TL, Martinez D, Malkoff M, Elgawley N, McNeely W & Khuwaja SA, 2008: Clinical investigation of hospitalized human cases of West Nile virus infection in Houston, Texas, 2002–2004. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **8**: 167-174.
- Murray KO, Mertens E & Despres P, 2010: West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res.*, **41**: 67.
- Murray MD, 1991: The seasonal abundance of female biting-midges, *Culicoides brevitarsis* (Diptera, Ceratopogonidae), in coastal southeastern Australia. *Australian. Journal of Zoology* **39**: 333-342.
- Murray M, Thompson WF, 1980: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* **8**: 4321–4325
- Nakamura K, Ogiso M, Shibahara T, Kasuga H & Isobe T, 2001: Pathogenicity of *Leucocytozoon caulleryi* for specific pathogen-free laying hens. *J Parasitol.*, **87**:1202-1204.
- Nakamura Y, Kawai S, Yukuhiro F, Ito S, Gotoh T, Kisimoto R, Yanase T, Matsumoto Y, Kageyama D & Noda H, 2009: Prevalence of *Cardinium bacteria* in planthoppers and spider mites and taxonomic revision of "*Candidatus Cardinium hertigii*" based on detection of a new *Cardinium* group from biting midges. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 6757-6763.
- Naugle DE, Aldridge CL, Walker BL, Cornish TE, Moynahan BJ, Holloran MJ, Brown K, Johnson GD, Schmidtman ET, Mayer RT, Kato CY, Matchett MR, Christiansen TJ, Cook WE, Creekmore T, Falise RD, Tinkes ET & Boyce MS, 2004: West Nile Virus: Pending Crisis for the Greater Sage-Grouse. *Ecology Letters*, **7**: 704-713.

- Nielsen SA & Kristensen M, 2011: Morphological and molecular identification of species of the *Obsoletus* group (*Diptera: Ceratopogonidae*) in Scandinavia. *Parasitol Res.*, **109**: 1133-1141.
- Nocker A, Burr M & Camper AK, 2007: Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb Ecol.*, **54**: 276-289.
- Noireau F, Itoua A & Carme B, 1990: Epidemiology of *Mansonella perstans* filariasis in the forest region of south Congo. *Ann Trop Med Parasitol*, **84**: 251-254.
- Nolan DV, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas JF, Mordue Luntz AJ & Piertney SB, 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.
- Nolan DV, Dallas JF, Piertney SB & Mordue Luntz AJ, 2008: Incursion and range expansion in the bluetongue vector *Culicoides imicola* in the Mediterranean basin: a phylogeographic analysis. *Med Vet Entomol.*, **22**: 340-351.
- Nunes MR, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Azevedo Rdo S, da Rosa AP & Vasconcelos PF, 2005: Oropouche virus isolation, southeast Brazil. *Emerg Infect Dis*, **11**: 1610-1613.
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR & Stahl DA, 1986: Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol.*, **40**: 337-365.
- Oura CA1, Batten CA, Ivens PA, Balcha M, Alhassan A, Gizaw D, Elharrak M, Jallow DB, Sahle M, Maan N, Mertens PC & Maan S, 2011: Equine encephalosis virus: evidence for circulation beyond southern Africa. *Epidemiol Infect.*, **140**: 1982-1986.
- Oyerinde JP, Odugbemi T & Fagbenro-Beyioku AF, 1988: Investigations of filarial worms of man in metropolitan Lagos. Short communication. *Acta Trop.*, **45**: 191-192.
- Pagès N & Monteys VSI, 2005: Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (*Diptera: Ceratopogonidae*) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *J Med Entomol.*, **42**: 1026-1034.
- Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C & Núñez 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.
- Pavlovic M, Berdat P, Holzer B, Aebi C, Carrel T & Pfammatter JP, 2003: Severe mitral valve involvement in a child with hypereosinophilia secondary to parasitic infection. *J Heart Valve Dis.*, **12**: 649-651
- Perera MR, Vargas RDF & Jones MGK, 2005: Identification of aphid species using protein profiling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **117**: 243-247.
- Périé P, Chermette R, Millemann Y & Zientara S, 2005: Les *Culicoides*, diptères hématophages vecteurs de la fièvre catarrhale du mouton. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **158**: 213-224.
- Perrin A, Cetre-Sossah C, Mathieu B, Baldet T, Delecolle JC & Albina E, 2006: Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med Vet Entomol*, **20**: 219-228.
- Pinheiro FP, Rocha AG, Freitas RB, Ohana BA, Travassos da Rosa AP, Rogério JS & Linhares AC, 1982: Meningitis associated with Oropouche virus infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **24**: 246-251.
- Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA & Vasconcelos PFC, Eds. (2004). Oropouche fever. In: Feigin, R.D., Cherry, J.D., Demmler, G.J., Kaplan, S.L. (Eds.), Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 2 vols., fifth ed. Saunders, Philadelphia, pp. 2418–2423.
- Podlipaev S, Votýpka J, Jirků M, Svobodová M & Lukes J, 2004: *Herpetomonas ztiplika* n. sp. (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*): a parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (*Diptera: Ceratopogonidae*). *J Parasitol.*, **90**: 342-347.
- Ponsart C, Pozzi N, Bréard E, Catinot V, Viard G, Sailleau C, Viarouge C, Gouzil J, Beer M, Zientara S & Vitour D, 2014: Evidence of excretion of Schmallerberg virus in bull semen. *Vet Res.*, **45**: 37.

- Purse BV, Nedelchev N, Georgiev G, Veleva E, Boorman J, Denison E, Veronesi E, Carpenter S, Baylis M & Mellor PS, 2006: Spatial and temporal distribution of bluetongue and its *Culicoides* vectors in Bulgaria. *Med Vet Entomol.* , **20**: 335-344.
- Pybus MJ, Ravi M & Pollock C, 2014: Epizootic Hemorrhagic Disease in Alberta, Canada. *J Wildl Dis.*, **50**: 720-722.
- Raccurt CP, Brasseur P & Boncy J, 2014: Mansonelliasis, a neglected parasitic disease in Haiti. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, **109**: 709-711.
- 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.
- Roberts HC, Elbers AR, Conraths FJ, Holsteg M, Hoereth-Boentgen D, Gethmann J & van Schaik G, 2014: Response to an emerging vector-borne disease: surveillance and preparedness for Schmallenberg virus. *Prev Vet Med.*, **116**: 341-349.
- Roepstorff P, 2000: MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry. *EXS*, **88**: 81-97.
- Roucher C, Mediannikov O, Diatta G, Trape JF & Raoult D., 2012: A new *Rickettsia* species found in fleas collected from human dwellings and from domestic cats and dogs in Senegal. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **12**: 360-365.
- Sabio IJ, Mackay AJ, Roy A & Foil LD, 2006: Detection of West Nile virus RNA in pools of three species of ceratopogonids (*Diptera: Ceratopogonidae*) collected in Louisiana. *J Med Entomol.*, **43**: 1020-1022.
- Saeed MF, Wang H, Nunes M, Vasconcelos PF, Weaver SC, Shope RE, Watts DM, Tesh RB & Barrett AD, 2000: Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. *J Gen Virol.*, **81**: 743-748.
- Sambou M, Faye N, Bassene H, Diatta G, Raoult D & Mediannikov O, 2014: Identification of rickettsial pathogens in ixodid ticks in northern Senegal. *Ticks Tick Borne Dis*, **5**: 552-556.
- Savini G, Afonso A, Mellor P, Aradaib I, Yadin H, Sanaa M, Wilson W, Monaco F & Domingo M, 2011: Epizootic heamorrhagic disease. *Res Vet Sci.*, **91**: 1-17.

- Schmaljohn CS & Nichol ST, Eds. (2007). Bunyaviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M (Eds.), Fields Virology, vol. 2, fifth ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Schmidtman ET, Herrero MV, Green AL, Dargatz DA, Rodriguez JM & Walton TE, 2011: Distribution of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Nebraska, South Dakota, and North Dakota: clarifying the epidemiology of bluetongue disease in the northern Great Plains region of the United States. *J Med Entomol.*, **48**: 634-43.
- Seblova V, Sadlova J, Vojtkova B, Votypka J, Carpenter S, Bates PA & Volf P, 2015: The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. *PloS Negl Trop Dis.*, **9**: e0004060
- Seblova V, Sadlova J, Carpenter S & Volf P, 2012: Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *J Med Entomol.*, **49**: 967-970.
- Silver JB & Service MW, 2008: Sampling adults by animal bait catches and by animal-baitedtraps. In: Mosquito ecology field sampling methods. *Springer, Dordrecht, the Netherlands*. p. 493-675.
- Simonsen PE, Onapa AW & Asio SM, 2011: *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Trop.*, **120**: S109– S120.
- Slama D, Haouas N, Remadi L, Mezhoud H, Babba H & Chaker E, 2014: First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit Vectors*, **7**: 51.
- Sleeman JM1, Howell JE, Matthew Knox W & Stenger PJ, 2009: Incidence of hemorrhagic disease in white-tailed deer is associated with winter and summer climatic conditions. *Ecohealth.*, **6**: 11-15.
- Smeets F, Robert N, Simonon G, Paternostre J, Caron Y, Zimmer JY, Fassotte C, Haubruge E & Losson B, 2012: Les *Culicoides*, importants vecteurs de maladies du bétail. *Allocutions et communications diverses*.

- Socolovschi C, Mediannikov O, Sokhna C, Tall A, Diatta G, Bassene H, Trape JF & Raoult D, 2010: *Rickettsia felis*-associated uneruptive fever, Senegal. *Emerg Infect Dis.*, **16**: 1140-1142.
- Socolovschi C, Pages F, Ndiath MO, Ratmanov P & Raoult D, 2012: *Rickettsia* species in African *Anopheles* mosquitoes. *PLoS One*, **7**: e48254.
- Sokhna C, Mediannikov O, Fenollar F, Bassene H, Diatta G, Tall A, Trape JF, Drancourt M & Raoult D, 2013: Point-of-care laboratory of pathogen diagnosis in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**: e1999.
- St George TD & Standfast HA, 1988: Bovine ephemeral fever. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, ed. TP Monath, 2:71–86. Boca Raton, FL: CRC.
- Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR, 1985: Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol.*, **49**: 1379-84.
- Standing KG, 2000: Timing the flight of biomolecules: a personal perspective. *International Journal of Mass Spectrometry*, **200**: 597-610.
- Steinmann IC, Pflüger V, Schaffner F, Mathis A & Kaufmann C, 2013: Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for the identification of ceratopogonid and culicid larvae. *Parasitology*, **140**: 318-327.
- Stephan A, Clausen PH, Bauer B & Steuber S, 2009: PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (*Diptera: Ceratopogonidae*), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitol Res.*, **105**: 367-371.
- Strupat K, Karas M & Hillenkamp F, 1991: 2,5-Dihydroxy benzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom*, **111**: 89-102.
- Sun F, Cochran M, Beckham T & Clavijo A, 2014: Molecular typing of epizootic hemorrhagic disease virus serotypes by one-step multiplex RT-PCR. *J Wildl Dis.*, **50**: 639-644.
- Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J & Votýpka J, 2007: *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (*Trypanosomatidae, Kinetoplastida*), a parasite of biting midges (*Ceratopogonidae, Diptera*). *Int J Syst Evol Microbiol.*, **57**: 423-432.

- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y & Yoshida T, 1988: Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **2**: 151-153.
- Tang TH, López-Vélez R, Lanza M, Shelley AJ, Rubio JM & Luz SL, 2010: Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, **105**: 823-828.
- Temizel EM, Yesilbag K, Batten C, Senturk S, Maan NS, Clement-Mertens PP & Batmaz H, 2009: Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerg Infect Dis.*, **15**: 317-319.
- 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.
- Turell MJ, Dohm DJ, Mores CN, Terracina L, Wallette DL Jr, Hribar LJ, Pecor JE, Blow JA, 2008: Potential for North American mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus. *J Am Mosq Control Assoc.*, **24**:502-507.
- Udonsi JK, 1988: Filariasis in the Igwun River Basin, Nigeria: an epidemiological and clinical study with a note on the vectors. *Ann Trop Med Parasitol.*, **82**: 75-82.
- Ufomadu GO, Nwoke BE, Akoh JI, Sato Y, Ekejindu GO, Uchida A, Shiwaku K, Tumbau M & Ugomo KK, 1990: The occurrence of loiasis, mansonellosis and wuchereriosis in the Jarawa River Valley, central Nigeria. *Acta Trop.*, **48**: 137-147.
- Uhlmann KR, Gibb S, Kalkhof S, Arroyo-Abad U, Schulz C, Hoffmann B, Stubbins F, Carpenter S, Beer M, von Bergen M & Feltens R., 2014: Species determination of *Culicoides* biting midges via peptide profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Parasit Vectors*, **7**: 392.
- Uttah EC, 1998. Studies on the epidemiology of filariasis in the Imo River Basin, Nigeria. University of Port Harcourt, p. 1-401.
- Vasconcelos HB, Azevedo RS, Casseb SM, Nunes-Neto JP, Chiang JO, Cantuária PC, Segura MN, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG, Nunes MR & Vasconcelos PF, 2009:

- Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol.*, **44**:129-33.
- Veldhuis AM, Santman-Berends IM, Gethmann JM, Mars MH, van Wuyckhuise L, Vellema P, Holsteg M, Höreth-Böntgen D, Conraths FJ & van Schaik G, 2014: Schmallenberg virus epidemic: impact on milk production, reproductive performance and mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany. *Prev Vet Med.*, **116**: 412-422.
- Veldhuis AM, van Schaik G, Vellema P, Elbers AR, Bouwstra R, van der Heijden HM & Mars MH, 2013: Schmallenberg virus epidemic in the Netherlands: spatiotemporal introduction in 2011 and seroprevalence in ruminants. *Prev Vet Med.*, **112**: 35-47.
- 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. *Prev Vet Med.*, **93**: 294-304.
- Venter GJ, Graham SD, Hamblin C, 2000: African horse sickness epidemiology: vector competence of South African *Culicoides* species for virus serotypes 3, 5 and 8. *Med Vet Entomol.*, **14**: 245-250.
- Veronesi E, Antony F, Gubbins S, Golding N, Blackwell A, Mertens PP, Brownlie J, Darpel KE, Mellor PS & Carpenter S, 2013: Measurement of the Infection and Dissemination of Bluetongue Virus in *Culicoides* Biting Midges Using a Semi-Quantitative RT-PCR Assay and Isolation of Infectious Virus. *PLoS One.*, **8**: e70800.
- Vianna LM, Martins M, Cohen MJ, Cohen JM & Belfort RJr, 2012: *Mansonella ozzardi* corneal lesions in the Amazon: a cross-sectional study. *BMJ Open.*, **2**: e001266.
- Viennet E, Garros C, Gardès L, Rakotoarivony I, Allène X, Lancelot R, Crochet D, Moulia C, Baldet T & Balenghien T, 2013: Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges: implications for transmission of orbiviruses. *Med Vet Entomol.*, **27**: 255-266.
- Vigil SL, Wlodkowski JC, Parris J, Edwards de Vargas S, Shaw D, Cleveland C, Grogan WLJr & Corn JL, 2014: "New records of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille from the southeastern United States (*Diptera: Ceratopogonidae*)". *Insecta Mundi.*, **0394**: 1-14.

- Villegas J, Feliciangeli MD & Dujardin JP, 2002: Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infect Genet Evol.*, **2**: 121-128.
- Vroh Bi I, Harvengt L, Chandelier A, Mergeai G, Du Jardin P, 1996: Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breed.*, **115**: 205–206.
- Walton TE, 2004: The history of bluetongue and a current global overview. *Vet Ital.*, **40**: 31-38.
- Walzer BGW, 2009: Les insectes du genre *Culicoides* vecteurs de maladies animales. *Medecine, École Nationale Veterinaire d'ALFORT*, 220p.
- Wenk CE, Kaufmann C, Schaffner F & Mathis A, 2012: Molecular characterization of Swiss *Ceratopogonidae* (Diptera) and evaluation of real-time PCR assays for the identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Parasitol.*, **184**: 258-266.
- Wernike K, Conraths F, Zanella G, Granzow H, Gache K, Schirrmeier H, Valas S, Staubach C, Marianneau P, Kraatz F, Höreth-Böntgen D, Reimann I, Zientara S & Beer M, 2014: Schmallenberg virus-two years of experiences. *Prev Vet Med.*, **116**: 423-434.
- Wiley WC & McLaren IH, 1955: Time-Of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev Sci Instrum.*, **26**: 1150.
- Wirth WW & Dyce AL, 1985: The current taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses. In : Barber TL & Jochim MM, (Eds.), Progress in clinical and biological research. **Vol. 178**. Bluetongue and related Orbiviruses: 151-164.
- Wirth WW, Dyce AL & Peterson BV, 1985: An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the nearctic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Contrib Amer Ent Inst.*, **22**: 1-46.
- Wirth WW, Dyce AL & Spinelli GR, 1988: An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Contrib Amer Ent Inst.*, **25**: 2-72.
- Wirth WW & Hubert AA, 1989: The *Culicoides* of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Am Entomol Inst.*, **44**: 1-508.

- Wittmann EJ & Baylis M, 2000: Climate change: effects on culicoides--transmitted viruses and implications for the UK. *Vet J.*, **160**:107-117.
- Wolff MM & Stephens WE, 1953: A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Rev Sci Instrum.*, **24**: 616.
- Yadin H, Brenner J, Bumbrov V, Oved Z, Stram Y, Klement E, Perl S, Anthony S, Maan S, Batten C & Mertens PP, 2008: Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel. *Vet Rec*, **162**: 53-56.
- Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger JM, Raoult D, Parola P, 2013a: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol.*, **51**: 522-528.
- Yssouf A, Socolovschi C, Flaudrops C, Ndiath MO, Sougoufara S, Dehecq JS, Lacour G, Berenger JM, Sokhna CS, Raoult D, Parola P, 2013b: Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry: an emerging tool for the rapid identification of mosquito vectors. *PLoS One*, **8**: e72380.
- Yssouf A, Parola P, Lindström A, Lilja T, L'Ambert G, Bondesson U, Berenger JM, Raoult D, Almeras L, 2014a: Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS. *Parasitol Res.* 113: 2375-2378.
- Yssouf A, Socolovschi C, Leulmi H, Kernif T, Bitam I, Audoly G, Almeras L, Raoult D, Parola P, 2014b: Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 37: 153-157.
- Yu CY, Wang JS & Yeh CC., 2001: *Culicoides arakawae* (Diptera: Ceratopogonidae) population succession in relation to leucocytozoonosis prevalence on a chicken farm in Taiwan. *Vet Parasitol.*, **93**: 113-120.
- Zimmer JY, Haubruge E & Francis F, 2014: Synthèse bibliographique : l'écologie larvaire des culicoïdes (Diptera : Ceratopogonidae). *Biotechnol. Agron Soc Environ.*, **18**: 301-312.
- Zimmer JY, Losson B, Saegerman C & Haubruge E, 2009: Ecologie et distribution des espèces de *Culicoides* Latreille 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) à proximité d'une exploitation bovine en Belgique. *Ann Soc Entomol Fr.*, **45**: 393-400.

Zimmer JY, Haubruge E, Francis F, Bortels J, Simonon G, Losson B, Mignon B, Paternostre J, De Deken R, De Deken G, Deblauwe I, Fassotte C, Cors R & Defrance T, 2008:
Breeding sites of bluetongue vectors in northern Europe. *Vet Rec.*, **162**: 131.

ANNEXES

Annexe 1: review

CERATOPOGONIDAE AS INFECTIOUS DISEASE VECTORS

Masse Sambou^{1,2}, Ngor Faye², Maxence Aubadie-Ladrix¹, Hubert Bassene¹, Didier Raoult¹
and Oleg Mediannikov¹

3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

CERATOPOGONIDAE AS INFECTIOUS DISEASE VECTORS

Masse Sambou^{1,2}, Ngor Faye², Moussa Fall^{2,3}; Hubert Bassene¹, Maxence Aubadie-Ladrix¹,
Didier Raoult¹ and Oleg Mediannikov¹

¹Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS
7278, IRD 198, Inserm 1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Aix-
Marseille Université, Marseille, France and Dakar, Senegal
²Uuniversité Cheikh Anta Diop (UCAD), Dakar, Senegal
³Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires, ISRA, Route Front de
Terre, Dakar, Senegal.

Word count abstract: 112
Word count text: 5, 101

17 **Abstract**

18 Blood sucking *Ceratopogonidae* are economically important protozoan, filarial and arbovirus
19 vectors that affect domestic animals and humans. The lack of proper *Ceratopogonidae* species
20 identification systems is a main obstacle of research progress, particularly in Africa.
21 Morphological identification of biting midges can be both tedious and time consuming.
22 Molecular identification is expensive, but it is a very accurate species identification method.
23 Protein profiling by MALDI-TOF is a quick and inexpensive tool and can be used as an
24 alternative to accurately identify biting midges that are collected in the field. Here, we review
25 the possible *Ceratopogonidae* species identification methods and the pathogens they are
26 associated with, with priority given to the *Culicoides* genus species.

27

28 **Keys Words:** *Ceratopogonidae* - Methods Identification - Vectors - Pathogens.

1. Introduction

Ceratopogonidae, commonly known as biting midges, are a remarkably diverse and interesting family of biting flies. The biting midges have a bad reputation as nasty biters that pester humans and domestic animals and as harmful disease vectors[1, 2]. Currently, many animal and human diseases that were previously qualified as emerging or exotic are appearing worldwide. A number of them have spread over the continents via acting arthropod vectors. Among these arthropods are the bloodsucking *Ceratopogonidae* family genera, particularly the genus *Culicoides*, which midges belong to.

The *Culicoides* biting midges are hematophagous *Ceratopogonidae* insects that occur throughout most of the inhabited world, transmitting some human and domestic or wild animal disease-causing pathogens [3]. Worldwide, more than 50 arboviruses have been isolated from *Culicoides*, most from within the *Bunyaviridae* (20 viruses), *Reoviridae* (19 viruses), and *Rhabdoviridae* families (11 viruses) [4]. Many of these viruses have been isolated more frequently from other arthropod groups, and their association with the *Culicoides* species is probably incidental. The only significant human viral pathogen that is transmitted biologically by *Culicoides* is the Oropouche virus (OROV) [5].

Vector identification is an important step in the epidemiology of vector-borne diseases. Information regarding the major vector species will provide a clearer indication of the geographic distribution of the disease[6]. More than 5,540 species of *Ceratopogonidae* are described, and it is reasonable to estimate that there are at least 15,000 morphologically distinct species on the planet [2]. Many species have yet to be described and understood. The morphological identification of these tiny insects at the species level is very difficult in many cases[7] because it requires the time-consuming analysis method of slide-mounted microscopical insect preparations[8]. Several attempts have been made to clarify the

relationships among species within the genus *Culicoides* [1, 8]. This genetic information has enabled us to conduct the molecular identification of *Culicoides* species (*Ceratopogonidae*) using polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR assays based on DNA sequence variations [8-11]. A novel alternative identification approach has proved to be a potential method of choice for a centralized, robust and high-throughput midge population screening method (adults and larvae) in connection with the surveillance of eventually emerging midge-transmitted agents [12-16]. One of the important limitations of *Ceratopogonidae* molecular identification is the extreme paucity of genetic data available in open sources. For instance, GenBank has the entire or partial cytochrome oxidase I (COI) sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) for only 111 of 1,300 *Culicoides* species that are recognized to date (<http://www.inhs.illinois.edu/files/8413/4219/9566/CeratopogonidaeCatalog.pdf>).

This review covers earlier papers that have discussed the identification methods and roles of *Ceratopogonidae* in public health worldwide, with priority given to the genus *Culicoides* species.

2. Methodology

Articles were identified by searching PubMed database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) using various combinations of keywords including “*Ceratopogonidae*”, “genus *Culicoides*”, “*Culicoides* identification methods”, “Pathogens” AND “*Culicoides*”. Non-peer-reviewed articles and theses, books, etc. were searched in local libraries and websites. We also performed our review searching lock articles in BiblioVIE (<http://bibliovie.inist.fr/>) “Portail d’information scientifique des unités CNRS en Sciences Biologiques”.

3. *Ceratopogonidae* Biology

The *Ceratopogonidae* family contains 125 genera with approximately 5,540 species [17]. However, the blood-sucking *Ceratopogonidae* species are only included in four genera: *Austroconops*, *Culicoides*, *Forcipomyia* subgenus *Lasiohela*, and *Leptoconops*. The *Ceratopogonidae* species all share a basic life cycle, including an egg stage that lasts a few days, four larval instars, a short-lived pupal stage, and male or female adult stages. Only two *Culicoides* genus species are known to be parthenogenetic [17]; however, other studies have reported that no parthenogenetic *Culicoides* species exists (summarized in Walzer, 2009). Their life cycle involves holometabolous development, which means that the larvae and pupae do not resemble the adults (**Fig. 1**). The majority of the *Culicoides* species, which live in temperate climates between 13 and 35°C, present, on average, two generations per year with two larval diapauses: winter and summer-hibernation [18]. This comportment ensures the survival of the species if the larvae generation is very low during adverse conditions. The average time between egg development and adult emergence varies according to the geographical location and climatic conditions [5].

Most adult *Ceratopogonidae* species feed on nectar and play an important role in pollination. Blood sucking females have a feeding activity that varies according to the species. Most female *Leptoconops*, *Austroconops*, and *Forcipomyia* species are daytime biters, while most *Culicoides* are crepuscular or nocturnal feeders [2]. Mating, preceded by nuptial flight, usually takes place in large spaces. Following mating, the females have an increased need for blood for egg development and become very aggressive [19]. Each laying of eggs is preceded by a blood meal, and egg production occurs on average two days after the blood meal [18].

The eggs are then deposited at ground level in variety of places, but they are generally wet and often immersed with organic matter (e.g., mud and animal dung) [18]. The eggs are banana shaped and are white when laid but darken rapidly [5]. The hatching takes place on average between two to eight days after oviposition under more than less favorable

environmental conditions because the eggs are not resistant to drying [5, 18]. The larva then emerges from the egg, which is a typical nematocera, and it then passes through four developmental stages [18].

Indeed, larval development (5 days to a few weeks) is optimal in environments that are semi-aquatic, which are mainly represented by moist substrates that are warm and rich in organic matter (e.g., feces, wet meadows, muddy roads, and rivers edge vase). The larvae can feed on organic debris, bacteria, protozoa, fungi or other arthropods and nematodes and rarely may eat other larvae if environmental conditions are unfavorable [5].

The pupae do not feed [18]. They not very active, and they are usually found on the surface of the medium in which they developed; the duration (2-10 days) of this stage is dependent upon temperature and the *Culicoides* species [5].

4. *Methods of identification*

4.1. *Morphological*

Fundamental entomological taxonomic expertise is an increasing concern worldwide, and it is based directly upon disciplines as diverse as biodiversity conservation, medical and veterinary entomology and pest management. The morphological taxonomy is the most commonly used means for identification by biologists worldwide [20].

Very few studies have been conducted on the morphology of the immature stages. Borkent (2014) reported that 13% of the larvae and 17% of pupae from all known adults species have been characterized and it is probably due to the difficulties of collecting and diagnosis immature compared to adults. However, all immature species characterized their adult stage was well described (Harrup et al., 2015), with the exception of the study of Nevill

et al (2009) who described pupae of two african species whose adults are difficult to separate morphologically.

The genus *Culicoides* adults internal taxonomy has mainly relied on morphological identifications, which are based on the following: wing pigmentation pattern, antennal segment length and shape, male genitalia characteristics, antennae sensillae distribution, and the spermathecae number and size in females [6, 21]. Adults *Culicoides* are remarkable for the wing patterns that are pigmentation and macrotrichia. These patterns can be used in certain species as the main criteria for diagnosis. Identification of the genus *Culicoides* (**Fig. 2**) to the species level is difficult even for taxonomist specialists, and sibling species within species complexes can be indistinguishable with classical morphological methods [25]. The wing is of primary importance to entomologists interested in systematic identification and has been used in morphological identification of the *Culicoides* species at an important discrimination level [25]. On the Iberian Peninsula, Rawling developed a key using only the characteristic wing patterns [6]. Later, many entomologic studies reported that geometric morphometrics is a powerful and cheap characterizing tool for many organisms, including sand flies [22]; triatomines [22, 23]; tsetse flies [24]; and, recently, biting midges [25]. In the Western Palaearctic area, Mathieu et al., 2012 developed, for the first time, a *Culicoides* interactive identification key for (IIKC) females using morphological characteristics [20].

Key identification morphologic aids to the *Culicoides* of fauna afrotropical region and other regions were defined by Holt et al, 2013 (summarized in Harrup et al., 2015).

In Africa, some studies have been performed to identify *Ceratopogonidae*. Most studies concerned only the *Culicoides* genus [26]. In West Africa, few morphological studies have been performed, mainly in Senegal, and only 30 species of *Culicoides* have been recorded [27]. However, these entomological studies go back a long time. No key encompassing the

entire West African *Culicoides* species diversity exists. Therefore, several dichotomous keys or species descriptions are needed for morphological identification of *Culicoides* species.

4.2. *Molecular biology*

Culicoides molecular identification is an alternative approach for *Culicoides* identification. This approach is much more accurate than the morphological identification approach. However, the morphological identifications of *Culicoides* by taxonomists have commonly been shown concordant with subsequent studies utilizing molecular tools (Sambou et al., 2015; Gomulski et al., 2006). But there are exceptions like the cryptic species (conspecific) that are not separable by the morphology may require genetic reassessment. This is the example of the *C. similis* group species in Africa whose morphological discrimination of some species are almost impossible. Currently several genetic markers were evaluated positive for *Culicoides* molecular identification (summarized in Harrup et al, 2015). These molecular markers are of coding or non-coding DNA regions. Until recently, 4 markers of ribosomal DNA (DNAr) were used in the investigations of *Culicoides* molecular identification. Two regions of these markers (Internal Transcribed Spacer (ITS 1 and 2): Gamulski et al, 2005; 2006; Perin et al, 2006) are non-coding; the other two coding regions (28S and 5.8S: Henni et al, 2014; Mathieu 2011) were more recent and very little used for the genetic characterization of the *Culicoides*. Others molecular markers used are the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I and II (COI & II, barcode region: Dallas et al., 2003; Matsumoto et al., 2009) and cytochrome B (Cytb: Mathieu, 2011) genes. Moreover, molecular phylogenetic analysis allowed for phylogenetic trees to be built that help to represent the taxonomic position of each species and group the arthropods based on genetic proximities (**Fig. 3**).

In 2008, Baldet et al. [31] postulated that it is impossible to separate the *C. obsoletus* and *C. scoticus* females by morphological characteristics, and in some reports, the four *C. obsoletus* and *C. scoticus* species, or at least the females, are described or grouped as one entity [7]. Furthermore, they have been suggested to be races rather than species [32]. Another study confirmed that the molecular barcoding method based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I, COI, was reliable for inter- and intra-species biting midge differentiation [33]. Additionally, molecular technique development and implementation with ITS1 and ITS2 [30] have been valuable in elucidating the phylogenetic relationships within the *Culicoides* genus [30].

However, in 2011, Nielsen and Kristensen reported that the sequences obtained with ITS1 are generally of low quality [34]. Additionally, Matsumoto and colleagues reported that none of the ITS2 PCR products were accurate and that they seemed to include many different sequences even from one individual sample [10]. Consequently, ITS1 and ITS2 are rarely employed for *Culicoides* identification. COI has emerged and served as the DNA barcode “gold standard” and has been used routinely for most Metazoa (<http://www.barcodeoflife.org>), including in *Culicoides* studies. In European *Culicoides* populations, identification using COI commonly showed a high intra- or interspecific divergence [1, 8]. Pages and Monteys (2005), in a report that examined *C. obsoletus* and *C. scoticus* differentiation using both morphological and molecular techniques, did not find reliable characteristics when looking at variations regarding spermathecae size and the shape of chitinous plates surrounding the genital opening of females [35]. In contrast, in a study by Garros and collaborators, morphological and molecular characteristics used together supported the existence of *C. obsoletus* and *C. scoticus* as two taxa [36], as was previously confirmed with a phylogenetic tree-based study. In Senegal, Bakhoum et al used this approach

to re-evaluate the status of the *C. schultzei* group species, and they reported four different species (*Culicoides kingi*, *C. oxystoma*, *C. enderleini* and *C. nevillei*) [37].

4.3. Mass-spectrometry

The morphological identification of these tiny (1–3 mm) insects at the species level is very difficult in many cases [7], requiring time-consuming slide-mounted microscopical insect preparation analyses [38]. Several PCR-based tests have been developed for the specific identification of a number of species in single- or multiplexed assays both in conventional and in real-time PCR formats [11]; however, only a single or few (in multiplexed assays) species can be identified in a test. Another alternative technique for species identification has emerged, which is named matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). This technique has been described for metazoan identification, namely fish [39], plant (lentil varieties) [40] and insect species (*Drosophila* fruit flies) [41], (aphid species) [42]. However, Kaufmann et al, 2011, demonstrated that MALDI-TOF MS analysis was suitable to reproducibly identify biomarker masses from laboratory-reared *C. nubeculosus* for the first time, and this was independent of the insects' sex and age. The only prerequisite was to remove the abdomen because host blood in female midges blurred the spectra during the first few days after a blood meal. In the same study, they showed that no differences were found in the spectra from thoraxes only or from thoraxes with the head, legs and wings attached, leaving these parts for other purposes, e.g., morphological and genetic identification [14]. One year later, two published works reported i) a biomarker mass database reference regarding field-caught biting midges and evaluation of the MALDI-TOF-based identification system in a blind study [12] and ii) an MALDI-TOF MS application for species identification of a large number of field-collected specimens [13]. A similar study used this approach to identify field-caught *Culicoides* species from Senegal [15] (**Fig. 4**). In addition to these adults, regarding *Culicoides* species

identification, Steinmann et al, 2013, established the first MALDI-TOF biomarker mass set reference database to identify holometabolous *Ceratopogonidae* larval stages [16]. Recently, Lafri and colleagues used this proteomics tool, for the first time, to identify six distinct sand flies species collected in the field (Lafri *et al.*, 2016). Their study showed that, the proteomic profiling protein tool could be applied for the classification of phlebotomine sand fly specimens and could be highly important for epidemiological and entomological investigations. The protein profiling by MALDI-TOF is a quick, inexpensive and accurate alternative tool that is applicable for identifying insect larvae and adults from vector species collected in the field. The cost of the device is an investment comparable to other facilities of a bacteriological laboratory, and it is quickly pay by the low cost of consumables. Additionally, MALDI-TOF would be relatively little interesting without a specific database, adapted, and can be updated regularly. The refinement and enrichment of databases are essential to develop the efficiency and accuracy of the technique. Still unknown there shortly, the MALDI-TOF mass spectrometry is the making of place within the medical entomology laboratories for identification in routine arthropods of interests.

5. *Pathogens transmitted or associated with Ceratopogonidae*

Various species of the genus *Culicoides* are a biting nuisance to humans, cause acute allergic dermatitis in animals, and transmit protozoa, viruses and filarial worms, which affect birds, humans, and other animals (**Table 1**).

5.1. *Viruses*

Worldwide, more than 50 arboviruses have been isolated from *Culicoides*. These viruses are transmitted by certain biting midge species that belong to the *Culicoides* genus (*Diptera: Ceratopogonidae*) and are maintained in nature through a series of alternating replication cycles between its *Culicoides* vectors and susceptible hosts or reservoirs (**Fig. 5**)

Bluetongue disease

Bluetongue disease is caused by the bluetongue virus (BTV), which is the prototype of the *Orbivirus* genus within the *Reoviridae* family [43]. BTV is one of the most extensively studied *Reoviridae* members and is transmitted to ruminants exclusively by bites from adults of certain *Culicoides* midge species. Bluetongue (BT) is endemic in many tropical and subtropical regions and in some regions with a temperate climate, including large parts of the Americas, Africa, southern Asia and northern Australia [44]. There are at least 26 different BTV serotypes that have been identified [45]. *Culicoides imicola* is the principal vector of these livestock diseases in Africa, Asia and Europe. However, other *Culicoides* species are also involved in BTV transmission especially in areas where *C. imicola* is missing [46]. In northern Europe, *C. obsoletus*, *C. pulicaris* groups, *C. nubeculosus* and *C. sonorensis* were implicated in BTV transmission [47]. Additionally, the major vectors species are *C. bolitinos* in Africa, *C. fulvus* and *C. brevitarsis* in Australia, *C. sonorensis* in North America, and *C. insignis* and *C. pusillus* in South and Central America [46] (**Fig. 6**).

Epizootic hemorrhagic disease virus

Epizootic hemorrhagic disease (EHD) is an arthropod-borne disease of wild and domestic ruminants caused by a virus belonging to the Epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) species within the Orbivirus genus of the *Reoviridae* family [48]. Epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) is the most widespread pathogenic arbovirus of white-tailed deer worldwide [49]. Infection often results in a fatal hemorrhagic disease with high mortality that can have a significant impact on deer breeding and hunting [50]. This virus is closely related to BTV and both can affect deer, sheep and cattle. Additionally, the clinical disease that is produced by EHDV and BTV is indistinguishable [50]. Kedmi and colleagues showed that the spatial distribution of BTV in Israel was similar to that of EHDV and consistent with similar epidemiological features of these two viruses [51]. The epidemiology associated with EHDV was observed in southern Alberta in 1962, where it caused 450 white-tailed deer, 20 mule deer, and 15 pronghorn antelope deaths [52]. In 2006, EHDV appeared in Israel [53] and Africa (Marocco and Algeria) and in Turkey in 2007 [54]. Seven serotypes (1-7) have been described around the world [55]. In North America, female *Culicoides sonorensis* and *C. variipennis* midges are important EHDV vectors [56, 57]. The major EHDV vectors in Europe are Obsoletus complex, *C. dewulfi*, *C. chiopterus* and Pulicaris complex [55]. The Schultzei group (such as *C. kingi* and *C. schultzei*) and other *Culicoides* spp were implicated in EHDV transmission in Africa; however, in Australia, *C. brevitarsis* is the major EHDV vector [56].

Schmallenberg virus

Schmallenberg virus (SBV) is a novel orthobunyavirus that was discovered in Germany in late 2011 using a metagenomic approach [58]. SBV is mainly infects cattle, sheep and goats and can lead to congenital infections, causing abortion and fetal abnormalities.

283 Additionally, SBV infections reduce the amount of milk that is produced on affected farms
284 [59, 60]. This new virus presents sequence similarities with the Simbu serogroup viruses [61].
285 Later, Garigliany and collaborators demonstrated the involvement of the virus in congenital
286 malformation, which remains SBV's primary clinical impact [62]. Additionally, two works
287 have confirmed SBV infections in deer [63] and camelids [64]. The very efficient and rapid
288 spread of the infection in 2011 was demonstrated by the high SBV infection prevalence that
289 was evaluated serologically [65]. Recently, SBV was identified by qPCR in bull semen in
290 France [66]. Many diagnostic methods are used to detect SBV (e.g., PCR, micro-
291 neutralization, indirect immunofluorescence test, and commercially available ELISAs), but
292 specific antibody detection is much more promising [67]. Several species of *Culicoides* biting
293 midges have been implicated in SBV transmission through studies conducted in Europe. The
294 main *Culicoides* implicated in SBV transmission are *Culicoides scoticus*, *C. obsoletus* s.s., *C.*
295 *dewulfi*, and *C. chiopterus* [68-70]. Very recently, Kirkeby and Dominiak reported that
296 *Culicoides gornostaevae* should be considered as a possible SBV vector species in Europe
297 [71].

298 *Oropouche virus*

299 *Oropouche virus* (OROV) is an emerging zoonotic pathogen of the *Bunyaviridae* family
300 and is the cause of one of the most important arboviral diseases in the Americas [5].
301 Oropouche fever is the second most frequent arboviral infection in Brazil, surpassed only by
302 dengue [72, 73]. In addition to outbreaks, Bernardes-Terzian and colleagues reported that
303 OROV can also cause sporadic human infections [74]. OROV causes large and explosive
304 outbreaks of acute febrile illness in cities and villages in the Amazon and Central-Plateau
305 regions of Brazil [72-74]. In the field, OROV has been isolated frequently from the *C.*
306 *paraensis* midge [75]. *C. paraensis* is typically found at a high density during ORO epidemics
307 and bites humans both inside houses and outside [76]. Biological transmission has been

demonstrated via *C. paraensis* from infected to susceptible hamsters and from infected humans to susceptible hamsters, with high transmission rates. Mellor et al, 2000, suggested that *C. paraensis* is the major OROV biological vector between humans during urban epidemics of the disease; however, the identity of the vector(s) of the virus in its “silent” sylvatic cycle remains unknown. Studies have indicated the existence of 3 OROV genotypes circulating in Brazil: genotypes I and II in the Amazon Basin and genotype III in the Southeastern Region [77].

West Nile Virus (WNV)

WNV is member of the *Flavivirus* genus (family *Flaviviridae*) [78]. WNV is endemic to Europe [79], the Middle East, Africa [80], Asia [81], Australia [81], and North America. In North America, WNV emerged in New York City in 1999 [82]. Since then, the virus has spread very rapidly over large parts of the continent [83]. Neurological disease is a WNV complication that was increasingly observed in humans following its introduction in USA [84]. Between 1999 and 2005, WNV was responsible for over 12,000 meningitis/encephalitis cases and over 1,100 human fatalities; survivors often suffer from a long-term neurological sequelae [85]. Mosquito species (mainly *Culex* spp.) are known as the key vector in this transmission cycle [86] worldwide. Other blood-sucking arthropods were also found capable of WNV replication and transmission under experimental conditions [87], although the role of these potential vectors in a natural setting has not been determined [85]. WNV was first detected in pools containing *Culicoides sonorensis* specimens [88]. One year later, WNV was detected in various *Culicoides* species, such as *C. arboricola*, *C. biguttatus*, and *C. stellifer* [89].

Other viruses

African horse sickness virus: African horse sickness (AHS) is a noncontagious, infectious, insect-borne disease of equids caused by a virus of the same name (AHSV). AHSV is a member of the *Orbivirus* genus in the *Reoviridae* family. AHS disease has been observed in South Africa since the seventeenth century and is associated with insect vectors [90]. The principal vectors are *Culicoides* spp. In 1944, Du Toi experimentally confirmed the transmission of AHSV by *C. imicola*. Later, Mellor et al, 1990 and 2004, experimentally demonstrated the transmission of AHSV in *C. sonorensis* and *C. obsoletus* [91]. Zebra have long been considered the natural vertebrate host and reservoir of AHSV, and they are believed to play a vital role in the persistence of the virus in Africa [91].

Equine encephalosis virus (EEV): EEV is a member of the *Orbivirus* genus in the *Reoviridae* family, and seven serotypes have been differentiated [56]. Recently, Mildenberg and colleagues reported equine encephalosis in Israel [92]. The virus had only been isolated from equids in South Africa [56]. The virus has been identified in South Africa, Gambia, Ethiopia, Ghana and Israel [92, 93], and the major vectors are *C. imicola* and *C. bolitinos* [56].

Akabane Virus (AKAV): AKAV is a member of the *Simbu* group of the *Bunyaviridae* family and infects a wide range of animals, including buffalo, cattle, camel, sheep, goats, and horses [94]. *Culicoides* species are the major AKAV vectors. The virus has been isolated from *C. brevitarsis* in Australia, *C. oxystoma* in Japan, *C. imicola* and *C. milnei* in Zimbabwe, *C. imicola* in Oman, and a mixed pool consisting mainly of *C. imicola* in South Africa [94].

Bovine ephemeral fever virus (BEFV): BEFV is a rhabdovirus that infects a range of ruminant species but seems to cause disease only in cattle and water buffalo [5]. The virus has been isolated from a pool of five *Culicoides* species (*C. kingi*, *C. nivosus*, *C. bedfordi*, *C. imicola*, and *C. cornutus*) in Kenya [95], from *C. imicola* and *C. coarctatus* in Zimbabwe [96], and from *C. brevitarsis* in Australia [97]. Clearly, much work remains to identify the

primary BEFV vectors and to determine the relative importance of *Culicoides* in BEFV epidemiology.

The Rift Valley fever virus (RVFV) RNA has also been detected in *Culicoides* spp. midges during RVF epizootics, and the role of biting midges remains to be determined [56].

Shuni virus is limited to Africa (Nigeria and South Africa) and affects mainly ruminants (e.g., sheep and cattle) and equids. *Culicoides* species have been incriminated as *Shuni virus* vectors [56].

Other viruses are also known to be identified/transmitted by *Culicoides* spp. to human and animals, such as the *Vesicular stomatitis virus*, *Buritirana virus*, *Utinga virus*, and the *Curionopolis virus*.

5.2. Protozoa

Leishmaniases

The *Leishmania* genus (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) are protozoan parasites that cause a spectrum of diseases called leishmaniases in their vertebrate hosts, including humans [98]. In early *Leishmania* transmission research, *Culicoides* were suspected of being *Leishmania donovani* vectors in India [99]. However, since this date and until the beginning of the 20th century, no data were published concerning the potential involvement of biting midges with regard to *Leishmania* transmission [100]. Between 2004 and 2010, some researchers reported the natural infection of *Culicoides* biting midges by *Herpetomonas* and *Sergeia kinetoplastid* protozoa [101, 102]. In 2011, Dougall et al. reported the natural infection of *Forcypomyia* day-feeding midges with *Leishmania* using both a molecular approach and microscopic detection of promastigotes in their guts [103]. Seblova experimentally demonstrated that the population of *C. nubeculosus* tested did not support the

development of *L. infantum* and *L. major*, and hence, the probability of this species acting as a *Leishmania* species vector in infecting humans was negligible [104]. Recently, Slama and colleagues identified for the first time *Leishmania infantum* in wild-caught *Culicoides imicola* and *C. circumscriptus* by a PCR approach [100].

5.3. Helminths

Parasitic helminths belong to *Nemathelminthes* (nematodes) and *Platyhelminthes* (flatworms), the latter being subdivided into *Cestoda* (tapeworms) and *Trematoda* (flukes). The *Nematoda* phylum is the only one known to be affected by blood-sucking *Ceratopogonidae*. This phylum contains the filarial round worms of the *Filarioidea* superfamily, which parasitize humans as well as animals [105]. Human filariae are vector-borne and are responsible for various diseases [106].

Mansonella perstans filariasis

Mansonella perstans is a filarial nematode endemic in tropical portions of Africa (from Senegal to Uganda and south to Zimbabwe) and South America [107]. Simonsen et al, 2011, reported that *M. perstans* infection prevalences are often very high in endemic areas, even among children, and infections have been reported from 33 countries in Sub-Saharan Africa. *M. perstans* is one of the most prevalent parasites of man in tropical Africa. In spite of this, very few studies have been carried out regarding its epidemiology and the associated health consequences in endemic populations, and no simple and effective drug therapy for treatment and control of this infection has been identified [107]. Additionally, *M. perstans* infections can be classified as one of the most neglected among the Neglected Tropical Diseases because *M. perstans* infections prevail in poor rural populations and because it has not been linked with a clear and distinct clinical picture [107]. *M. perstans* has been reported in many parts of Africa [108]. In Nigeria, *M. perstans* is transmitted by tiny biting midges of the *Culicoides*

genus [109], such as *C. grahami*, *C. austeni* and *C. fulvithorax* were identified as *M. perstans* vector species [108]. In Cameroon, intensive studies regarding *M. perstans* vectors have been carried out, especially on *C. grahamii*, *C. austeni* and *C. inornatipennis* (summarized in Simonsen et al., 2011). In Brazil, *M. perstans* was identified in the Amazon Federal Territory of Venezuela, but it did not significantly affect humans in this area [105]. Little pathology has been directly attributable to *M. perstans* infections, such as transient angioedema, abdominal pain, and pericarditis [110-112].

Mansonella ozzardi also causes a neglected disease that is ignored by the health public and that is also considered to be a slightly pathogenic disease [113]. Few non-specific clinical signs have been reported by patients, such as pruritus, headache and joint pain. However, ocular lesions including keratitis and fever have been reported [113, 114]. *Culicoides furens* is known as the main *M. ozzardi* vector. In Haiti, *C. barbosai* was also implicated in *M. ozzardi* transmission [113].

Other filaria, such as *Onchocerca gutturosa*, *Onchocerca cervicalis*, *Icosiella neglecta*, *Mansonella marmosetae*, *Mansonella gracile*, and *Mansonella caudispina*, have been suspected to be transmitted from *Culicoides* spp. to animals.

5.4. Bacteria

The members of the *Culicoides* genus are among the most abundant of the hematophagous insects and are important vectors of pathogens that affect humans and livestock. Little is known about their association with bacteria, including the components of their immune system. Some studies have been carried out to identify the bacteria in *Culicoides*. Lewis et al, tested eight United Kingdom species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) midges for the presence of five genera of endosymbiotic bacteria, including *Cardinium* (Bacteroidales: Bacteroidaceae), *Wolbachia* and *Rickettsia*

(*Rickettsiales*), *Spiroplasma* (*Entomoplasmatales: Spiroplasmataceae*), and *Arsenophonus* (*Enterobacteriales: Enterobacteriaceae*); however, only *Candidatus Cardinium hertigii* group C was detected in *Culicoides pulicaris* and *Culicoides punctatus* [115].

The reports to date indicate the presence of a phylogenetically distinct clade of *Cardinium* symbionts in some *Culicoides* spp. [116]. However, there has been no study regarding *Culicoides* species, and the role of *Cardinium* in midge biology remains unclear.

No published research has determined if *Cardinium* influences the ability of *Culicoides* biting midges to transmit viruses. Additionally, no bacteria have been documented to be transmitted by Ceratopogonidae.

6. The relationships between hosts and vectors

Hematophagous insects represent biting pests to vertebrates and potential pathogen vectors among vertebrate populations [117]. Their evolution has been shown to occur in three main ecological trends: ectoparasitism, parasitism in nests and shelters, and parasitism that involves making repeated biting attacks on hosts outside of shelters [117]. Viennet et al reported that *Culicoides* feeding success on a given host depends on host availability, host defensive reactions and host preferences [118]. The host preference can be defined as the tendency of the insect to select a class of vertebrates or a given host species [119]. The host choice is the result of a trade-off between the advantages gained by finding an optimal host and the risk of death before feeding, which thus determines the opportunistic or specialized feeding behaviors [120]. Lassen and colleagues indicated that *Culicoides* species are opportunistic in their choice of host blood meal with a preference for cattle when present [121]. Moreover, hematophagous *Culicoides* choice host feeding can be determined by the number of antenna with sensilla coeloconica [122]. For example, Braverman et al showed that the antennal ratio values in probable bird feeders were significantly higher than those in

probable mammal feeders [122]. Additionally, the host choice is a critical determinant of the intensity at which pathogens are transmitted [118].

7. *Conclusions and perspectives*

In conclusion, the presented review provides an update on the approaches for *Culicoides* identification, including protein profiling by MALDI-TOF, genetics and morphology. The MALDI-TOF approach has the potential to become the method of choice for a centralized, robust and high-throughput midge population screening in connection with the surveillance of eventually emerging midge-transmitted agents. Additionally, the arboviruses, filarial worms and protozoan reported here are transmitted to animals and human by hematophagous *Ceratopogonidae* that belong to the *Culicoides* genus. However, data on *Culicoides* in Africa and particularly in Senegal are very few and are outdated. A laborious study of *Culicoides* species using new entomological approaches that involve both molecular sequencing and protein profiling MALDI-TOF are needed for a review of the *Culicoides* genus classification from Africa. *Culicoides* constitute an increasing threat to animal and human health because of their effectiveness in rapid pathogen transmission in a population. This is illustrated by the example of Schmallenberg disease.

466 **Acknowledgements.**

467 We thank Gilles Chauvancy and Florence Fenollar of the Unité de Recherche sur les
468 Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095,
469 Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Aix-Marseille Université, Marseille,
470 France and Dakar, Senegal for their help.

471

Legends, figures and table

Figure 1. The life cycle of *Ceratopogonidae* of the *Culicoides* genus.

Four larval stage (I, II, III, and IV); st = stage. The nymphs have a short lifespan.

Figure 2. *Culicoides kingi* from Senegal

Figure 3. A consensus phylogenetic tree showing *Culicoides* species based on COI sequences. The sequences were aligned using CLUSTALW and phylogenetic inferences that were obtained using Bayesian phylogenetic analysis with TOPALi 2.5 software (Biomathematics and Statistics Scotland, Edinburgh, UK) within the integrated MrBayes application, with the use of GTR+ Γ substitution models. The numbers at the nodes are percentages of bootstrap values that were obtained by repeating the analysis from 100 replicates to generate a majority consensus tree. The final set includes 471 base pairs. The scale bar represents a 5% nucleotide sequence divergence.

Figure 4. A MALDI-TOF VITEK® mass spectra in a 2–14 kDa range of 10 field-caught *Culicoides* insects from Senegal (including *C. kingi*, *C. imicola*, *C. nevillei*, *C. moreli*, *C. magnus*, *C. wansoni*, *C. fulvithorax*, *C. enderleini*, *C. milnei* and *C. oxystoma*).

Figure 5: A vector virus system representation

Figure 6: The geographic distribution of *Culicoides* that are Bluetongue Virus (BTV) vectors.

C. imicola is one of the most important BTV vectors in Africa, Asia and Europe (indicated in green). Other important *Culicoides* vectors are listed next to the continent in which they are involved in transmission.

Table 1. The pathogens transmitted or associated with *Ceratopogonidae*

BTV: Bluetongue virus; EHDV: Epizootic hemorrhagic disease virus; SBV: Schmallenberg virus; OROV: Oropouche virus; WNV: West Nile virus; AHSV: African horse sickness virus; EEV: Equine encephalosis virus; AKAV: Akabane Virus; BEFV: Bovine ephemeral fever virus; RVF: Rift Valley fever virus; VSV: Vesicular stomatitis virus; CURV: Curionopolis virus.

1. Ander M, *et al.* (2013) Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Med. Vet. Entomol.* 27, 323-331
2. Borkent A, ed (2007) *The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera)*, In Marquardt WC, Black WC, Freier JE, Hagedorn H, Moore C, Hemingway J, Higgs S, James J, Kondratieff B, *Biology of Disease Vectors*, 2nd ed. Elsevier Academic, Burlington, VT
3. WHO, ed (1984) *Chemical method for the control of arthropod vectors and pests of public health importance*. Geneva
4. Meiswinkel R, *et al.* (1994) Vectors: *Culicoides* spp. See Ref 36, 68-89
5. Mellor PS, *et al.* (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* 45, 307-340
6. Rawlings P (1997) 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
7. Meiswinkel R, *et al.* (2008) The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe--the entomological perspective. *Prev Vet Med.* 87, 55-63
8. Pagès N, *et al.* (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.
9. Mathieu B, *et al.* (2011) Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: application to *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus. *Vet Parasitol.* 1826, 297-306
10. Matsumoto Y, *et al.* (2009) Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Med. Vet. Entomol.* 23, 47-55
11. Wenk CE, *et al.* (2012) Molecular characterization of Swiss Ceratopogonidae (Diptera) and evaluation of real-time PCR assays for the identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Parasitol.* 184, 258-266
12. Kaufmann C, *et al.* (2012) Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasitology.* 139, 248-258
13. Kaufmann C, *et al.* (2012) Spatio-temporal occurrence of *Culicoides* biting midges in the climatic regions of Switzerland, along with large scale species identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Parasit Vectors.* 5, 246
14. Kaufmann C, *et al.* (2011) Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges.. *Med Vet Entomol.* 25, 32-38
15. Sambou, M., *et al.* (2014) Comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for the identification of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. *J Clin Microbiol*
16. Steinmann IC, *et al.* (2013) Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for the identification of ceratopogonid and culicid larvae. *Parasitology.* 140, 318-327
17. Borkent A (2004) Chapter 10. The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera), In W. C. Marquardt (ed.), *Biology of Disease Vectors*, 2nd ed. Elsevier Academic, Burlington, VT
18. Walzer BGW (2009) Les insectes du genre *Culicoides* vecteurs de maladies animales. In *Medecine*, 220p, École Nationale Veterinaire d'ALFORT
19. Périé P, *et al.* (2005) Les *Culicoides*, diptères hématophages vecteurs de la fièvre catarrhale du mouton. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 158, 213-224
20. Mathieu B, *et al.* (2012) Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasit Vectors.* 5, 137

21. Boorman JPT, and Hagan DV (2007) A Name List of World Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) http://campus.belmont.edu/cienews/culicoides_worldlist.html.
22. Dujardin JP, *et al.* (2002) Geographic versus interspecific differentiation of sandflies: a landmark data analysis. *Bull. Entomol. Res.* 93, 87-90
23. Dujardin JP, *et al.* (2007) The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae. *Infect. Genet. Evol.* 7, 161-167
24. Camara M, *et al.* (2006) Genetic and morphometric evidence for isolation of a tsetse (Diptera: Glossinidae) population (Loos islands, Guinea). *J. Med. Entomol.* 43, 853-860
25. Henni LH, *et al.* (2014) Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides) in France. *Infect Genet Evol.* 21, 110–117
26. Glick JI (1990) Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol.* 27, 85-195
27. Cornet M, and Brunhes J (1994) Révision des espèces de Culicoides apparentées à *C. schultzei* (Enderlein, 1908) dans la région afrotropicale (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomol Fr.* 99, 149-164
28. Dallas JF, *et al.* (2003) Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Med Vet Entomol.* 17, 379-387
29. Perrin A, *et al.* (2006) Phylogenetic analysis of Culicoides species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med Vet Entomol.* 20, 219-228
30. Gomulski LM, *et al.* (2006) Phylogeny of the subgenus Culicoides and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol.* 20, 229-238
31. Baldet T, *et al.* (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.
32. Kiehl E, *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.* 105, 331-336
33. Nolan DV, *et al.* (2008) Incursion and range expansion in the bluetongue vector *Culicoides imicola* in the Mediterranean basin: a phylogeographic analysis. *Med Vet Entomol.* 22, 340-351
34. Nielsen SA, and Kristensen M (2011) Morphological and molecular identification of species of the *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae) in Scandinavia. *Parasitol Res.* 109, 1133-1141
35. Pagès N, and Monteys VSI (2005) Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *J Med Entomol.* 42, 1026-1034
36. Garros C, *et al.* (2010) Suggesting synonymies? Comments on Kiehl *et al.* (2009) "the European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing *ITS-1*, *ITS-2* and *18S*-rDNA?". *Parasitol Res.* 107, 731-734
37. Bakhom MT, *et al.* (2013) First record of *Culicoides oxystoma* Kieffer and diversity of species within the *Schultzei* group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. *PLoS One.* 8, e84316
38. 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., Université Louis Pasteur
39. Mazzeo MF, *et al.* (2008) Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 56, 11071-11076
40. Caprioli G, *et al.* (2010) A preliminary matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight approach for the characterization of Italian lentil varieties. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24, 2843-2848
41. Feltens R, *et al.* (2010) Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *BMC Evol Biol.* 10, 95

42. Perera MR, *et al.* (2005) Identification of aphid species using protein profiling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 117, 243-247
43. Holmes IH, *et al.* (1995) *Family Reoviridae*, in: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A. (Eds.), Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer, Wien, New York, Arch. Virol. Suppl. 10
44. Maan NS, *et al.* (2012) Identification and differentiation of the twenty six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *PLoS ONE*. 7, e32601
45. Maan S, *et al.* (2011) Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg Infect Dis*. 17, 886-889
46. Purse BV, *et al.* (2006) Spatial and temporal distribution of bluetongue and its *Culicoides* vectors in Bulgaria. *Med. Vet. Entomol*. 20, 335-344.
47. Veronesi E, *et al.* (2013) Measurement of the Infection and Dissemination of Bluetongue Virus in *Culicoides* Biting Midges Using a Semi-Quantitative RT-PCR Assay and Isolation of Infectious Virus. *PLoS One*. 8, e70800.
48. Cêtre-Sossah C, *et al.* (2014) Epizootic haemorrhagic disease virus in Reunion Island: Evidence for the circulation of a new serotype and associated risk factors. *Vet Microbiol*. 170 383-390
49. Allison AB, *et al.* (2010) Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in the USA containing RNA segments derived from both exotic (EHDV-6) and endemic (EHDV-2) serotypes. *J. Gen. Virol*. 91, 430-439
50. Sun F, *et al.* (2014) Molecular typing of epizootic hemorrhagic disease virus serotypes by one-step multiplex RT-PCR. *J Wildl Dis*. 50, 639-644
51. Kedmi M, *et al.* (2011) Comparison of the epidemiology of epizootic haemorrhagic disease and bluetongue viruses in dairy cattle in Israel. *Vet J*. 190, 77-83
52. Pybus MJ, *et al.* (2014) Epizootic Hemorrhagic Disease in Alberta, Canada. *J Wildl Dis*. 50, 720-722
53. Yadin H, *et al.* (2008) Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel. *Vet Rec*. 162, 53-56.
54. Temizel EM, *et al.* (2009) Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerg Infect Dis*. 15, 317-319
55. Savini G, *et al.* (2011) Epizootic haemorrhagic disease. *Res Vet Sci*. 91, 1-17
56. Hubálek Z, *et al.* (2014) Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res*. 89, 201-275
57. Schmidtman ET, *et al.* (2011) Distribution of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Nebraska, South Dakota, and North Dakota: clarifying the epidemiology of bluetongue disease in the northern Great Plains region of the United States. *J Med Entomol*. 48, 634-643
58. Hoffmann B, *et al.* (2012) Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis*. 18, 469-472
59. Veldhuis AM, *et al.* (2014) Schmallenberg virus epidemic: impact on milk production, reproductive performance and mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany. *Prev Vet Med*. 116, 412-422
60. Roberts HC, *et al.* (2014) Response to an emerging vector-borne disease: Surveillance and preparedness for Schmallenberg virus *Preventive Veterinary Medicine*. 116, 341-349
61. Goller KV, *et al.* (2012) Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg Infect Dis*. 18, 1644-1646
62. Garigliany MM, *et al.* (2012) Schmallenberg virus in calf born at term with porencephaly, Belgium. *Emerg Infect Dis*. 18, 1005-1006
63. Barlow A, *et al.* (2013) Serological confirmation of SBV infection in wild British deer. *Vet Rec*. 172, 429-429
64. Jack C, *et al.* (2012) Evidence of seroconversion to SBV in camelids. *Vet Rec*. 170, 603-603

65. Méroc E, *et al.* (2014) Distribution of Schmallenberg virus and seroprevalence in belgian sheep and goats. *Transbound Emerg Dis.* 61, 425-431
66. Ponsart C, *et al.* (2014) Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen. *Vet Res.* 45, 37
67. Wernike K, *et al.* (2014) Schmallenberg virus-two years of experiences. *Prev Vet Med.* 116, 423-434
68. De Regge N, *et al.* (2012) Detection of Schmallenberg virus in different Culicoides spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 59, 471-475
69. Elbers AR, *et al.* (2013) Schmallenberg virus in Culicoides spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis.* 19, 106-109
70. Rasmussen LD, *et al.* (2012) Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis.* 18, 1204-1206
71. Kirkeby C, and Dominiak P (2014) Culicoides (Avaritia) gornostaevae Mirzaeva, 1984 (Diptera: Ceratopogonidae)--a possible vector species of the Obsoletus group new to the European fauna. *Parasit. Vectors.* 7, 445
72. Bastos Mde S, *et al.* (2012) Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 86, 732-735.
73. Vasconcelos HB, *et al.* (2009) Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol.* 44, 129-133
74. Bernardes-Terzian AC, *et al.* (2009) Sporadic oropouche virus infection, acre, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 15, 348-350.
75. Pinheiro FP, *et al.* (1981) Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by Culicoides paraensis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 172-176
76. Hoch AL, *et al.* (1990) Host-seeking behavior and seasonal abundance of Culicoides paraensis (Diptera: Ceratopogonidae) in Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.* 6, 110-114
77. Azevedo RS, *et al.* (2007) Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 13, 912-915
78. Calisher CH, and Gould EA (2003) Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res.* 59, 1-19
79. Krisztalovics K, *et al.* (2008) West Nile virus infections in Hungary. *Euro. Surveill.* 13, pii: 19030
80. Monath T, *et al.* (1983) Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab. Invest.* 48, 399-410
81. King NJ, *et al.* (2007) Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol Cell Biol.* 85, 33-42
82. Asnis DS, *et al.* (2001) The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999-2000): from Flushing, New York, to beyond its borders. *Ann N Y Acad Sci.* 951, 161-171.
83. Hayes EB, *et al.* (2005) Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1167-1173
84. Murray KO, *et al.* (2008) Clinical investigation of hospitalized human cases of West Nile virus infection in Houston, Texas, 2002-2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 167-174
85. Murray KO, *et al.* (2010) West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res.* 41, 67
86. Turell MJ, *et al.* (2000) Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop. Med. Hyg.* 62, 413-414
87. Hutcheson HJ, *et al.* (2005) Experimental transmission of West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus) by Carios capensis ticks from North America. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 293-295
88. Naugle DE, *et al.* (2004) West Nile virus: pending crisis for greater sage-grouse. *Ecology Letters.* 7, 704-713
89. Sabio IJ, *et al.* (2006) Detection of West Nile virus RNA in pools of three species of ceratopogonids (Diptera: Ceratopogonidae) collected in Louisiana. *J Med Entomol.* 43, 1020-1022
90. Maclachlan NJ, and Guthrie AJ (2010) Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet Res.* 41, 35
91. Mellor PS, and Hamblin C (2004) African horse sickness. *Vet Res.* 35, 445-466.

708 92. Mildenberg Z, *et al.* (2009) Equine encephalosis virus in Israel. *Transboundary and Emerging*
709 *Diseases*. 56, 291

710 93. Oura CA, *et al.* (2012) Equine encephalosis virus: evidence for circulation beyond southern
711 Africa. *Epidemiol Infect.* 140, 1982-19826

712 94. Jennings DM, and Mellor PS (1989) Culicoides: biological vectors of Akabane virus. *Vet.*
713 *Microbiol.* 21, 125-131

714 95. Davies FG, and Walker AR (1974) The isolation of ephemeral fever virus from cattle and
715 Culicoides midges in Kenya. *Vet. Rec.* 95, 63-64

716 96. Blackburn NK, *et al.* (1985) Viruses isolated from Culicoides (Dipt.: Cerat.) caught at the
717 Veterinary Research Farm, Mazowe, Zimbabwe. *J. Entomol. Soc. S. Afr.* 48, 331-336

718 97. Cybinski DH, and Muller MJ (1990) Isolation of arboviruses from cattle and insects at two
719 sentinel sites in Queensland, Australia, 1979–1985. *Aust. J. Zool.* 38, 25-32

720 98. Dostálová A, and Volf P (2012) Leishmania development in sand flies: parasite-vector
721 interactions overview. *Parasit Vectors.* 5, 276

722 99. Christophers SRHE, and Barraud PJ (1925) Culicoides and kala-azar in Assam. *Indian J Med*
723 *Res.* 13, 175-176

724 100. Slama D, *et al.* (2014) First detection of Leishmania infantum (Kinetoplastida:
725 Trypanosomatidae) in Culicoides spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit Vectors.* 7, 51

726 101. Svobodová M, *et al.* (2007) Sergeia podlipaevi gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae,
727 Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 57,
728 423-432

729 102. Zídková L, *et al.* (2010) Herpetomonas trimorpha sp. nov. (Trypanosomatidae,
730 Kinetoplastida), a parasite of the biting midge Culicoides truncorum (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J*
731 *Syst Evol Microbiol.* 60, 2236-2246

732 103. Dougall AM, *et al.* (2011) Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as
733 potential vectors of Leishmania in Australia. *Int J Parasitol.* 41, 571-579

734 104. Seblova V, *et al.* (2012) Development of Leishmania parasites in Culicoides nubeculosus
735 (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *J Med Entomol.* 49,
736 967-970

737 105. Tang TH, *et al.* (2010) Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species
738 Onchocerca volvulus, Mansonella ozzardi and Mansonella perstans in the Amazon Region. *Mem Inst*
739 *Oswaldo Cruz.* 105, 823-828

740 106. Morales-Hojas R (2009) Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on
741 groups of medical and veterinary importance, and its relevance for epidemiology. *infect Genet Evol.*
742 9, 748-759

743 107. Simonsen PE, *et al.* (2011) Mansonella perstans filariasis in Africa. *Acta Tropica* 120S, S109–
744 S120

745 108. Agbolade OM, *et al.* (2006) Biting of anthropophilic Culicoides fulvithorax (Diptera:
746 Ceratopogonidae), a vector of Mansonella perstans in Nigeria. *Korean J Parasitol.* 44, 67-72

747 109. Uttah EC, *et al.* (2011) Endemic mansonellosis in Emohua local government area, Nigeria:
748 human parasitaemia and Culicoides biting patterns. *J Vector Borne Dis.* 48, 41-45

749 110. Fux CA, *et al.* (2006) Mansonella perstans causing symptomatic hypereosinophilia in a
750 missionary family. *Travel Med Infect Dis.* 4, 275–80.

751 111. Asio SM, *et al.* (2009) Mansonella perstans filariasis in Uganda: patterns of microfilaraemia
752 and clinical manifestations in two endemic communities. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103, 266–73.

753 112. Cohen JM, *et al.* (2008) Ocular manifestations in mansonelliasis. *Arq Bras Oftalmol.* 71, 167–
754 71.

755 113. Raccurt CP, *et al.* (2014) Mansonelliasis, a neglected parasitic disease in Haiti. *Mem Inst*
756 *Oswaldo Cruz.* 109, 709-711

757 114. Vianna LM, *et al.* (2012) Mansonella ozzardi corneal lesions in the Amazon: a cross-sectional
758 study. *BMJ Open.* 2, e001266

115. Lewis SE, *et al.* (2014) First detection of endosymbiotic bacteria in biting midges *Culicoides* *pulicaris* and *Culicoides punctatus*, important Palaearctic vectors of bluetongue virus. *Med Vet Entomol.* [Epub ahead of print], 1-4
116. Nakamura Y, *et al.* (2009) Prevalence of *Cardinium* bacteria in planthoppers and spider mites and taxonomic revision of "*Candidatus Cardinium hertigii*" based on detection of a new *Cardinium* group from biting midges. *Appl Environ Microbiol.* 75, 6757-6763
117. Balashov YS (1999) Evolution of haematophagy in insects and ticks. *Entomological Review.* 79, 943-954
118. Viennet E, *et al.* (2013) Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges: implications for transmission of orbiviruses. *Med Vet Entomol.* 27, 255-266
119. Balenghien T, *et al.* (2011) Theoretical formulation for mosquito host-feeding patterns: application to a West Nile virus focus of southern France. *J Med Entomol.* 48, 1076-1090
120. Lyimo IN, and Ferguson HM (2009) Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 25, 189-196
121. Lassen SB, *et al.* (2011) Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitol Res.* 108, 823-829.
122. Braverman Y, *et al.* (2012) Host Preference of *Culicoides* spp from Israel Based on Sensory Organs and Morphometry (Diptera: Ceratopogonidae). *Entomologia generalis.* 34, 97-110
- Lafri I, *et al.* (2016) Identification of Algerian Field-Caught Phlebotomine Sand Fly Vectors by MALDI-TOF MS.

Table 1: Pathogens transmitted or associated with *Ceratopogonidae*

<i>Pathogens</i>	<i>Hosts</i>	<i>Culicoides Vectors</i>	<i>References</i>
BTV	Wild and domestic ruminants	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i> groups, <i>C. nubeculosus</i> , <i>C. sonorensis</i> , <i>C. bolitinos</i> , <i>C. fulvus</i> , <i>C. brevitarsis</i> , <i>C. insignis</i> , <i>C. pusillus</i> .	Mellor and Wittmann, 2002; Torina et al., 2004 ; Purse et al., 2006 ; Carpenter et al., 2006; Carpenter et al. 2009; Veronesi et al., 2013 ; Meiswinkel et al., 1989; Mellor, 1990.
EHDV	deer, sheep cattle	<i>C. sonorensis</i> , <i>C. variipennis</i> , <i>Obsoletus</i> complex, <i>C. dewulfi</i> , <i>C. chiopterus</i> , <i>Pulicaris</i> complex, <i>C. kingi</i> , <i>C. schultzei</i> , <i>C. brevitarsis</i>	Walton 2004; Schmidtmann et al, 2011; Jones et al 1977; Foster et al, 1977 ; Hubálek et al, 2014 ; Savini et al, 2011 ; Hubálek et al, 2014.
SBV	cattle, sheep and goats	<i>Culicoides scoticus</i> , <i>C. obsoletus</i> s.s., <i>C. dewulfi</i> , <i>C. chiopterus</i>	De Regge et al., 2012; Elbers et al.; 2013; Rasmussen et al., 2012
OROV	humans	<i>C. paraensis</i> ,	Mellor et al, 2000; Borkent and Spinelli, 2007
WNV	Birds, Human, equids	<i>C. sonorensis</i> , <i>C. arboricola</i> , <i>C. biguttatus</i> , <i>C. stellife</i>	Naugle et al, 2004; Sabio et al, 2005
AHSV	horses, zebras, dogs, elephants, camels, sheep, goats	<i>C. imicola</i> , <i>C. sonorensis</i> , <i>C. obsoletus</i>	Mellor and Hamblin, 2004
EEV	equids	<i>C. imicola</i> and <i>C. bolitinos</i>	Hubálek et al., 2014
AKAV	buffalo, cattle, camel, sheep, goats, horses	<i>C. brevitarsis</i> , <i>C. oxystoma</i> , <i>C. milnei</i>	Jennings and Mellor, 1989
BEFV	cattle, buffalo	<i>C. kingi</i> , <i>C. nivosus</i> , <i>C. bedfordi</i> , <i>C. imicola</i> , <i>C. cornutus</i> , <i>C. imicola</i> and <i>C. coarctatus</i> , <i>C. brevitarsis</i>	Mellor et al., 2000; St George and Standfast, 1988; Davies and Walker, 1974; Blackburn et al., 1985; Cybinski and Muller, 1990
RVF		<i>Culicoides</i> spp	Hubálek et al., 2014
<i>Shuni virus</i>	sheep, cattle, equids	<i>Culicoides</i> spp	Hubálek et al., 2014
VSV	Horses, cattle, pigs, humans	<i>C. sonorensis</i> , <i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
CURV	mice	<i>C. spp.</i>	Travassos et al, 1998

<i>Burritirana virus</i>	Unknown	<i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Utinga virus</i>	Sloths	<i>Ceratopogonidae</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Leishmaniasis</i>	humans	<i>C. imicola, C. circumscriptus</i>	Slama et al, 2014
<i>Mansonella pesrtans filariasis</i>	humans	<i>C. grahami, C. austeni and C. fulvithorax</i>	Uttah, 1998; Agbolade et al, 2006
<i>Mansonella ozzardi</i>	humans	<i>C. furens, C. barbosai</i>	Raccurt et al, 2014
<i>Dipetalonema caudispina</i>	Monkeys (Cebidae)	<i>C. hollensis</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Dipetalonema gracile</i>	Monkeys (Cebidae, Callithricidae)	<i>C. hollensis</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Dipetalonema marnosetae</i>	Monkeys (Cebidae, Callithricidae)	<i>C. furens</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Dipetalonema ozzardi</i>	Humans, other primates	<i>C. lahillei, C. paraensis, L. bequaerti, C. furens C. phlebotomus</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Icosiella neglecta</i>	Frogs	<i>F. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Onchocerca cervicalis</i>	Equidae	<i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007
<i>Onchocerca gutturosa</i>	Bovidae	<i>C. spp.</i>	Borkent and Spinelli, 2007

Annexe 2 : Article New *Mansonella* spp

New *Mansonella* species in *Culicoides enderleini* from Dielmo, Senegal.

Masse Sambou¹, Florence Fenollar¹, Cheikh Sokhna¹, Didier Raoult¹ and Oleg Mediannikov¹.



**New *Mansonella* species in *Culicoides enderleini* from
Dielmo, Senegal.**

Journal:	<i>Emerging Infectious Diseases</i>
Manuscript ID:	EID-15-1208
Manuscript Type:	Letter
Date Submitted by the Author:	18-Jul-2015
Complete List of Authors:	Sambou, Masse; Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France and Dakar, Senegal, fenollar, florence; Université Aix-Marseille,, Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) Sokhna, Cheikh; IRD, UMR 198 Raoult, Didier; Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, URMITE - UMR CNRS 6236-IRD 198- Centre National de Référence Mediannikov, Oleg; Mediterranean University, CNRS-IRD UMR6236-198
Keywords:	Mansonella, Culicoides, Senegal



Editor-in-Chief
Emerging Infectious Diseases
Dakar, July 14, 2015

Dear Editor,

Please consider enclosed letters entitled "*New **Mansonella** species in **Culicoides** **enderleini** from Dielmo, Senegal*" by M. Saubou and colleagues for the publication in the Emerging Infectious Diseases. We think that this brief report could find place in your journal.

All authors have read and approved this version which is not under consideration elsewhere. No competing financial interests exist.

Any correspondence can be sent to:

Docteur Oleg Mediannikov
URMITE CNRS-IRD UMR 6236 - Faculté de Médecine
27, Boulevard Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 05, FRANCE
Tel.: +33634991473
Fax: +33491387772
E-mail: oleguss1@gmail.com

Sincerely,

Oleg Mediannikov

1 **New *Mansonella* species in *Culicoides enderleini* from Dielmo, Senegal.**

2 Masse Sanbou¹, Florence Fenollar¹, Cheikh Sokhna¹, Didier Raoult¹ and Oleg Mediamukov¹.

3 Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS

4 7278, IRD 198, Inserm 1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Aix-

5 Marseille Université, Marseille, France and Dakar, Senegal[†]

6

7 **Running title:** New *Mansonella* species from Senegal.

8

9

10 **Address for correspondence:**

11 Dr. Oleg MEDANNIKOV Institut de Recherche pour le Développement, URMITE

12 UMR CNRS7278 IRD198 INSERM1091, Centre IRD Hann B.P. 1386, Dakar, Sénégal. Tel:

13 +221338493580;

14 mob: +221707025852 ; e-mail: oleguss1@gmail.com

15

16 **Word count:** 770

17 **Abstract:**

18 The mansonelliasis is a neglected filariasis transmitted by *Culicoides* spp. and widely
19 distributed in sub-Saharan Africa and South America. The aim of the present study was to
20 identify the vector of *Mansonella perstans* in Senegal where mansonelliasis is very frequent. A
21 total of 650 morphologically identified *Culicoides* from Sine Saloum region were tested by
22 qPCRs; one designed to amplify all representatives of the *Mansonella* genus and another
23 specific for *M. perstans*. We found that two *C. edentini* were positive for *Mansonella* spp
24 but negative for *M. perstans*. Sequences analysis of these samples based on the filarial 5S
25 gene and ITS1 sequence revealed that identified filarial share respectively an 87% and 85%
26 similarity with *M. ozardi* for both sequences. These results suggest the presence of a new
27 species of *Mansonella* with yet unknown pathogenicity in *C. edentini* in Senegal. No *M*
28 *perstans* were identified in the study.

29

30

31 **Keys Words:** *Mansonella* – *Culicoides* – Senegal

32 To the Editor,

33 Species of the diverse onchocercid genus *Mansonella* Faust, 1929 are distributed
34 worldwide. Their host range comprises a large variety of primates, carnivores, shrews,
35 tupiids and ungulates, as well as humans in tropical Africa and South America (1). Their sites
36 of predilection are subcutaneous tissues and intramuscular fascia. Unsheathed microfilariae,
37 present in the blood or dermis, are transmitted by *Ceratopogonidae* and *Simuliidae* dipterans
38 (2). For *Mansonella perstans* alone, a total of 33 countries in Sub-Saharan Africa with a total
39 population of circa 580 million live in endemic zones. It is thought that about 114 million
40 individuals are infected with *M. perstans* up to date, corresponding to a prevalence of
41 approximately 20% in endemic countries (3). To date, 3 species of the genus *Mansonella* have
42 been identified from *Homo sapiens*. Infective *M. perstans*, *M. streptocerca* and *M. ozzardi*
43 larvae are transmitted to humans through the bite of *Culicoides* midges (*Diptera*:
44 *Ceratopogonidae*). *M. streptocerca* is found in Africa, *M. perstans* occurs in both Africa and
45 South America, and *M. ozzardi* occurs only in the Americas: in Mexico, South America and
46 the Caribbean (4). Other species of the genus *Mansonella* have been found in species from
47 *Gorilla*, *Cervus*, *Pan*, *Ursus*, *Petaurista*, *Saguinus*, *Saimiri*, *Ateles*, *Alouatta*, *Cebus*,
48 *Hydrochoeris*, *Leontopithecus* and *Tupaia* genera worldwide, and *Culicoides* species are
49 implicated in their transmission (1). The polymerase chain reaction (PCR) is a sensitive
50 technique for detecting parasite DNA. Sensitive and specific PCR assays have been developed
51 for the diagnosis of human mansonelliasis and the presence of *Mansonella* spp. in vectors (5,
52 6, 7, 8).

53 The purpose of the present study was to identify the *M. perstans* vector in Senegal.
54 *Culicoides* samples were collected in the village of Dielmo (Kaolack region/Senegal) and its
55 surroundings where, since 2010, a non-malarial fever identification program is under way (9).

3

A total of 650 morphologically identified *Culicoides* (including 210 *C. enderleini*, 82 *C. imicola*, 182 *C. schultzei*, 108 *C. wansoni* and 68 *Culticoides* spp.) were initially tested by qPCR designed to amplify all representatives of the *Mansonella* genus as well as *Loa loa* (8). Screening found that two *C. enderleini* from the village of Souron were positive for *Mansonella* spp. However, qPCR specific for *M. persiana* that is endemic to Senegal (8) was negative for both specimens. In order to identify the filaria from these two biting midges we decided to amplify and sequence internal transcribed spacer I (ITS1) and the 5S gene. The ribosomal ITS1 sequence and the 5S gene are specific for the identification and characterization of filarial species. The primers used in the assay are based on conserved coding regions of the 5S rDNA (10) and ITS1 (6).

Sequence analysis of these samples based on the 5S gene revealed an 87% similarity between the obtained sequences and *M. ozzardii* (JF412305) deposited in GenBank. The result of this analysis does not match any *Mansonella* species whose sequences were deposited in GenBank. Sequenced ITS1 revealed the closest identity of 85% of with the sequences obtained and *M. ozzardii* (EU272180) deposited in GenBank. Constructed phylogenetic trees based on each of the sequenced genes (Figures 1 and 2) indicate that the identified filaria does not correspond to any *Mansonella* species deposited in GenBank.

The results of the sequencing of the internal transcribed spacer and the 5S gene gave similar results: (i) the amplified 5S gene and ITS1 sequence showed no identity with any species of *Mansonella* whose sequences are deposited in Genbank and, (ii) the topology of both trees undoubtedly place the identified filaria in the *Mansonella* genus. We also compared our sequence obtained from the 5S gene with the sequence of *M. streptocerca* published by Fischer et al. (1998) that is not available in Genbank and found that the sequences are different. Thorough a literature study also showed that, with the exception of *M. persiana*, no

80 other *Mansonella* species have been reported in Senegal. Moreover, all African *Mansonella*
81 were reported from apes (i.e. species of the *Gorilla* and *Pan* genera) that do not inhabit this
82 region of Senegal (1) and, consequently, filaria identified in two *C. enderleini* may not be one
83 of the *Mansonella* genus species previously reported in Africa.

84 The sequences of the ITS1 and 5S genes of the microfilaria were deposited in Genbank
85 under the following numbers: KR080175 for 5S and KR080176 for ITS1.

86 In conclusion, using qPCR aimed at detecting *Mansonella* spp., we found a previously
87 unknown (or, at least genetically uncharacterized) filaria in *C. enderleini*. Phylogenetic
88 analyses of obtained sequences allowed us to suppose that it may be a novel species of the
89 genus *Mansonella*. The host of this identified *Mansonella* sp. is as yet unknown.

90

91 **Acknowledgments**

92 We thank the French Ministry of Foreign Affairs, the Institute of Research for
93 Development, Agence National de Recherche grant 2010 (MALEMAF), and the IHU
94 Méditerranée Infection for their financial support.

95 References

- 96 1. Bain O, Mutaftchiev Y, Junker K, Guerrero R, Martin C, Lefoulon E, et al. Review of
 97 the genus *Mansonella* Faust, 1929 sensu lato (*Nematoda: Onchocercidae*), with descriptions
 98 of a new subgenus and a new subspecies. *Zootaxa*. 2015; 3918: 151-93.
- 99 2. Anderson RC. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and
 100 Transmission. Second Edition. CAB International, Oxfordshire, 2002. P. 672.
- 101 3. Simonsen PE, Onapa AW, Asio SM. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta*
 102 *Trop*. 2011; 120: S109-20.
- 103 4. Bain O, 2002. Evolutionary relationships among Filarial Nematodes In: T.R. Klei,
 104 T.V. Rajan Eds. *World Class Parasites: The Filaria*. Kluwer Academic Publishers, Boston
 105 Dordrecht London; 2002. p. 21-30.
- 106 5. Fischer P, Buttner DW, Barnuitiga J, Williams SA. Detection of the filarial parasite
 107 *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain reaction-based assay.
 108 *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58: 816-20.
- 109 6. Jiménez M, González LM, Carranza C, Bailo B, Pérez-Ayala A, Muro A, et al.
 110 Detection and discrimination of *Loa loa*, *Mansonella perstans* and *Wuchereria bancrofti* by
 111 PCR-RFLP and nested-PCR of ribosomal DNA ITS1 region. *Exp Parasitol*. 2011; 127: 282-6.
- 112 7. Marcos LA, Arróspide N, Recuenco S, Cabezas C, Weil GJ, Fischer PU. Genetic
 113 characterization of atypical *Mansonella* (*Mansonella*) *ozzeri* microfilariae in human blood
 114 samples from northeastern Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 87: 491-4.
- 115 8. Bassene H, Sanbou M, Fenollar F, Clarke S, Djiba S, Mourembou G, et al. High
 116 prevalence of *Mansonella perstans* filariasis in rural Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. in press
 117 2015.

- 118 9. Mediannikov O, Socolovschi C, Edouard S, Fenollar F, Mouffok N, Bassene H, et al
119 Common epidemiology of *Rickettsia felis* infection and malaria, Africa. *Emerg Infect Dis.*
120 2013; 19: 1775-83.
- 121 10. Xie H, Bain O, Williams SA. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites
122 based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite.* 1994; 1: 141-51.

123

124

125

126

Figure and legends

Figure 1: Consensus phylogenetic trees showing the relationships of the studied species of *Onchocercidae* based on 5S sequence comparisons (A) and ITS1 sequence comparisons (B).

GenBank accession numbers are indicated when the sequences originated from Genbank. The sequences were aligned using ClustalW, and phylogenetic inferences were obtained using Bayesian phylogenetic analysis with TOPALi 2.5 software (Biomathematics and Statistics Scotland, Edinburgh, UK) within the integrated MrBayes application using the HKY85 substitution model. Numbers at the nodes are percentages of bootstrap values obtained by repeating the analysis 100 times to generate a majority consensus tree. The final set includes 437 bps. Geographic origin of the filariae is indicated at the end when available.

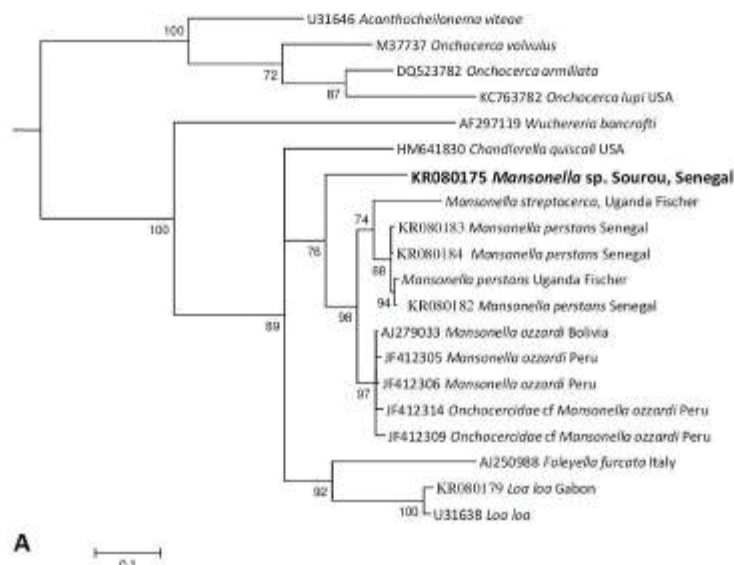
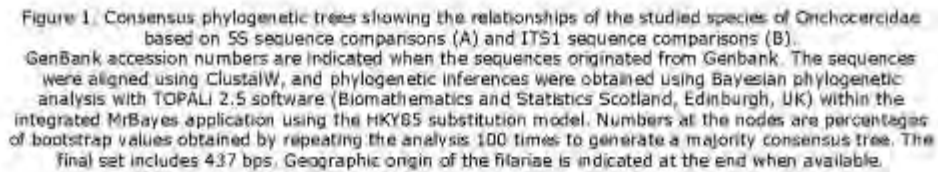


Figure 1: Consensus phylogenetic trees showing the relationships of the studied species of Onchocercidae based on 5S sequence comparisons (A) and ITS1 sequence comparisons (B). GenBank accession numbers are indicated when the sequences originated from Genbank. The sequences were aligned using ClustalW, and phylogenetic inferences were obtained using Bayesian phylogenetic analysis with TOPALI 2.5 software (Biomathematics and Statistics Scotland, Edinburgh, UK) within the integrated MrBayes application using the HKY85 substitution model. Numbers at the nodes are percentages of bootstrap values obtained by repeating the analysis 100 times to generate a majority consensus tree. The final set includes 437 bps. Geographic origin of the filariae is indicated at the end when available.

135x107mm (300 x 300 DPI)



99x50mm (300 x 300 DPI)

Résumé

La lutte anti-vectorielle et la surveillance épidémiologique des vecteurs sont essentielles dans la stratégie de lutte contre les maladies vectorielles. Comprendre l'épidémiologie d'une maladie nécessite une étude poussée de tous les agents impliqués. Les *Culicoides* sont des insectes hématophages vecteurs de plusieurs agents pathogènes vétérinaires et humains. En Afrique, les connaissances sur leur aspect vectoriel, biologique, écologique et taxonomique sont très limitées. La détermination des *Culicoides* jusqu'au niveau de l'espèce est un challenge pour l'étude de ces moucheron hématophages. L'utilisation d'outils d'identification précis, fiables et rapides de ces vecteurs et des pathogènes associés est indispensable. Ainsi dans notre projet nous avons évalué l'utilisation du MALDI-TOF Viteck MS pour l'identification des espèces de *Culicoides* et utilisé la biologie moléculaire pour la détection des pathogènes associés. La technique MALDI-TOF a émergé il y a quelques années. Actuellement elle est utilisée en routine, dans plusieurs laboratoires de microbiologie, pour l'identification des bactéries. Dans la première étude nous avons comparés les résultats des identifications de *Culicoides* par MALDI-TOF à ceux de la biologie moléculaire. Un total de 437 spécimens de *Culicoides* appartenant à 10 espèces capturées sur le terrain a été utilisé pour créer une base de spectres de référence MALDI-TOF Vitek MS. Les profils protéiques de tous les *Culicoides* testés ont révélé plusieurs pics avec des masses moléculaires comprises entre 2 à 20 kDa. Un test aveugle au MALDI-TOF de 76 spécimens de *Culicoides* identifiés morphologiquement et par biologie moléculaire, sont utilisés pour la validation de l'étude. 95 % (72/76) des *Culicoides* ont été correctement identifiés jusqu'au niveau de l'espèce, avec une similarité comprise entre 95 et 99,9 %. Six super spectres : *C. enderleini*, *C. imicola*, *C. magnus*, *C. kingi*, *C. oxystoma* et *C. fulvithorax* sont créés, validés et activés dans la base SARAMAIS™. La deuxième étude consistait à utiliser les outils moléculaires (PCR standard, qPCR et séquençage) pour évaluer la microscopie et détecter la présence de filaires chez les *Culicoides*. Nous avons analysé 297 frottis de sang chez des patients fébriles et non fébriles par qPCR. La prévalence globale de cette analyse est de 14,5% de *M. perstans*. L'analyse des *Culicoides* collectés a été négative pour la détection de *M. perstans*. Mais cette étude a permis d'identifier la présence d'une filaire qui est probablement une nouvelle espèce du genre *Mansonella*. Les résultats de nos travaux trouveront des applications dans l'entomologie médicale et vétérinaire lors des enquêtes entomologiques pour des laboratoires équipés de MALDI-TOF. Ils montrent également que le MALDI-TOF est un outil rapide, fiable, qualitatif et quantitatif pour l'identification des *Culicoides*. Cependant l'implication des *Culicoides* dans la transmission de *Mansonella perstans* au Sénégal est très peu probable. La base de données SARAMIS™ *Culicoides* nouvellement créée pour la faune culicoidienne Sénégalaise est une première en Afrique.

CERATOPOGONIDAE DU GENRE CULICOIDES AU SENEGAL : IDENTIFICATION PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE, PAR MALDI-TOF ET RECHERCHE DE PATHOGENES

Summary

The vector control and epidemiological surveillance are essential in the vectors strategy against vector-borne diseases. Understanding the epidemiology of a disease requires a pushed study including all the involved agents. *Culicoides* are hematophagous vectors of several veterinary and human pathogens. In Africa, there is limited about their knowledge distribution, biological, ecological and taxonomic. The classification of *Culicoides* species level is a challenge for the study of these midges. The use of accurate, reliable and fast identification tools, for these vectors and associated pathogens is essential. Here we evaluate the use of MALDI-TOF MS Viteck for the identification of *Culicoides* species. We used molecular biology and/or MALDI-TOF for the detection of associated pathogens. The MALDI-TOF technique has emerged in the last few years. It is currently used as a routine technique in many laboratories for bacterial identification. In the first study we compared the results of *Culicoides* identification by MALDI-TOF regarding to those of molecular biology. A total of 437 specimens of *Culicoides* belonging to 10 species collected on the ground was used to create a database of MALDI-TOF MS Vitek reference spectra. Protein profiles of all tested *Culicoides* showed several peaks with molecular masses going from 2 to 20 kDa. The proof of concept was validated using MALDI-TOF blind tests on 76 *Culicoides* specimens identified morphologically and by molecular biological. 95% (72/76) of *Culicoides* were correctly identified to the species level with a similarity between 95 and 99.9%. Six SuperSpectra: *C. enderleini*, *C. imicola*, *C. magnus*, *C. kingi*, *C. oxystoma* and *C. fulvithorax* are created, validated and activated in the SARAMAIS™ database. The second study used molecular tools (standard PCR, qPCR and sequencing) to assess microscopy and detect the presence of filarial in *Culicoides*. We analyzed 297 blood smears in febrile and afebrile patients by qPCR. The overall prevalence of this analysis was 14.5% of *M. perstans*. Analysis of collected *Culicoides* was negative for the detection of *M. perstans*. But this study has identified the presence of a filarial which is probably a new species of *Mansonella*. The results of our work will have applications in medical and veterinary entomology, especially the entomological surveys in laboratories equipped for MALDI-TOF. They also show the importance of the MALDI-TOF as a quick, reliable, quantitative and qualitative tool for identifying *Culicoides*. However the involvement of *Culicoides* in the transmission *Mansonella perstans* in Senegal is highly unlikely. The data base SARAMIS™ newly created by the wildlife of the world of *Culicoides* Senegal is a first in Africa.

Discipline : Parasitologie

Mots-clés: *Culicoides* – *Ceratopogonidae* – Identification – Pathogènes – *Mansonella* – MALDI-TOF Vitek MS – Sénégal.
