

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE DOCTORALE

SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2014-2015

Nº d'ordre : 149



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Entomologie

Présentée par : **Moussa FALL**

**Ecologie et lutte contre les *Culicoides* vecteurs de la peste équine
et de la fièvre catarrhale ovine au Sénégal**

Soutenue le 22 Mai 2015 devant le jury composé de :

Président : Bhen Sikina Toguebaye, Professeur, FST/UCAD, Dakar

Rapporteurs : Roch Kounbobr Dabiré, Directeur de Recherche, IRSS/Burkina Faso
Oubri Bassa Gbati, Maître de Conférences Agrégé, EISMV/UCAD
Jeremy Bouyer, Chercheur Entomologiste Medical UMR CMAEE Cirad,
Montpellier, HDR, ISRA/LNERV

Examineurs : Momar Talla Seck, Chargé de Recherche, ISRA/LNERV

Directeur de thèse : Ousmane Faye, Professeur, FST/UCAD, Dakar
Thierry Baldet, Chercheur Entomologiste Medical UMR CMAEE Cirad,
Montpellier

DEDICACES

Je dédie ce travail à mes parents pour leur éducation, encouragement et soutien. Un merci tout particulier à mon super papa qui est un soutien, conseiller et une référence.

Merci aussi à mes frères et sœurs : Massar, Yacine, Mame Bineta, Massamba, Amadou, Alicune, Cheikh Oumar, Abdoulaye, Diéry, Arouna, Adama et Awa pour leur compréhension et leur complicité.

A ma belle famille : mon oncle Doudou Sarr, son épouse Khady Gueye et leurs enfants (Abdoulaye Thiam, Moustapha Ndiaye, Aminata Diop, Oumar, Racky et Maïmouna) qui ont une grande estime en ma personne.

Une dédicace spéciale à mon épouse Ramata Sarr qui m'a toujours encouragé et épaulé pendant les périodes de soudure et de stress. Dedicace spéciale également à mes enfants Cheikh Ahmed Tidiane et Mouhamet qui me redonnent la joie, le bonheur et beaucoup de motivations. Gros bisous les enfants !!

Remerciements

Il m'est particulièrement agréable de remercier:

- Professeur **Ousmane FAYE**, chef du laboratoire d'écologie Vectorielle et Parasitaire, pour avoir dirigé ce travail. Vous m'avez donné du courage et de la force pour continuer des études supérieures. J'ai été marqué par votre disponibilité, votre rigueur scientifique et votre modestie. J'ai eu beaucoup de chance de vous connaître et de faire partie de vos étudiants. Je tiens à vous manifester toute ma reconnaissance et ma profonde considération.

- Docteur **Thierry BALDET**, chercheur au Cirad de Montpellier et Co-directeur des travaux de Thèse. Votre expérience scientifique a été d'un grand apport pour moi. Votre expertise, votre rigueur et votre amour pour le travail bien fait témoignent toute l'importance que vous portez à ces travaux. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et profond respect.

- Docteur **Momar Talla SECK**, chef du Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires de l'institut Sénégalais de Recherches Agricoles de m'avoir accueilli dans le service de Bio-Ecologie et Pathologies Parasitaires. J'ai été profondément marqué par votre rigueur scientifique pour un travail de qualité. Ma reconnaissance est profonde doublée d'un respect sans commune mesure.

- Professeur **Bhen Sikina Toguebaye**, Professeur titulaire de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (FST/UCAD, Dakar), pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, malgré vos multiples charges. Vous me faites ici un grand honneur. Je tiens à vous manifester toute ma reconnaissance et ma profonde considération.

- Docteur **Jérémy BOUYER**, chef de l'équipe vectrice au Cirad, en service au Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires, pour ses encouragements et son aide dans l'analyse des données. Ma reconnaissance est profonde.

- Docteur **Roch Kounbobr Dabiré**, Directeur de Recherche, IRSS/Burkina Faso, d'avoir accepté de juger ce travail et faire partie du jury malgré un emploi du temps surchargé. Je voudrais vous transmettre tous mes remerciements et vous témoigner toute ma gratitude.

- Docteur **Oubri Bassa Gbati**, Maître de Conférences Agrégé à l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar (EISMV UCAD), je ressens tout l'honneur que vous me faites en acceptant malgré vos multiples charges de siéger parmi les membres de ce jury. Veuillez trouver ici mes hommages respectueux.

Je remercie très sincèrement tous les membres du jury d'avoir accepté sans hésitation d'évaluer et de juger ce travail. Vos remarques, suggestions et critiques contribueront à améliorer ce manuscrit. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et mon respect.

- Docteur **Assane Gueye FALL**, chargé de recherche à l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles et encadreur technique des travaux. Je vous admire par votre grande capacité de management qui m'a donné courage et force dans l'aventure dans le monde des *Culicoides*. Je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance et profond respect.

- Docteur **Lassana KONATE**, responsable adjoint du Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire, pour m'avoir encadré depuis le Master. J'ai été marqué par votre disponibilité constante, votre rigueur scientifique et vos qualités humaines. J'ai beaucoup appris avec vous. Je me souviens encore de vos conseils lors de ma première mission de terrain dans l'équipe du LEVP que j'ai fait mon crédo « Moussa, il faut bien travailler et ne pas nous tromper. Si tu nous trompes, tu trompes en fait tout le peuple ». Ma reconnaissance est profonde doublée d'un respect sans commune mesure.

- Docteur **Thomas BALENGHIEN**, chercheur au Cirad, d'avoir pris de son temps pour m'aider dans l'analyse des données malgré ses nombreuses sollicitations. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde considération.

- Docteur **Geoffrey GIMONNEAU**, mes chaleureux remerciements pour vos contributions dans l'analyse des données et l'intérêt que vous avez porté pour ces travaux. Votre dynamisme et votre rigueur scientifique m'ont beaucoup apporté. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de toute ma sympathie.

- Docteur **Claire GARROS**, chercheur au Cirad, pour vos contributions à ce travail. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et un respect immense.

- Docteur **Renaud LANCELOT**, pour vos contributions dans l'analyse des données.

- Maryam Diarra, Mame Thierno Bakhoun, Ange Michel Dusom et Massouka Ndao, de n'avoir ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail. Ce travail est aussi le votre, vous avez été à la hauteur du challenge.

- **Xavier ALENE** et **Ignace RAKOTOARIVONY** qui m'ont initié sur les *Culicoides*. Merci à toute l'équipe Vecteurs du Cirad de m'avoir permis de travailler avec la collection de **Cornet**.

- **Jean-Claude DELECOLLE** pour votre aide immense dans l'identification de *Culicoides*, votre grande disponibilité ainsi que vos encouragements.

Merci à tous ceux qui m'ont soutenu moralement durant cette aventure. Je veux citer entre autres docteurs **Yaya THIONGANE**, ancien chef du Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires de l'ISRA, qui m'a accueilli et toujours encouragé dans mes travaux de recherches ; **Modou Moustapha LO**, **Mbaye MBENGUE**, **Mame Nahé DIOUF**.

Merci à toute l'équipe du Programme Santé Animale du LNERV pour leur collaboration et leur soutien moral. Merci également au personnel de l'administration du LNERV entre autres **Moulaye DIAGNE**, **Bachir NDIAYE**, **Thierno GUEYE**.

Merci à toute l'équipe du Service de Bio-Ecologie et Pathologies Parasitaires : **Saliou NIANG**, Dr **Mamadou Lamine DJIBA**, **Maryam DIARRA**, **Mme TRAORE**, **Idrissa SARR**, père **Iba MALL** qui ont éclairé mes journées de travail par leurs sourires et leur bonne humeur.

Un grand merci aux propriétaires des écuries pour leur collaboration et hospitalité ainsi qu'à leur personnel, particulièrement à **Alé THIAW** (Niague), **Moustapha** (Mbao), le **Vieux DIOP** (Hann), **Mamadou BA** (Pout) et **Doudou BA** (Thiès).

Merci aux Services Administratifs et Financiers du LNERV pour leurs appuis dans la gestion des dossiers urgents ainsi qu'aux chauffeurs : **Issa DIAHAM**, **Ousseynou DIAGNE**, **Lamine CISSE** et **Adama SY**.

Un grand merci à toute ma famille du LEVP particulièrement à **Kaba SYLLA**, qui nous a été retiré très prématurément à notre affection, à Dr **El hadj Amadou NIANG**, Dr **Badara SAMB**, **Youssouph COULIBALY**, **Abdoulaye KONATE**, Dr **Mamadou SY**, **Malick Ndao FAYE**, **Omar NIANG**.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont participés de près ou de loin, par leur soutien moral ou scientifique, à l'élaboration de ce manuscrit.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DES CONNAISSANCES SUR LES <i>CULICOIDES</i>	5
1. Les <i>Culicoides</i>	5
1.1. Position systématique.....	5
1.2. Caractères morphologiques.....	5
1.3. Bio-écologie.....	7
2. Intérêt médical et vétérinaire des <i>Culicoides</i>	9
2.1. Nuisance.....	9
2.2. Rôle vecteur.....	10
2.2.1. La peste équine africaine.....	11
2.2.1.1. Historique et distribution.....	11
2.2.1.2. Pathologie et clinique.....	12
2.2.1.3. Épidémiologie.....	14
2.2.1.4. Diagnostic et surveillance.....	16
2.2.1.5. Impact sanitaire et économique.....	16
2.2.1.6. Prévention et lutte.....	17
2.2.2. La fièvre catarrhale ovine (FCO).....	18
2.2.2.1. Historique et distribution.....	18
2.2.2.2. Pathologie et clinique.....	18
2.2.2.3. Épidémiologie.....	20
2.2.2.4. Diagnostic et surveillance.....	21
2.2.2.5. Impact sanitaire et économique.....	21
2.2.2.6. Prévention et lutte.....	22
DEUXIEME PARTIE : DIVERSITE TAXONOMIQUE, BIO-ECOLOGIE ET CONTROLE DES <i>CULICOIDES</i> VECTEURS DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE.....	23
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	23
1. Contexte	26
2. Rappel des objectifs de la thèse	26
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	28
1. PRESENTATION GENERALE DE LA ZONE D'ETUDE	28
1.1. Localisation.....	28
1.2. Climat et végétation.....	29
1.3. Activités humaines et économiques.....	29
1.4. Agriculture.....	29
1.5. Elevage.....	30

1.6.	Commerce	30
1.7.	Autres	31
2.	Sites d'études	31
3.	Echantillonnage des <i>Culicoides</i>	32
3.1.	Les pièges OVI.....	33
3.1.1.	Echantillonnage de <i>Culicoides</i> dans le suivi de la dynamique saisonnière.....	33
3.1.2.	Echantillonnage de <i>Culicoides</i> pour les tests de sensibilité aux insecticides.....	34
3.1.3.	Evaluation de l'efficacité de l'écran imprégné <i>Zero-fly®</i> sur les <i>Culicoides</i>	35
3.2.	Les pièges à appât animal.....	35
3.2.1.	Identification des vecteurs potentiels de la peste équine africaine.....	36
3.2.2.	Etude du rythme nycthéméral de <i>Culicoides oxystoma</i>	36
3.2.3.	Etude des préférences trophiques et de l'activité nycthémérale des <i>Culicoides</i> vecteurs potentiels de la peste équine africaine et de la fièvre catarrhale ovine	37
3.2.4.	Efficacité d'une formulation insecticide Pour-On <i>Cyperclor Plus®</i> sur les <i>Culicoides</i>	37
4.	Traitement des échantillons récoltés	38
4.1.	Identification des <i>Culicoides</i>	38
4.1.1.	Identification morphologique des <i>Culicoides</i>	38
4.1.2.	Identification moléculaire des <i>Culicoides</i>	40
4.1.2.1.	Identification des <i>Culicoides</i> du groupe <i>Schultzei</i>	40
4.1.2.1.1.	Extraction de l'ADN des <i>Culicoides</i> de chaque morpho-groupe.....	40
4.1.2.1.2.	Choix des marqueurs moléculaires	40
4.1.2.1.3.	Amplification par PCR et séquençage des régions COI et ITS 2.....	40
4.2.	Identification du repas de sang des <i>Culicoides</i>	41
4.2.1.	Analyse des repas de sang par biologie moléculaire.....	41
4.2.2.	Recensement et localisation des hôtes potentiels (par enquête zootechnique) ..	41
4.3.	Test de sensibilité aux matières actives insecticides	42
4.3.1.	Protocole du test de sensibilité aux insecticides.....	43
4.3.2.	Description du dispositif	43
4.3.2.1.	Déroulement du test.....	43
5.	Analyses statistiques.....	45
5.1.	Analyses phylogénétiques et des distances génétiques	45
5.2.	Analyse des données du suivi de la dynamique saisonnière des <i>Culicoides</i>	46
5.3.	Rythme nycthéméral de <i>Culicoides oxystoma</i>	47
5.4.	Etude des préférences trophiques et de l'activité nycthémérale des vecteurs potentiels de la PE et de la FCO.....	47
5.5.	Analyse des repas de sang.....	47
5.6.	Tests de sensibilité aux matières actives insecticides	48

5.7.	Efficacité de l'écran imprégné <i>Zerofly</i> ®.....	48
5.8.	Efficacité du Pour-on <i>Cyperclor Plus</i> ®.....	48
1.	Diversité taxonomique du genre <i>Culicoides</i> au Sénégal	49
1.1.	Résultats	49
1.2.	Discussion	52
2.	Bio-écologie des <i>Culicoides</i> potentiels vecteurs de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine au Sénégal	56
2.1.	Résultats	56
2.1.1.	Diversité des <i>Culicoides</i> et étude du contact <i>Culicoides</i> -Cheval dans cinq sites de la zone des Niayes	56
2.1.2.	Dynamique saisonnière des <i>Culicoides</i> dans cinq sites de la zone des Niayes..	62
2.1.3.	Etude des taux de gorgement des <i>Culicoides</i> dans cinq sites de la zone des Niayes.....	63
2.1.4.	Préférences trophiques estimées par l'analyse de l'origine des repas de sang...	64
2.1.4.1.	Echantillonnage des <i>Culicoides</i>	64
2.1.4.2.	Amplification de l'ADN génomique et identification	64
2.1.4.3.	Corrélation entre les données des enquêtes zootechniques et les repas de sang identifiés.....	65
2.1.5.	Etude du rythme circadien de <i>C. oxystoma</i>	67
2.1.6.	Etude des préférences trophiques et activité nyctémérale des vecteurs potentiels de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine	70
2.2.	Discussion	75
2.2.1.	Diversité des <i>Culicoides</i> et étude du contact <i>Culicoides</i> -Cheval dans la zone des Niayes.....	75
2.2.2.	Suivi de la dynamique saisonnière des <i>Culicoides</i> dans la zone des Niayes	77
2.2.3.	Taux de gorgement des <i>Culicoides</i> dans la zone des Niayes	78
2.2.4.	Préférences trophiques par analyse de l'origine des repas de sang.....	78
2.2.5.	Rythme circadien de <i>C. oxystoma</i>	82
2.2.6.	Préférence trophique et activité nyctémérale des vecteurs potentiels de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine.....	84
3.	Contrôle des <i>Culicoides</i> potentiels vecteurs de la peste équine au Sénégal	88
3.1.	Résultats	88
3.1.1.	Sensibilité des <i>Culicoides</i> à la Deltaméthrine, Permethrine et au Chlorpyrifos	88
3.1.2.	Évaluation de l'efficacité d'une moustiquaire imprégnée sur les <i>Culicoides</i> : le <i>Zerofly</i> ®.....	93
3.1.3.	Évaluation d'un traitement insecticide <i>Pour-on</i> contre les <i>Culicoides</i> : le <i>Cyperclor</i> ®.....	98
3.2.	Discussion	100
	CONCLUSION GÉNÉRALE	114

PERSPECTIVES.....	116
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
Annexes	136
Articles publiés.....	136
Communications orales ou affichées.....	200

Liste des figures

Figure 1 : Caractères morphologiques du genre <i>Culicoides</i> . A) représentation schématique d'une aile de <i>Culicoides</i> et les principaux caractères taxonomiques. B) représentation schématique des pattes de <i>Culicoides</i> avec empodium rudimentaire au niveau de la patte postérieure. C) tête d'une femelle de <i>Culicoides</i> . D) dernier article antennaire d'une femelle de Ceratopogonidae avec présence d'un micron (cliché et dessin: Jean Claud DELECOLLE).	6
Figure 2: Exemples des différents types d'ailes. A) <i>C. quinquelineatus</i> , aile sombre à tâches claires ; B) <i>C. pseudopallidipennis</i> , aile claire à tâches sombres ; C) <i>C. nigeriae</i> , aile sans tâches (cliché : Moussa FALL 2012).	6
Figure 3 : Cycle biologique d'un Ceratopogonidae (D'après J.C. Delecolle)	9
Figure 4 : Jetage observé dans la phase terminale de la forme pulmonaire de la peste équine africaine (Zientara, 2005).	13
Figure 5: Tuméfaction de la tête observée chez un cheval lors d'une suspicion de peste équine africaine (cliché : Pape SECK 2011).	14
Figure 6 : Délimitation des différentes zones écologiques du Sénégal (POUR_ORGANISATION DES NATIONS UNIES, 2007).	28
Figure 7 : Localisation des sites d'étude dans les régions de Dakar et Thiès (Sud de la zone des Niayes au Sénégal) (DIARRA 2013).	32
Figure 8 : Description des pièges OVI utilisés au cours de notre étude (cliché : Michel Ange DUSOM 2011).	33
Figure 9 : Les différentes étapes de la collecte des échantillons : A) pot de collecte avec l'eau savonneuse ; B) séparation des insectes collectés de l'eau savonneuse par tamisage ; C) récupération des échantillons avec une pissette contenant de l'alcool 90p (cliché : Claire GARROS 2011).	34
Figure 10 : Piège OVI adapté pour capturer des <i>Culicoides</i> vivants (cliché : Moussa FALL 2013).	35
Figure 11 : Description du piège à appât cheval utilisé au cours de notre étude (cliché : Michel Ange DUSOM 2011)	36
Figure 12 : Les différentes étapes de l'identification des <i>Culicoides</i> : le pré-tri consiste à séparer les <i>Culicoides</i> des autres insectes et le tri consiste à identifier les <i>Culicoides</i> à l'espèce et dans certains cas fait appel au montage entre lame et lamelle (Xavier ALLENE).	39
Figure 13 : Protocole de test tube OMS adapté aux <i>Culicoides</i> (cliché : Assane Gueye FALL 2013).	43
Figure 14 : Analyse phylogénétique des espèces du groupe Schultzei en utilisant les données de séquences du gène COI.	50
Figure 15 : Variation phénotypique de <i>C. oxystoma</i> au Sénégal. A = forme typique ; B, C, D, E = variants (cliché : Moussa FALL 2012).	51
Figure 16 : Diversité taxonomique du groupe Schultzei au Sénégal. <i>C. kingi</i> (A= forme Kenya ; B= forme Sénégal) ; C) <i>C. nevillei</i> ; D) <i>C. oxystoma</i> et E) <i>C. enderleini</i> (cliché : Moussa FALL 2012).	51
Figure 17 : Diversité des <i>Culicoides</i> capturés par site d'étude et par type de piégeage (OVI : pièges lumineux; Horse : pièges a appât cheval). A : analyse en composante principale (ACP) centrée des logarithmes népériens des pourcentages d'abondances cumulées par espèces, par site et par type de piège (axe1/axe 2). B : analyse intraclasse de l'ACP (axe1/axe 2). C et D : analyse interclasse de l'ACP (axe1/axe 2 et axe 2/axe 3).	60

Figure 18 : Corrélation entre les abondances mensuelles de femelles observées dans le piège lumineux et dans le piège à appât cheval pour les trois principales espèces de <i>Culicoides</i> (<i>C. oxystoma</i> , <i>C. imicola</i> et <i>C. kingi</i>) dans les 5 sites d'étude.	61
Figure 19 : Dynamique des abondances mensuelles de femelles des 3 principales espèces de <i>Culicoides</i> (<i>C. oxystoma</i> , <i>C. imicola</i> et <i>C. kingi</i>) dans le piège à appât cheval en fonction des saisons (SP=saison des pluies ; SSF=saison sèche froide ; SSC= saison sèche chaude) dans les sites d'étude. NB : les données d'abondance ont été transformées en $\log_{10}(n+1)$; le site de Pout n'est pas représenté étant donné les faibles abondances observées.	62
Figure 20 : Comparaison entre l'origine des repas de sang ingérés par les <i>Culicoides</i> et la composition des hôtes vertébrés à différents rayons autour du point de piégeage.....	66
Figure 21 : Corrélation entre les hôtes sélectionnés (origine des repas de sang) par les femelles des principales espèces de <i>Culicoides</i> et les hôtes vertébrés présents à différentes distances du point de piégeage dans chaque site d'étude.....	67
Figure 22 : Rythme circadien de <i>C. oxystoma</i> durant les quatre saisons climatiques (Janvier : saison sèche froide, Avril : saison sèche chaude, Juillet : début saison des pluies, Octobre : fin saison des pluies). Les lignes noires représentent la moyenne du nombre de capture des deux nuits consécutives ($\log_{10}$ scale), et les points gris et noir, la moyenne du nombre des mâles et des femelles respectivement. Les variations journalières de températures (en °C) sont représentées en pointillés rouges et l'humidité (en %) en bleu. Les barres verticales grises représentent le lever et le coucher du soleil.	69
Figure 23 : Abondance brute et corrigée par le poids des hôtes pour les principales espèces de <i>Culicoides</i> (<i>C. oxystoma</i> , <i>C. imicola</i> , <i>C. bolitinos</i> et <i>C. pseudopallidipennis</i>) collectées sur appâts cheval ou mouton.	71
Figure 24 : Activité nyctémérale des femelles de <i>C. oxystoma</i> , <i>C. imicola</i> , <i>C. bolitinos</i> et <i>C. pseudopallidipennis</i> , à savoir le nombre de femelles capturées quel que soit l'hôte en fonction de l'heure de collecte (3h, 6h, 9h, ... , 24h). Les symboles reliés par la ligne noire représentent la moyenne des observations. Les lignes grises verticales symbolisent l'heure de lever et de coucher du soleil.	73
Figure 25 : Activité nyctémérale des femelles de <i>Lasiohelea</i> sp, à savoir le nombre de femelles collectées quel que soit l'hôte en fonction des heures de collecte. Les symboles reliés par la ligne noire représentent la moyenne des observations. Les lignes grises verticales symbolisent l'heure de lever et de coucher du soleil.	74
Figure 26 : Sensibilité de <i>Culicoides imicola</i> à la deltaméthrine (bleu), à la perméthrine (vert) et au chlorpyrifos (rouge).	92
Figure 27 : Sensibilité de <i>Culicoides oxystoma</i> à la deltaméthrine (bleu), à la perméthrine (vert) et au chlorpyrifos (rouge).	92
Figure 28 : Sensibilité de <i>Culicoides kingi</i> à la deltaméthrine (bleu), à la perméthrine (vert) et au chlorpyrifos (rouge).	93
Figure 29 : Effet de la moustiquaire Zerofly® sur les captures de <i>Culicoides</i> (toutes espèces confondues). A) Effet du traitement sur les effectifs capturés. B) Effet du traitement sur les taux de mortalité instantanée. C) Effet du traitement sur les taux de mortalité différée à 24h. Les trois couleurs correspondent aux trois sites entre lesquels les pièges lumineux ont été tournés.	95
Figure 30 : Effet de la moustiquaire Zerofly® sur les captures de <i>Culicoides oxystoma</i> . A) Effet du traitement sur les effectifs capturés. ; B) Effet du traitement sur les taux de mortalité instantanée. C) Effet du traitement sur les taux de mortalité différée à 24h. Les trois couleurs correspondent aux trois sites entre lesquels les pièges lumineux ont été tournés.	96

Figure 31 : Effet du traitement sur les captures de <i>Forcipomyia</i> . A) Effet du traitement sur les effectifs capturés ; B) Effet du traitement sur les taux de mortalité instantanée ; C) Effet du traitement sur les taux de mortalité différée à 24h. Les trois couleurs correspondent aux trois sites entre lesquels les pièges lumineux ont été tournés.	97
Figure 32 : Impact du traitement Cyperclor® sur les Culicidae (toutes espèces confondues). A) Impact du traitement Cyperclor® sur les effectifs capturés de Culicidae. B) Impact du traitement Cyperclor® sur les taux de gorgement des Culicidae. Les deux couleurs correspondent aux deux sites entre lesquels les moutons ont été tournés.	99

Liste des tableaux

Tableau I : Coordonnées géographiques et effectifs/espèce des animaux répertoriés dans les sites d'étude.....	32
Tableau II : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'identification des <i>Culicoides</i> du groupe Schultzei.....	41
Tableau III : Diversité des hôtes vertébrés sur un rayon de 2km autour de chaque site de piégeage.....	42
Tableau IV : Nouvelle liste des espèces de <i>Culicoides</i> au Sénégal. Cette mise à jour est faite à partir des espèces capturées dans un suivi entomologique réalisé de juillet 2011 à juin 2012 dans la zone des Niayes.....	52
Tableau V : Abondance mensuelle maximale cumulée [nombre de <i>Culicoides</i> (pourcentage)] sur l'année par type de piégeage (OVI : pièges lumineux; PA : pièges à appât cheval) et par site.....	57
Tableau VI : Moyenne d'abondance mensuelle maximale cumulée (M) $\pm$ déviation standard (SD) et fréquence (Freq) de femelles des 3 principales espèces de <i>Culicoides</i> collectées sur piège à appât cheval dans les 5 sites d'étude.....	63
Tableau VII : Taux de gorgement global des femelles de <i>Culicoides</i> collectées dans le piège à appât cheval dans les cinq sites d'étude.....	64
Tableau VIII : Abondance et diversité des <i>Culicoides</i> collectés pour l'analyse de l'origine des repas de sang.....	64
Tableau IX : Origine des repas de sang des femelles de <i>Culicoides</i> gorgées collectées sur les différents sites d'étude.....	65
Tableau X : Effectif de <i>Culicoides</i> collectés lors des 6 sessions de captures sur appâts cheval et mouton.....	72
Tableau XI : Évaluation de la sensibilité (DL ₅₀ et DL ₉₀ , exprimées en % de matière active/surface) de <i>Culicoides imicola</i> , <i>Culicoides oxystoma</i> et <i>Culicoides kingi</i> à la deltaméthrine, à la perméthrine et au chlorpyrifos.....	90
Tableau XII : Évaluation de la sensibilité (DL ₅₀ et DL ₉₀ , exprimées en mg/m ² de matière active) de <i>Culicoides imicola</i> , <i>Culicoides oxystoma</i> et <i>Culicoides kingi</i> à la deltaméthrine, à la perméthrine et au chlorpyrifos.....	90
Tableau XIII : Evaluation de la sensibilité (DL ₅₀ , DL ₉₀ et DD, exprimées en % de matière active) de <i>Culicoides nubeculosus</i> (référence, insectarium Cirad France) et de <i>Culicoides imicola</i> (population sauvage Corse, France) aux matières actives de la deltaméthrine, perméthrine et chlorpyrifos d'après Venail et al. 2015.....	91
Tableau XIV : Évaluation de l'efficacité de la moustiquaire Zerofly® sur la densité des Ceratopogonidae à l'aide de pièges OVI.....	93
Tableau XV : Évaluation de l'efficacité de la moustiquaire Zerofly® sur la densité des <i>Culicoides</i> à l'aide de pièges OVI.....	94
Tableau XVI : Diversité et effectifs des Culicidae et Ceratopogonidae capturés sur appât mouton témoin et traité au Cyperclor®.....	98

INTRODUCTION GENERALE

Les insectes représentent la classe la plus importante du règne animal et présentent un régime alimentaire très varié (végétariens, carnivores ou omnivores). Ils jouent un rôle essentiel dans l'équilibre de la nature. Ils interviennent dans la reproduction de nombreuses plantes par transport du pollen d'une fleur à l'autre. Ils recyclent, nettoient et fertilisent la terre par la consommation des plantes mortes (feuilles, bois), de cadavres ou des crottes de grands animaux et les font disparaître dans le sol. Ils servent aussi d'aliments à de nombreux animaux mais aussi à l'homme dans certaines régions du monde. Ils sont aussi utilisés en médecine légale. A côté de ces rôles cruciaux, certains insectes constituent une nuisance depuis toujours pour les populations humaines et animales de par leur nombre et/ou piqure mais aussi par leur rôle vecteur d'agent pathogène. Depuis la découverte de l'implication d'un arthropode dans le cycle parasitaire et de la dissémination d'une maladie (Rodhain & Perez, 1985), la lutte contre ces arthropodes est devenue une voie de lutte contre les maladies à transmission vectorielle. Cette option, consistant à rompre le cycle de la transmission des maladies transmises par les arthropodes, est la lutte anti-vectorielle. La lutte contre les arthropodes fait appel à différentes méthodes (mécaniques, écologiques, chimiques et biologiques). Le principe des méthodes mécaniques est soit de capturer et détruire les arthropodes vecteurs, soit de s'opposer au contact hôte/vecteur. Les méthodes écologiques font appel à l'aménagement de l'environnement. Les méthodes chimiques font intervenir de très nombreux produits qui peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Ces substances sont très variées de par leur mode d'action et leur modalité d'utilisation dans les programmes sanitaires. Ce sont soient des répulsifs, des attractifs, des larvicides, des adulticides, des synergistes ou des chimio-stérilisants. La plupart sont des produits agissants par contact ou par ingestion.

Les premières applications du dichloro diphenyl trichloroéthane (DDT) contre les poux, les mouches et les moustiques avaient suscité beaucoup d'espoirs dans la lutte contre ces vecteurs. Toutefois, l'apparition des phénomènes de résistance, les effets secondaires de ces substances sur la faune non-cible et l'environnement liés à leur rémanence et leur manque de spécificité, entraînerent une limitation des conditions d'utilisation et de l'efficacité des programmes de lutte anti-vectorielle à l'aide d'insecticides chimiques. Ainsi, si à l'origine, le but recherché était l'éradication complète des espèces vectrices ou nuisantes, le nouvel objectif vise désormais à contrôler les populations vectrices sauf exception pour une

population isolée. Le contrôle vise à réduire la densité des populations vectrices de façon à les maintenir au dessous du seuil nécessaire à la transmission et/ou à réduire l'âge moyen de la population qui est donc dangereuse épidémiologiquement (seules les femelles âgées étant aptes à transmettre). De nombreuses actions de prophylaxie ont été entreprises contre les maladies à transmission vectorielle. Cette voie a permis de maîtriser ou réduire significativement l'impact de nombreuses maladies endémiques en Afrique comme l'onchocercose, la trypanosomiase humaine et dans une moindre mesure le paludisme. A côté des méthodes mécaniques, écologiques et chimiques, il y a les méthodes biologiques et génétiques. La méthode biologique repose sur l'utilisation des ennemis naturels des arthropodes que l'on cherche à réduire. Elle fait appel à des prédateurs naturels ou des agents pathogènes. Quant à la méthode génétique, elle est définie par l'OMS en 1964 comme « l'emploi de toutes conditions et méthodes de traitement susceptibles de réduire le potentiel reproductif des formes nuisibles par une altération ou un remplacement du matériel héréditaire » (Rodhain & Perez, 1985). L'utilisation d'insectes génétiquement modifiés est par exemple d'actualité pour lutter contre la dengue au Brésil et en Malaisie avec des lâchers de mâles moustiques génétiquement modifiés d'*Aedes aegypti* dans la nature (Perrin, 2011; Casana, 2012). Cette technique se révèle prometteuse avec une progéniture de longévité réduite c'est à dire les larves n'atteignent pas l'âge adulte.

La peste équine, objet de cette étude, est un exemple de maladie endémique à transmission vectorielle. Le virus de la peste équine transmis par des femelles de certaines espèces de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) entraîne une maladie redoutable pour le cheptel équin (Coetzer & Guthrie, 2004) avec des taux de mortalité pouvant atteindre 90% (Mellor *et al.*, 2000). La peste équine partage les mêmes vecteurs avec la fièvre catarrhale ovine, qui affecte essentiellement les ruminants.

Au Sénégal, les chevaux sont élevés dans les systèmes agricoles ruraux à faible niveau d'intrants dans les zones nord et centre du pays. L'agriculture repose essentiellement sur le cheval. Dans certaines villes comme Rufisque, Mbour et Richard Toll, le moyen de transport le plus utilisé par les populations pour effectuer leurs déplacements est la calèche tractée par un cheval. Ces véhicules à traction animale représentent une source de revenu importante et un moyen de lutte contre la pauvreté. Les charrettes équines participent également au transport des intrants agricoles (engrais, produits phytosanitaires, semences) et des produits agricoles (récoltes, produits animaux). L'importance économique et sociale du cheval au Sénégal avait conduit les pouvoirs publics à créer le programme de développement de la filière équine (PRODEFE) avec l'instauration d'une politique d'importation d'étalons

performants et de construction de haras en vue de l'amélioration génétique du cheptel équin. Ainsi, dans la zone sylvopastorale, un important programme d'amélioration génétique a été conduit de 1948 à nos jours avec le pur sang anglais. La production de poulains demi-sang anglais est devenue une spéculation agricole rentable dans la zone d'implantation du centre de recherche zootechnique de Dahra. La vente d'un poulain procure beaucoup plus au paysan que l'agriculture soumise aux aléas climatiques et aux caprices du cours des matières premières. Cependant, la peste équine qui sévit de façon endémique constitue une contrainte majeure pour l'essor de la filière équine, en particulier pour le développement agricole, le transport et les sports équestres.

La peste équine est endémique au Sénégal avec parfois des poussées épizootiques entraînant des pertes économiques très importantes. La dernière épizootie de peste équine a causé la mort de 1 169 chevaux avec un coût total estimé à 900 millions de FCFA (Akakpo *et al.*, 2011). Le diagnostic et le sérotypage réalisés par les laboratoires de Pirbright (Royaume-Uni) sur ce foyer a révélé la circulation d'un nouveau type de virus (sérotipe 2) (Diouf *et al.*, 2013). Il s'agissait donc d'un nouvel événement épizootique au sein d'une situation endémique. Depuis, un vaccin polyvalent immunisant contre les neuf sérotypes du virus de la peste équine est utilisé. La vaccination est limitée par l'utilisation de vaccins vivants atténués dont les inconvénients sont inhérents à l'utilisation de souche vaccinale vivante mais aussi par les effets tératogènes qui empêchent leur utilisation sur des femelles en gestation. A cela s'ajoute les faibles taux de couverture vaccinale des chevaux au Sénégal qui étaient en 2007 de 33,8% (Diouf *et al.*, 2013).

Comme toutes les maladies à transmission vectorielle, le contrôle des vecteurs constitue une voie prometteuse pour la lutte contre les maladies transmises par les *Culicoides*. En région Afro-tropicale, *Culicoides imicola* (Kieffer) et *Culicoides bolitinos* (Meiswinkel) sont les vecteurs connus du virus de la peste équine en Afrique du Sud (Venter *et al.*, 2000). Au Sénégal, il n'existe pas d'étude sur la peste équine en relation avec le vecteur et il serait imprudent d'étendre le profil vectoriel de l'Afrique du Sud au Sénégal. La seule donnée disponible sur les vecteurs du virus de la peste équine en Afrique de l'Ouest reste les travaux de Rawlings *et al.* (1998) en Gambie. La lutte contre les *Culicoides* est très limitée par le manque de connaissances et de disponibilité opérationnelle de méthodes efficaces en condition de terrain (Carpenter, Mellor, *et al.*, 2008). Au Sénégal, les seules données disponibles sur les *Culicoides* n'ont qu'un caractère taxonomique et la dernière étude date des années 90. Ainsi, se pose des questions, notamment, sur l'identité des potentiels vecteurs,

leurs biologies et écologies mais aussi quelle méthode de lutte serait la plus efficace contre ces populations de *Culicoides*.

Ce document comprend deux parties. La première partie regroupe une synthèse bibliographique des connaissances sur les *Culicoides* et la présentation générale de la zone d'étude. La deuxième partie traite des travaux de thèse proprement dit, à savoir les aspects taxonomiques, bioécologiques et de contrôle des vecteurs potentiels du virus de la peste équine africaine. Une discussion générale et une conclusion générale sont proposées à partir des résultats obtenus, et des perspectives sont dégagées à l'issue de ces travaux.

Ce travail de thèse a bénéficié du soutien financier de l'Union Européenne, à travers le projet EDENext et catalogué par le Comité directeur EDENext sous EDENext 359 (<http://www.edenext.eu/>).

PREMIERE PARTIE : REVUE DES CONNAISSANCES SUR LES *CULICOIDES*

1. Les *Culicoides*

Les *Culicoides* sont de petits moucheron hémaphages. La première description d'un *Culicoides* a été publiée par le révérend William Derham en 1713 en Angleterre (Reye & Lee, 1963; Mellor *et al.*, 2000). Le genre *Culicoides* a quant à lui été formellement décrit par Latreille en 1809 avec comme espèce type *Culicoides punctatus* (Meigen). En région Afro-tropicale, *Culicoides schultzei* (Enderlein) et *Culicoides herero* (Enderlein) sont les deux premières espèces décrites en Namibie par l'entomologiste allemand Günther Enderlein en 1908 (Mathieu, 2011).

1.1. Position systématique

Le genre *Culicoides* appartient au règne Animal, à la série des Invertébrés, à l'embranchement des Arthropodes, à la classe des Insectes, à l'ordre des Diptères, au sous-ordre des Nématocères, à la famille des Cératopogonidés, à la sous-famille des Cératopogoninés et à la tribue des Culicoidini. Il renferme plus de 1 300 espèces valides (Borkent, 2014) dont les femelles sont hémaphages.

1.2. Caractères morphologiques

Le genre *Culicoides* est caractérisé au niveau alaire par la présence de deux cellules radiales subégales (sauf dans le sous-genre *Trithoeoides*) (Figure 1 A). La costa n'atteint jamais le tiers postérieur de l'aile. Une nervure transverse r-m est toujours présente et la nervure médiane (M2) est pédonculée. Au niveau des pattes postérieures, l'empodium, porté par le dernier segment du tarse, est rudimentaire (Kremer *et al.*, 1987) (Figure 1 B). Les antennes sont longues, filiformes et constituées de 15 articles : scape + pédicelle + 8 articles courts + 5 articles longs chez la femelle et scape + pédicelle + 10 articles courts + 3 articles longs chez le mâle (Figure 1 C). Le quinzième article antennaire de *Culicoides* est dépourvu de micron (figure 1 D).

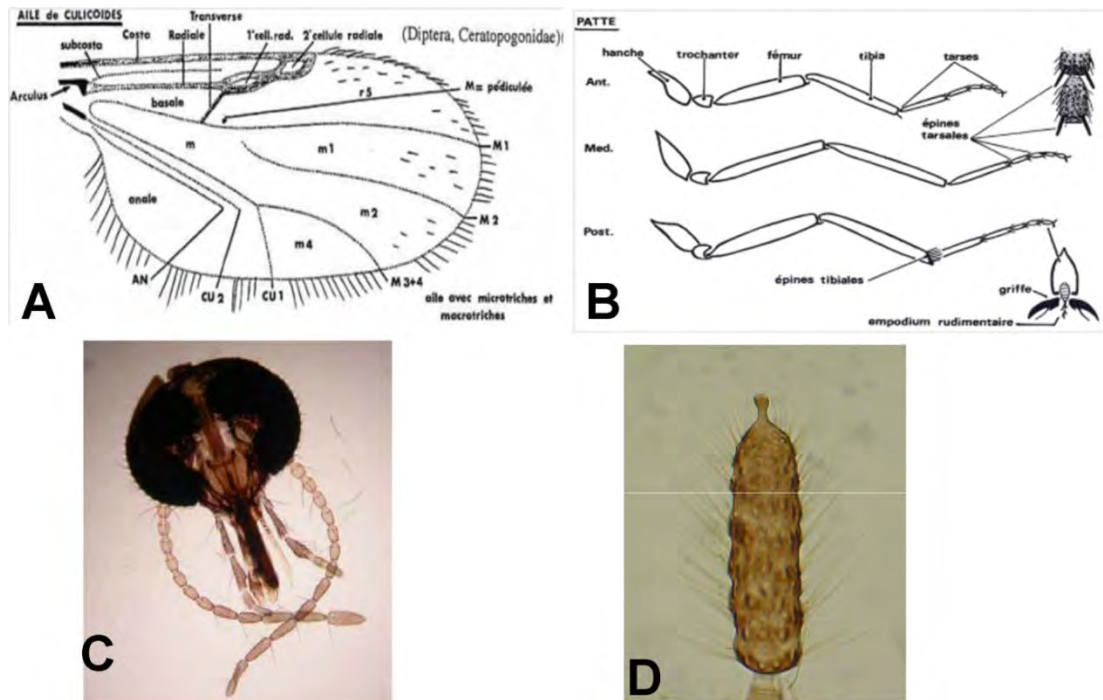


Figure 1 : Caractères morphologiques du genre *Culicoides*. A) représentation schématique d'une aile de *Culicoides* et les principaux caractères taxonomiques. B) représentation schématique des pattes de *Culicoides* avec empodium rudimentaire au niveau de la patte postérieure. C) tête d'une femelle de *Culicoides*. D) dernier article antennaire d'une femelle de Ceratopogonidae avec présence d'un micron (cliché et dessin: Jean Claud DELECOLLE).

L'identification des espèces du genre *Culicoides* repose en premier lieu sur le dessin de l'aile (Figure 2). La forme et la disposition (voire l'absence) des taches alaires apportent des informations majeures sur l'identification de l'espèce. Les yeux soudés ou séparés peuvent être nus ou pubescents. Les antennes, notamment le rapport antennaire (11^{ème} article/ 10^{ème} article) et l'indice antennaire (les articles longs versus les articles courts) mais aussi les sensilles coëloconiques (nombre et disposition) et autres sensilles antennaires (forme, taille, présence ou absence) sont très importants aussi pour l'identification de l'espèce. Les palpes fournissent également des informations importantes notamment avec le rapport du troisième article sur les articles I + II, mais aussi la forme de la fossette sensorielle, sa taille et sa profondeur (Cornet, 1974). Le thorax, observé à l'état frais sans alcool renferme des ornements qui sont caractéristiques d'espèce. Les derniers segments abdominaux portent les structures génitales mâles et femelles qui sont très caractéristiques d'une espèce.

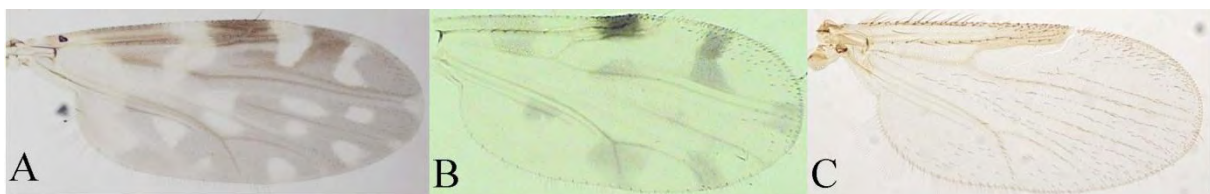


Figure 2: Exemples des différents types d'ailes. A) *C. quinquelineatus*, aile sombre à taches claires ; B) *C. pseudopallidipennis*, aile claire à taches sombres ; C) *C. nigeriae*, aile sans taches (cliché : Moussa FALL 2012).

1.3. Bio-écologie

Les *Culicoides* adultes vivent généralement dans des endroits humides. Les mâles se nourrissent de sucres de végétaux tout au long de leur vie (Goetghebuer, 1952) et fréquentent préférentiellement le sommet des arbres (Rieb, 1982). Les sucres végétaux sont l'unique source trophique des mâles. Les femelles sont hématophages mais peuvent également se nourrir de jus sucré. Elles prennent un repas sanguin tous les 3 à 5 jours, période nécessaire pour compléter leur cycle trophogonique (Holmes & Birley, 1987; Braverman, 1988). Cependant, certaines espèces comme *Culicoides circumscriptus* (Kieffer) et *Culicoides belkini* (Wirth et Arnaud) sont autogènes et ne nécessitent pas de repas sanguin pour la première ponte. Ces repas sanguins sont nécessaires pour la maturation des œufs. A la suite d'une prise de repas sanguin, les femelles se reposent pour la maturation des œufs. La ponte a lieu, dans des conditions optimales de température (environ 28 °C), 2 jours après le repas (Balenghien & Delécolle, 2009). Le nombre d'œufs pondus varie entre 30 à 450. L'œuf de *Culicoides* mesure entre 350 et 500 µm de longueur et entre 65 et 80 µm de largeur. Les œufs sont déposés sur un substrat humide lors de la ponte. Les gîtes larvaires peuvent être saumâtres ou dulcicoles, multiples et très variés. Les larves sont trouvées aux bords des mares, des étangs, dans des trous d'arbres, des fruits en décomposition, des tourbières, des excréments d'animaux, dans des trous de crabe ou des creux de rocher riches en matière organique. De l'œuf éclot une larve dans les 2 à 8 jours suivant la ponte sauf exception (Balenghien & Delécolle, 2009). La larve passe par quatre stades après trois mues (Figure 3). La vie larvaire peut durer deux semaines (pays tropicaux) à plus de sept mois (pays tempérés où l'hibernation a lieu sous cette forme) (Rodhain & Perez, 1985; Balenghien & Delécolle, 2009). Les larves sont mobiles et peuvent nager librement dans le milieu aqueux ou s'enfouir dans les premiers centimètres du substrat. Elles se nourrissent de débris organiques divers et/ou sont prédatrices de nématodes, bactéries, protozoaires, voire même de leurs propres congénères (cannibalisme) (Hill, 1947; Megahed, 1956; Chaker, 1983). La larve de stade IV devient une nymphe qui reste quasi immobile et munie de cornes respiratoires. La nymphe est localisée à la surface du milieu dans lequel le développement larvaire s'est déroulé et à partir de laquelle émerge l'imago mâle ou femelle. L'émergence de l'imago a lieu au bout de 2 à 10 jours. Les *Culicoides* adultes peuvent vivre jusqu'à 90 jours en condition de laboratoire (Nevill, 1971; Boorman, 1991). Cette survie dépend étroitement de la température et est estimée optimale à des température comprise entre 18°C et 38°C pour *C. imicola* en condition de terrain (Ortega *et al.*, 1998). L'accouplement a lieu en vol et les femelles stockent les

spermatophores des mâles dans le ou les spermathèque(s). Il y a peu d'informations sur le comportement d'accouplement des *Culicoides* (Campbell & Kettle, 1979; Zimmer *et al.*, 2008). Campbell et Kettle (1979) ont décrit le comportement d'accouplement de *Culicoides brevitarsis* (Kieffer), indiquant que des essaims de mâles et femelles se forment au dessus de courtes touffes d'herbe ou à proximité des bovins (< 10 m). Le comportement reproducteur dans des essaims a été bien décrit pour de nombreuses espèces de diptères (Downes, 1969). L'accouplement s'effectue dans des essaims de nombreux mâles qui se forment autour de sites spécifiques au crépuscule et durent environ 20 minutes. Les femelles se rapprochent généralement de l'essaim à la rencontre d'un mâle pour la copulation. Une fois fécondée, les femelles partent en quête de leur premier repas sanguin nécessaire à la maturation des œufs. Les adultes des espèces d'intérêt vétérinaire se rencontrent principalement aux environs immédiats des exploitations de bétail, essentiellement à proximité de substrats humides ou d'eaux stagnantes (Zimmer *et al.*, 2008) et sont sensibles à la sécheresse. Ils fréquentent ainsi la face inférieure des feuilles ou des herbes situées dans les zones ombragées (Zimmer *et al.*, 2008). La dispersion de ces moucheron se fait pour la plupart par vol actif et peut atteindre jusqu'à 3 km du gîte d'émergence (Lillie *et al.*, 1985). Ces déplacements sont principalement effectués pour la recherche de l'hôte pour prendre un repas sanguin. Cependant, sous l'action du vent et des courants d'air chaud, les *Culicoides* peuvent être dispersés sur de très grandes distances. Ces déplacements passifs peuvent s'étendre de 1 à 700 km pour des vents allant de 10 à 40 km/h et des températures situées entre 12°C et 35°C (Sellers *et al.*, 1977, 1978; Sellers *et al.*, 1979; Gibbs & Greiner, 1994). Ce transport passif sous l'effet du vent serait à l'origine des épizooties de la fièvre catarrhale ovine (FCO) au Portugal en 1956, Chypre en 1977 et de la peste équine africaine (PEA) au Portugal en 1965-1966 et au Cap-Vert en 1943. Ces infestations se seraient produites via la diffusion de *Culicoides* infectées d'origine africaine (Sellers *et al.*, 1977, 1978; Sellers & Mellor, 1993).

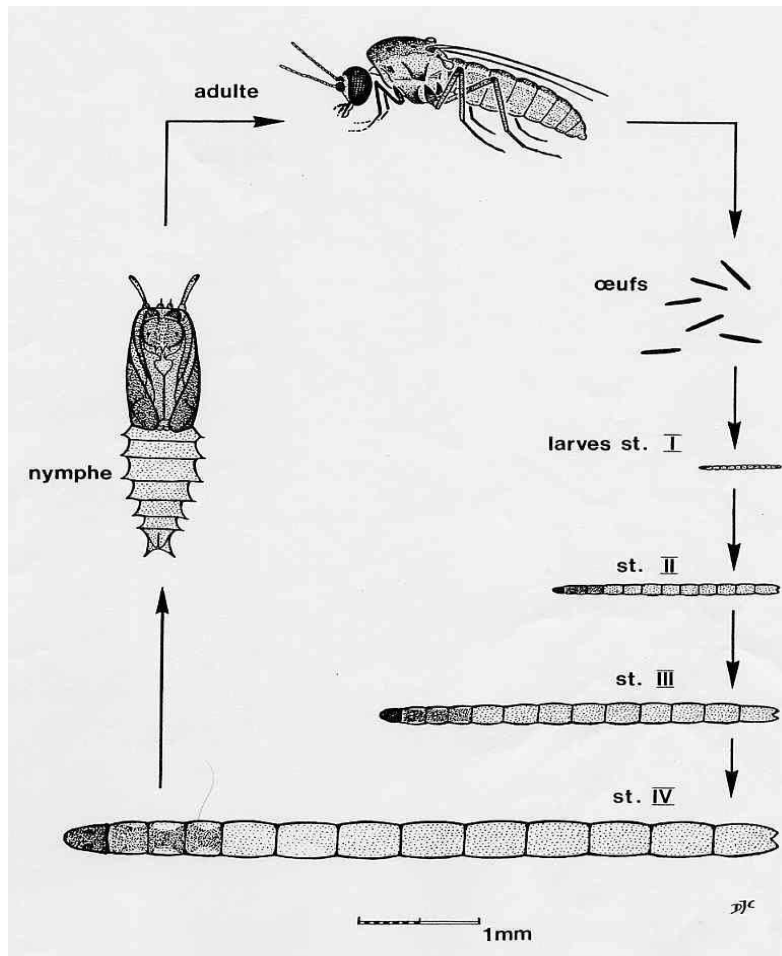


Figure 3 : Cycle biologique d'un Ceratopogonidae (D'après J.C. Delecolle)

2. Intérêt médical et vétérinaire des *Culicoides*

Outre leur nuisance, les *Culicoides* transmettent un grand nombre de pathogènes à l'homme ainsi qu'aux animaux domestiques et sauvages.

2.1. Nuisance

Les *Culicoides* sont particulièrement connus pour leur nuisance liée à leur hématothérapie et surtout à la piqûre douloureuse et prurigineuse qu'ils provoquent. Chez l'homme, ils peuvent constituer une gêne pour les campeurs, pêcheurs, chasseurs, et d'autres activités nécessitant de passer du temps dehors tôt le matin ou tard le soir, voir même pendant la journée sous un ciel nuageux ou lorsque les vents sont calmes. En zone de forte densité de *Culicoides*, ils entravent l'essor du tourisme et des activités agricoles (Duval, 1978; Duval *et al.*, 1978; Auriault, 1979; Agbolade *et al.*, 2006). Chez les animaux, cette nuisance est à l'origine de la dermatite estivale des chevaux (Mellor & McCaig, 1974; Kleider & Lees 1984 ; Anderson *et al.*, 1991). Les piqûres de ces moucherons peuvent conduire à des infections secondaires assez graves

chez l'homme pouvant constituer un problème médical (Hase, 1934). Des éruptions cutanées dues à des piqûres de *Culicoides* sur des humains ont été décrites par Wongsathuaythong et al. (1977) à Bangkok en Thaïlande. A côté de cette nuisance, les *Culicoides* sont également responsables de nombreuses affections.

2.2. Rôle vecteur

Les *Culicoides* interviennent dans la transmission de filaires, de protozoaires mais surtout de virus mortels chez les animaux. En santé publique, certaines espèces de *Culicoides* transmettent des filaires considérées comme bénignes pour l'homme telles que *Mansonella perstans* en Afrique et en Amérique tropicale et *M. streptocerca* en Afrique tropicale (Golvan, 1983; Simonsen et al., 2010). En santé animale, les *Culicoides* sont vecteurs d'*Onchocerca cervicalis* et *O. guttarosa*, deux filaires à distribution mondiale provoquant des pathologies discrètes chez les chevaux et les bovins respectivement (Linley, 1985). La principale implication des *Culicoides* dans la transmission des protozoaires concerne la transmission d'hémosporidies aux oiseaux (Mathieu, 2011).

Du côté des virus, plus de 50 arbovirus ont été isolés à partir de *Culicoides* capturés sur le terrain, la plupart appartenant aux familles des Bunyaviridae (20 virus), Reoviridae (19 virus), et Rhabdoviridae (11 virus) (Mellor et al., 2000). Parmi les virus transmis par les *Culicoides*, deux *Orbivirus* (Reoviridae) sont particulièrement dévastateurs sur le cheptel : le virus de la peste équine africaine (PEA) et le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) qui affectent respectivement les équidés et les ruminants (Mellor et al., 2000). Le virus Oropouche (Bunyaviridae, genre *Orthobunyavirus*) est le seul virus transmis à l'homme. C'est une encéphalite virale endémique en Amérique centrale et en Amérique du Sud et transmise par *Culicoides paraensis* (Goeldi). Les premières épidémies connues ont eu lieu au Brésil entre 1961 et 1978 (Mellor, 2000), et depuis un demi-siècle, 500 000 cas ont été comptabilisés aux Amériques (Azevedo et al., 2007). A côté de la PEA et de la FCO, d'autres virus transmis par les *Culicoides* sont aussi d'importance majeure en santé animale. C'est entre autre, le virus de la maladie hémorragique des cervidés (EHDV) (troisième virus transmis aux animaux par les *Culicoides* le plus important après la PEA et la FCO), le virus de l'encéphalite équine, le virus de la fièvre éphémérale bovine, le virus Palyam et le virus Akabane (Mellor, 2000).

Le virus de la maladie hémorragique des cervidés, comme la FCO et la PEA, est un *Orbivirus* dont 8 sérotypes sont actuellement connus (Mellor, 2000). Il est présent dans toute

l'Amérique (Nord, Centre et Sud), l'Afrique, l'Asie du Sud-Est, le Japon et l'Australie, et affecte une large gamme d'hôtes vertébrés comprenant des animaux domestiques et sauvages (Gumm *et al.*, 1984; Dulac *et al.*, 1989). L'infection est asymptomatique chez les ruminants et peut être grave et confondue avec la FCO chez certaines espèces de cerfs (Sohn & Yuill, 1991; Hoff & Trainer, 1978). La maladie a occasionné la mort de 400 bovins sur 39 000 cas au Japon en 1959 (Omori *et al.*, 1969). Le vecteur principal en Amérique du Nord est *Culicoides sonorensis* (Wirth et Jones) (Foster *et al.*, 1977). En Afrique, EHDV a été isolé à partir de *Culicoides* du groupe Schultzei (Mellor *et al.*, 1984), et en Australie à partir de *C. brevitarsis* (Mellor, 2000). Les vecteurs en Amérique Centrale et du Sud, au Japon et en Asie du Sud-Est demeurent inconnus (Mellor, 2000).

2.2.1. La peste équine africaine

Inscrite sur la liste A des maladies transmissibles de l'organisation internationale de l'épizootie (OIE), la peste équine africaine (PEA) est une maladie virale infectieuse mais non contagieuse, affectant toutes les espèces d'équidés, due à un *Orbivirus* de la famille des Reoviridae avec neuf sérotypes connus et caractérisée par une atteinte des fonctions respiratoire et circulatoire. La PEA est une maladie vectorielle transmise par les femelles de certaines espèces de *Culicoides* sp (Du Toit, 1944).

2.2.1.1. Historique et distribution

La peste équine africaine a été décrite pour la première fois en 1719 lors d'une épizootie qui provoqua la mort de 1 700 chevaux dans la région du Cap en Afrique du Sud (Zientara *et al.*, 2012). C'est une maladie endémique en Afrique sub-saharienne entre la latitude reliant le Sénégal à l'Éthiopie jusqu'à l'Afrique du Sud mais également le Yémen dans la péninsule Arabique. Par le passé, le virus de la peste équine est sorti de sa zone de circulation historique et a sévi dans plusieurs régions déclarées préalablement indemnes. Des épidémies ont éclaté au Moyen Orient et en Asie (Chypre, Liban, Turquie, Irak, Iran, Pakistan et Inde) entre 1959 et 1960 (Mellor & Hamblin, 2004) ainsi qu'au Maghreb (Maroc puis extension en Algérie, en Tunisie). Par la suite, le virus a traversé le détroit de Gibraltar avec extension à la péninsule Ibérique entre 1965-1966 (Mellor & Hamblin, 2004) puis le virus a de nouveau sévi sur la péninsule Ibérique entre 1987 et 1990 suite à l'importation de zèbres infectés en provenance de Namibie au zoo de Madrid (Mellor & Hamblin, 2004). L'Arabie Saoudite et le Yémen ont été touchés en 1997 (OIE, 2009), de même que les îles du Cap-Vert en 1999 (OIE, 2009).

2.2.1.2. Pathologie et clinique

La peste équine africaine est une maladie virale infectieuse, virulente et inoculable, affectant principalement les équidés. Elle est due à un virus de la famille des Reoviridae, du genre *Orbivirus* caractérisé par sa pluralité antigénique et par sa transmission vectorielle saisonnière (Mellor & Hamblin, 2004). L'incubation du virus est de durée variable selon la virulence de la souche et la réceptivité des populations sensibles. Elle dure 3 à 14 jours. La maladie se manifeste sous quatre formes : la forme fébrile, la forme œdémateuse ou cardiaque, la forme pulmonaire et la forme mixte (Leforban *et al.*, 1983).

➤ Forme pulmonaire

C'est la plus grave et la plus mortelle. Elle débute par une hyperthermie rapide (41 à 42°C en 2 à 4 jours) associée à une anorexie, une tachycardie et une congestion des muqueuses avec parfois la présence de pétéchies. L'appétit peut être conservé au début de l'infection malgré la fièvre (Guthrie, 2006). Une sudation, diversement localisée (naseaux, base des oreilles, face latérales de l'encolure, anus...), peut être observée chez certains chevaux (Zientara, 2003).

L'animal a au départ un faciès angoissé avec des naseaux dilatés, la langue pendante. Puis l'animal est en orthopnée (l'animal est immobile, la tête tendue sur l'encolure, les antérieurs écartés et le dos voûté). La difficulté respiratoire s'accroît rapidement et un jetage séreux vient encombrer les naseaux : une toux forte, spasmodique et douloureuse secoue l'animal. Le jetage initialement séreux devient spumeux avec un aspect de « blanc d'œufs en neige ». L'animal tombe alors en décubitus ou tombe brutalement et meurt par asphyxie. Dans les minutes précédant la mort, de grandes quantités de jetage spumeux peuvent s'écouler des naseaux de l'animal (Figure 4). La durée entre l'apparition de la dyspnée et la mort de l'animal peut être de moins d'une demi-heure mais en général la mort a lieu entre 24 et 48 heures (Zientara, 2003). Parfois, la mort survient de manière si rapide que les signes cliniques ne sont pas observés. La survie de l'animal est exceptionnelle puisque le taux de létalité est supérieur à 95%.



Figure 4 : Jetage observé dans la phase terminale de la forme pulmonaire de la peste équine africaine (Zientara, 2005).

➤ Forme œdémateuse ou cardiaque

On la retrouve sur des individus plus résistants ou des animaux infectés par une souche virale peu pathogène. Le syndrome fébrile est modéré (l'appétit peut être conservé) avec une poussée thermique initiale progressive et moins intense (39 à 40°C atteints dans les 10 à 12 jours) et qui peut soit se maintenir, soit diminuer progressivement (cas le plus fréquent). Vers le 14-15^{ème} jour, alors que la baisse de température est amorcée, apparaissent des œdèmes sous cutanés. Ils débutent dans les fosses temporales par une déformation en saillie de la région sus-orbitale qui peut atteindre le volume d'une mandarine en 3 à 4 jours. La précocité d'apparition de ces œdèmes au cours de la phase fébrile permet de définir le pronostic vital de l'animal. Parfois ce gonflement disparaît en quelques jours. L'œdème peut toucher aussi les joues, les lèvres, la langue de l'animal, la région inter mandibulaire, le chanfrein et les nasaux. La tête a un aspect tuméfié (Figure 5) et dans certains cas l'œdème peut envahir l'encolure, la poitrine et descendre le long des membres antérieurs mais sans jamais atteindre la partie distale des membres. Il s'agit d'un œdème froid, indolore, ferme au début : le «signe du godet» n'apparaît qu'en quelques jours. Simultanément apparaissent des signes cardiaques : lorsque les œdèmes sont constitués, les bruits du cœur deviennent plus faibles en raison de la formation d'une péricardite exsudative. Le cheval, jusque-là apathique, finit par se coucher ; l'apparition de sueurs froides, le refroidissement des oreilles, des mouvements désordonnés et une détresse respiratoire annoncent l'arrêt plus ou moins brutal du cœur (Zientara, 2003). La mort de l'animal a lieu en général dans les 3 à 10 jours après le développement des œdèmes sous-cutanés. La guérison est possible quelle que soit l'importance des œdèmes sous-cutanés.

La mortalité est d'environ 50%. L'atteinte respiratoire diminue progressivement, en moyenne en 3 à 8 jours. Il y a une distension de l'œsophage et le risque de broncho-pneumonie par fausse déglutition est très élevé. Pendant cette période de convalescence, les animaux sont plus sensibles et peuvent déclarer également une piroplasmose (Guthrie, 2006).



Figure 5: Tuméfaction de la tête observée chez un cheval lors d'une suspicion de peste équine africaine (cliché : Pape SECK 2011).

➤ Forme mixte

Dans le cas des formes mixtes, les signes pulmonaires et les œdèmes sous-cutanés apparaissent simultanément ou successivement dans un ordre indéterminé. La mort résulte d'une défaillance cardiaque ou d'une asphyxie (Zientara, 2003). Le taux de létalité se situe aux alentours de 80% et la mort survient dans les 3 à 6 jours après la poussée fébrile (Gunn, 1993).

➤ Forme fébrile

On observe une hyperthermie comprise entre 39 et 40°C, accompagnée d'une légère polypnée et d'une tachycardie. Cette atteinte disparaît au bout de 10 à 15 jours (Zientara, 2003).

2.2.1.3. Épidémiologie

La peste équine africaine est une maladie sporadique dans les zones enzootiques et présente un caractère saisonnier car l'évolution de la maladie est directement liée aux périodes d'activité des vecteurs en saison chaude et humide. Il existe neuf sérotypes différents du virus de la PEA (McIntosh, 1958; Howell, 1962; Mellor & Hamblin, 2004) et il n'y a pas de neutralisation croisée à l'exception des sérotypes 6 et 9 et dans une moindre mesure 1 et 2, 3 et 7, 5 et 8 (Zientara, 2003). Les neuf sérotypes sont présents en Afrique. Les sérotypes 1 à 8 sont typiquement trouvés en Afrique subsaharienne. Tandis que le sérotype 9 est le plus

répandu et a été responsable de presque toutes les épidémies en dehors de l'Afrique avec comme seule exception l'épizootie de 1987-1990 en péninsule Ibérique avec le sérotype 4 (Mellor & Hamblin, 2004).

En région Afro-tropicale, les vecteurs impliqués (trouvés infectés sur le terrain et compétents au laboratoire) dans la transmission du virus de la peste équine africaine sont *C. imicola* et *C. bolitinos* (Venter *et al.*, 2000). Toutefois, d'autres espèces telles que *Culicoides gulbenkiani* (Caeiro), *Culicoides bedfordi* (Ingram et Macfie), *Culicoides dutoiti* (De Meillon) et *Culicoides engubandei* (De Meillon) ont montré en Afrique du Sud qu'elles étaient capables au laboratoire de répliquer des isolats viraux (sérotype 7) issus du terrain (Venter & Paweska, 2007). Certaines de ces espèces comme *C. gulbenkiani* et *C. engubandei* qui se gorgent préférentiellement sur chevaux (Meiswinkel *et al.*, 2004) pourraient contribuer à la transmission du virus de cette maladie. En dehors de l'Afrique tropicale, des infections expérimentales ont montrées que *C. sonorensis*, espèce Nord-Américaine est compétente à transmettre le virus de la peste équine (Boorman *et al.*, 1975; Mellor *et al.*, 1975) et en zone paléarctique, des spécimens de *Culicoides obsoletus* (Meigen) et de *Culicoides pulicaris* (Linnaeus) récoltés sur le terrain ont été trouvés infectés lors de l'épidémie de 1987-1990 en Espagne (Mellor & Hamblin, 2004). Ainsi, il existe un risque réel d'introduction de la peste équine africaine dans d'autres régions indemnes et surtout en Europe, de par sa proximité avec l'Afrique mais aussi par l'extension de l'aire géographique du vecteur afro-asiatique *C. imicola* vers le Nord du continent. Cette espèce est désormais présente dans l'ensemble du bassin méditerranéen dont le Sud de l'Europe (Mellor & Boorman, 1995; Ortega *et al.*, 1998; Capela *et al.*, 2003; Baldet *et al.*, 2005).

La peste équine africaine (PEA) touche toutes les espèces d'équidés domestiques et sauvages avec un taux de mortalité dépendant de l'espèce infectée et du sérotype viral. Chez les équidés, le cheval est le plus sensible avec un taux de mortalité de 50 à 95%. Dans les régions où la PEA est endémique, les races locales de cheval peuvent acquérir une immunité naturelle solide, comme cela a été décrit au Sénégal (Maurice & Provost, 1967; Bourdin & Laurent, 1974; Sarr *et al.*, 1988). Chez le mulet, les taux de mortalité peuvent atteindre 50% et pour l'âne, ils varient entre 0 et 10%. Les zèbres sont très résistants au virus et ne développent aucun signe clinique à l'exception d'une hyperthermie ; ils peuvent donc constituer un réservoir du virus dans les zones d'endémie. Des anticorps et/ou du virus ont été détectés chez les camélidés, les bovidés, les éléphants d'Afrique, les hyènes, les lions, les guépards, les chiens sauvages africains, les chacals et les genets (Binopal *et al.*, 1992; Lubroth, 1992;

Alexander *et al.*, 1995). Le chien peut s'infecter par consommation de viande infectée (Theiler, 1910; Piercy, 1951). Cependant, un cas de chien mort de peste équine, qui n'avait apparemment pas une alimentation de viande de cheval a été décrite par Van Sittert *et al.* (2013).

2.2.1.4. Diagnostic et surveillance

Le diagnostic de laboratoire de la PEA est fondamental. Bien que les signes cliniques et les lésions soient très évocateurs, ils peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies équines telles que l'encéphalite équine, l'anémie infectieuse, la pneumonie à morbilivirus, l'artérite virale équine, la babésiose et le purpura hémorragique. Comme toute maladie virale, le diagnostic de laboratoire repose sur l'identification du virus infectieux, de son acide nucléique, des antigènes viraux ou des anticorps spécifiques. Différentes méthodes immuno-enzymatique (ELISA) ont été mises au point pour la détection rapide d'antigènes viraux dans la rate et le surnageant de cultures de cellules infectées. L'identification de l'ARN viral est aussi réalisée à l'aide de la technique de transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR), et par une réaction sérologique spécifique telle que la séroneutralisation virale (SN) (OIE, 2008). Il est important d'effectuer l'isolement et le sérotypage du virus chaque fois que des foyers apparaissent hors des régions d'enzootie.

2.2.1.5. Impact sanitaire et économique

La peste équine est particulièrement foudroyante dans une région nouvellement infectée ou sur des races de chevaux importées en zone enzootique. La première épizootie de PEA de 1719 en Afrique du Sud avait engendré la mort de 1 700 chevaux (Mellor & Hamblin, 2004). Plusieurs vagues d'épizootie ont par la suite été enregistrées en Afrique du Sud dont la plus importante est celle de 1854-1855 qui provoqua la mort de 70 000 chevaux en 8 mois, soit 40% de la population équine (Mellor & Hamblin, 2004). L'épizootie de 1959-1960 au Moyen orient et en Asie du Sud-Est a été la plus meurtrière avec la mort de plus de 300 000 équidés. Au Sénégal, l'étude de l'impact économique de la dernière épizootie de 2007 indique 1 169 morts dont 32 chevaux de race exotique et 1 357 malades sur un effectif national de 518 212 chevaux estimés. Le coût économique total a été estimé à près de 900 millions de FCFA. Les pertes liées à la mortalité et à la morbidité représentent la part la plus importante de ce coût avec environ 500 millions de FCFA, soit 55,58% du coût économique total. Le reste (400

millions de FCFA, soit 44,42%) est dû au coût de contrôle de la maladie (Akakpo *et al.*, 2011).

2.2.1.6. Prévention et lutte

Il n'existe pas de traitement spécifique pour les animaux atteints de la peste équine africaine en dehors de soins palliatifs (Mellor & Hamblin, 2004). Les seuls moyens de contrôle et de prévention restent la vaccination, l'isolement ou l'euthanasie des animaux infectés, la restriction des mouvements des équidés et la lutte anti-vectorielle. En Europe, notamment en France, la lutte contre la peste équine africaine est prévue par des mesures sanitaires et médicales. Si l'existence de la peste équine africaine est confirmée, une série de mesures est prise : l'euthanasie et l'incinération sans délai des équidés malades dans l'exploitation; la séquestration de l'ensemble des exploitations équines situées dans un rayon de 20 km autour de l'exploitation infectée; la vaccination systématique de tous les équidés se trouvant dans cette zone de 20 km ; une délimitation d'une zone de protection de rayon d'au moins 100 km autour de l'exploitation infectée et d'une zone de surveillance d'au moins 50 km au-delà du périmètre de la zone de protection. Dans ces zones, toutes les exploitations détenant des équidés sont recensées et périodiquement inspectées. La vaccination des équidés peut être rendue obligatoire dans tout ou partie de la zone de protection, elle est interdite dans la zone de surveillance. La partie du territoire reconnue infectée de peste équine pourra être reconnue indemne, par arrêté du ministre chargé de l'agriculture, au plus tôt deux ans après la confirmation officielle du dernier cas, ou un an après l'arrêt de la vaccination (Zientara, http://agriculture.gouv.fr/guide_epizooties/monographies/f-pe.htm visité le 19/05/2014). A côté de la vaccination, des mesures de lutte anti-vectorielle sont entreprises pour limiter ou prévenir la diffusion de la maladie. Ces mesures comprennent la protection contre les attaques du vecteur mais aussi la destruction des gîtes larvaires. Au Sénégal la vaccination contre la peste équine est obligatoire. Lorsqu'un cas de peste équine est signalé dans une exploitation, l'autorité administrative compétente, sur proposition du service d'élevage, prend un arrêté déclarant infectés les locaux fréquentés par les animaux malades. Les malades doivent être isolés, les animaux des espèces chevalines, asine et croisement logés dans les locaux, sont placés sous la surveillance du service de l'élevage. Les mesures d'isolement peuvent être levées quarante jours après la disparition de la maladie et après l'exécution des mesures de désinfection et de désinsectisation.

2.2.2. La fièvre catarrhale ovine (FCO)

La FCO est classée sur la liste A du tableau des maladies de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE). Le virus est classé dans le genre *Orbivirus* de la famille des Reoviridae, comme celui de la PEA. La FCO affecte tous les ruminants. C'est une maladie vectorielle transmise par les femelles de certaines espèces de *Culicoides* sp (Du Toit, 1944).

2.2.2.1. Historique et distribution

La FCO est une arbovirose cosmopolite. Elle a été décrite pour la première fois au début du 20^e siècle sous le nom de fièvre catarrhe palustre, chez des moutons mérinos introduits dans la colonie du Cap en Afrique du Sud. Elle a été détectée pour la première fois au Sénégal avec l'arrivée de mouton mérinos Sud-Africains ainsi qu'au Soudan et au Burkina Faso (Curasson, 1925). Elle est signalée en Afrique centrale en 1940. Hors de l'Afrique tropicale, la maladie a été décrite pour la première fois en Europe à Chypre en 1943. Elle a ensuite été observée en Espagne et au Portugal en 1956-1957 (Campano Lopez & Sanchez Botija, 1958), aux Etats-Unis d'Amérique en 1948 (Hardy & Price, 1952), en Israël en 1949. La FCO est décrite dans le sous continent indien à partir de 1959 (Mellor *et al.*, 2000). Le virus de la FCO est isolé en Australie en 1977 (Mellor *et al.*, 2000). Le premier cas signalé en Chine dans la province du Yunnan date de 1979 (Mellor *et al.*, 2000). La FCO sévit traditionnellement sur une large bande s'étendant entre les latitudes 35° S et 40° N bien que dans certaines zones (Nord-Ouest des USA, Chine et Kazakhstan), elle peut s'étendre jusqu'au 50° N (Mellor *et al.*, 2008). Depuis 1998, neuf sérotypes (BTV-1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 16, 25) ont été identifiés en Europe (Wilson & Mellor, 2008; De Clercq *et al.*, 2009) et ont couvert la zone allant, pour l'axe Sud-Nord, du Sud de l'Espagne jusqu'à l'Angleterre, et d'Ouest en Est, du Portugal jusqu'à la Turquie et la Pologne.

2.2.2.2. Pathologie et clinique

Les symptômes de la FCO sont généralement inapparents (McLachlan, 1994). Dans les pays Africains, son existence est souvent méconnue en raison de la relative résistance des races locales de moutons et de chèvres. Cette résistance a pour conséquence que la FCO n'est en général pas diagnostiquée cliniquement, soit qu'elle évolue sous des formes frustes, soit qu'elle est confondue avec d'autres maladies ou masquée par celles-ci (Lefevre & Taylor, 1983). Les animaux infectés présentent une température allant de 40°C jusqu'à 42.5°C entre quatre et huit jours après l'infection. C'est au pic de virémie, c'est à dire entre le 5^e et le

7ème jour, que les symptômes apparaissent. L'animal semble alors abattu, devient anorexique et ne rumine plus. Elle est décrite classiquement sous trois formes.

➤ La forme abortive

Elle est caractérisée par une légère hyperthermie et une congestion irrégulière de la muqueuse buccale sans véritable inappétence. Le risque de retour des chaleurs et d'avortements précoces des femelles pleines est accru. Chez les mâles, il est noté une moindre reproductivité à cause d'une baisse transitoire de la fertilité.

➤ La forme aigüe

Elle débute par de la fièvre puis commence des mouvements de succion des lèvres et de la langue consécutifs à une congestion des muqueuses buccale, nasale et conjonctivale. Dans le même temps, apparaissent un écoulement nasal d'abord séreux devenant muqueux et une salivation moussante ; les muqueuses buccales et les lèvres tuméfiées prennent une coloration violacée. Sous la nécrose épithéliale apparaissent alors des ulcères se recouvrant d'une membrane diphtérique dégageant une odeur fétide. Des croûtes se forment et un œdème inflammatoire de toute la tête conduit les animaux à consommer une quantité considérable d'eau. Une dyspnée sévère est observée pendant 24 à 48 heures en fin de virémie. Lorsque les lésions buccales commencent à cicatriser, il apparaît une pododermatite au niveau des espaces interdigités d'un ou de plusieurs pattes. Sur tout le corps de l'animal, on rencontre aussi des lésions érythémateuses qui peuvent entraîner la chute de laine. Chez les jeunes, une diarrhée intense, souvent hémorragique, complète généralement le tableau clinique et se termine en deux à huit jours par la mort de l'animal. Le taux de létalité varie en fonction du type d'élevage, de la sensibilité des espèces touchées et de la virulence du sérotype. Il est estimé à 7% chez les bovins et de 50% chez les ovins (Zanella *et al.*, 2010).

➤ La forme subaiguë

Les symptômes sont les mêmes que dans la forme précédente mais sont moins intenses. Il apparaît également des lésions des muqueuses buccale et nasale, la congestion de la peau et la pododermatite, accompagnées éventuellement de myasthénie et d'exongulation provoquée par les germes bactériens de surinfection. L'évolution est cependant ralentie et l'animal périt en raison de l'amaigrissement et de la chute de laine. Cette mort peut survenir jusqu'à un an

après le début de l'infection. Le taux de létalité se situe entre 2% et 30% suivant les localisations et les traitements mis en place (Losos, 1986).

2.2.2.3. Épidémiologie

Il existe 24 sérotypes numérotés dans l'ordre de leur découverte (BTV1 à BTV24) avec un 25^e depuis la découverte du virus Toggenburg en Suisse (Hofmann *et al.*, 2008) et un 26^e isolé à partir d'un mouton au Koweït en 2010 (Maan *et al.*, 2011). Une fois infecté, le virus persiste chez les *Culicoides* durant toute leur vie. Après un repas de sang infectieux (pris par la femelle de *Culicoides* sur un hôte ruminant virémique), le virus passe au travers de la paroi intestinale et se dissémine via l'hémocoel dans différents tissus, jusqu'aux glandes salivaires, où il continue sa multiplication. Il est ensuite excrété dans la salive de l'insecte lors de la pique. La transmission virale est donc principalement faite par la piqûre de l'insecte. Comme pour la PEA, la circulation du virus dépend de la présence des *Culicoides* vecteurs. Le vecteur atteint sa capacité d'infection maximale dix jours après avoir absorbé le sang d'un animal en virémie (durée du cycle d'incubation extrinsèque).

Les principales espèces vectrices sont *C. imicola* et *C. bolitinos* en Afrique, *C. imicola* et *Culicoides fulvus* (Sen et Das Gupta) en Asie, *C. brevitarsis* et *C. fulvus* en Australie, *C. sonorensis* en Amérique du Nord, *Culicoides insignis* (Lutz) et *Culicoides pusillus* (Lutz) en Amérique centrale et du Sud (Mellor *et al.*, 2000; Tabachnick, 2004). D'autres espèces peuvent intervenir dans la transmission de la FCO. C'est entre autres en Afrique tropicale, *Culicoides milnei* (Austen), *C. gulbenkiani*, *Culicoides magnus* (Colaco), *Culicoides enderleini* (Cornet et Brunhes) (Nevill *et al.*, 1992; Meiswinkel *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2006).

La FCO affecte les ruminants domestiques (bovins, ovins et caprins) et sauvages (cerfs, antilopes). Les moutons et les cerfs sont les espèces les plus sensibles à l'infection, les races de moutons améliorées issus des pays tempérés le sont encore davantage (Sellers, 1984; Lefevre & Desoutter, 1988). Les bovins et les antilopes sont couramment infectés. Chez les ovins, la mortalité varie entre 2 à 50% des individus d'un troupeau atteint selon la virulence de la souche virale, la sensibilité des animaux et les conditions d'élevage. Le taux de mortalité peut aller dans certains cas jusqu'à 90% (Losos, 1986).

2.2.2.4. Diagnostic et surveillance

Une suspicion de fièvre catarrhale ovine est posée lors d'une épidémie associant la fièvre catarrhale et les avortements ainsi que lorsque la saison est propice à la pullulation des insectes vecteurs. Le diagnostic sérologique est réalisé par deux principales techniques : la séroneutralisation et l'ELISA. Le diagnostic virologique s'effectue par isolement viral à partir du sang hépariné. L'amplification génique (PCR) détecte le génome viral dans le sang et est spécifique de chaque sérotype.

L'émergence de la FCO en Europe du sud en 1998, reliée à l'expansion septentrionale de son vecteur principal *C. imicola*, ainsi que les contraintes réglementaires ont amené les autorités françaises à installer un réseau de surveillance pluridisciplinaire (clinique, sérologique, virologique, entomologique) (Baldet *et al.*, 2005). La surveillance entomologique mise en place depuis 2002 a pour mission d'étudier les dynamiques de populations de *C. imicola* et des autres espèces de *Culicoides* associées aux élevages en Corse, de surveiller l'introduction de *C. imicola* dans les départements français riverains de la Méditerranée et de définir les périodes de circulation animale (Baldet *et al.*, 2005; Balenghien *et al.*, 2010). De plus, elle est interrompue dans le continent depuis janvier 2013.

2.2.2.5. Impact sanitaire et économique

La FCO est économiquement importante dans les pays où l'élevage ovin est de type intensif avec des races améliorées. Les pertes sont non seulement directes par la mortalité et les avortements, mais aussi indirectes par le retard de croissance, le déclassement des carcasses et la mauvaise qualité de la laine, la chute de la production laitière et surtout les pertes financières consécutives à la restriction des mouvements d'animaux (Bricq, 2008; Saegerman *et al.*, 2008). Ces pertes ont été évaluées aux Etats-Unis à 125 millions de dollars par an (Tabachnick, 1996) et à 200 millions d'euros pour les deux années consécutives 2006 et 2007 aux Pays-Bas (Velthuis *et al.*, 2010). Historiquement, l'épizootie des années 1956-1957 dans la péninsule Ibérique avait entraîné la mort de 180 000 moutons (Lopez & Botija, 1958). En Belgique, 695 foyers de FCO ont été signalés (399 chez les ovins et 296 chez les bovins) en 2006 et 6 870 exploitations ont été touchées par cette maladie (4 457 chez les bovins, 2 400 chez les ovins et 13 chez les caprins) en 2007 (Zimmer *et al.*, 2008).

Malgré la présence du virus au Sénégal comme vraisemblablement dans tous les pays de l'Afrique de l'Ouest, la maladie n'a jamais été observée cliniquement (Lefevre & Taylor, 1983). De ce fait, aucune perte économique directe ou indirecte liée à la maladie n'a été documentée.

2.2.2.6. Prévention et lutte

La vaccination est la mesure la plus efficace que l'on puisse mettre en œuvre dans un territoire déjà infecté par la FCO. Elle est également utilisée pour contrôler la maladie. Cependant, la vaccination présente certains inconvénients liés à l'utilisation de vaccins vivants atténués et la possibilité que ces virus vaccinaux soient disséminés par les vecteurs de la même manière que le virus sauvage. Il existe une possibilité pour un retour à la virulence ainsi qu'une possibilité de réassortiment de gènes avec des gènes issus de souches sauvages rencontrées sur le terrain. De plus avec la vaccination, on ne peut plus déclarer une zone indemne du fait de l'impossibilité de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés. A côté de la vaccination, des mesures sanitaires sont entreprises pour limiter ou prévenir la diffusion de la maladie. Ces mesures comprennent la protection contre les attaques du vecteur et des restrictions dans le déplacement des espèces animales réceptives en cas de suspicion de la maladie. Comme pour la PEA, lorsque la FCO est confirmée dans une exploitation, un périmètre d'interdiction de mouvement des animaux de 20 km de rayon autour des troupeaux infectés et, en complément, des zones de protection de 100 km de rayon et de surveillance de minimum 50 km au-delà des limites de la zone de protection et où la vaccination n'est pas effectuée sont définis. Ces restrictions seront maintenues jusqu'à ce que le virus soit éliminé et que la présence de la maladie puisse être exclue. Les animaux des exploitations infectées présentant des signes cliniques de la maladie peuvent être euthanasiés ou abattus, et l'éleveur peut être indemnisé par l'État de la perte de ses animaux.

Au Sénégal, quand un cas de fièvre catarrhale ovine est déclaré dans un troupeau, l'autorité administrative compétente, sur proposition du service d'élevage, prend un arrêté portant déclaration d'infection et de prescrit l'isolement des malades. Le reste du troupeau peut aller au pâturage sur une aire circonscrite, en évitant tout contact avec d'autres animaux de l'espèce ovine. Des mesures de désinsectisation peuvent être prescrites dans le périmètre infecté et tout autour. Les mesures d'isolement peuvent être levées quinze jours après la disparition de la maladie et après l'application des mesures relative à la désinfection.

DEUXIEME PARTIE : DIVERSITE TAXONOMIQUE, BIO-ECOLOGIE ET CONTROLE DES *CULICOIDES* VECTEURS DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Les maladies à transmission vectorielle d'importance médicale et vétérinaire présentent des cycles épidémiologiques complexes où interagissent différents acteurs dans un environnement donné: l'hôte mammifère, le pathogène (parasite, virus ou bactérie) et l'arthropode vecteur. Depuis l'établissement de l'implication d'un arthropode dans le cycle parasitaire et la dissémination d'une maladie, la lutte contre ces arthropodes est devenue une nouvelle voie pour le contrôle de ces maladies. Avant la découverte des premiers insecticides de contact (avant la seconde guerre mondiale), les moyens disponibles pour lutter contre les arthropodes étaient très réduits (Rodhain & Perez, 1985). Les premières applications d'insecticides, notamment de DDT, furent très prometteuses pour la lutte anti-vectorielle, mais l'apparition plus tard des phénomènes de résistance chez les insectes cibles et des considérations légitimes d'impact sur la faune non cible et l'environnement entraînèrent une limitation des conditions de leur utilisation et par conséquent de l'efficacité des programmes de lutte anti-vectorielle. Plusieurs méthodes de lutte peuvent être déployées, mais toutes ne peuvent être correctement appliquées qu'après une étude fine de l'espèce cible sur les plans taxonomique, géographique et écologique (Rodhain & Perez, 1985). Les *Culicoides* font parties de ces arthropodes vecteurs de maladies d'intérêt vétérinaire dont la taxonomie reste encore floue, surtout en région Afro-tropicale.

L'identification des espèces du genre *Culicoides* s'effectue principalement grâce à des caractères anatomiques et morphométriques. Plusieurs clés d'identification sont disponibles mais la grande majorité de ces clés se limitent à un groupe d'espèces et/ou à une zone géographique bien précise. La clé d'identification la plus importante en termes d'espèces est celle de Wirth et Hubert (1989) en région Orientale avec 168 espèces. En région Afro-tropicale, plusieurs clés d'identification sont proposées (Cornet & Chateau, 1970; Khamala & Kettle, 1971; Cornet *et al.*, 1974; Boorman & Dipeolu, 1979; Glick, 1990). D'autres travaux remarquables ont été réalisés au sein des groupes *Imicola* (Meiswinkel, 1989, 1991), *Milnei* (Cornet *et al.*, 1974), *Schultzei* (Cornet & Brunhes, 1994) et *Similis* (Cornet & Chateau, 1970;

Meiswinkel & Dyce, 1989). Toutefois, la plupart de ces clés sont anciennes et doivent être mises à jour à cause de descriptions d'espèces nouvelles et/ou qui tombent en synonymie. Outre ces difficultés taxonomiques, les connaissances sur l'écologie des *Culicoides* sont relativement limitées, limitant ainsi les possibilités de lutte contre ces moucheron.

Au Sénégal, la revue de la littérature indique le recensement de trente-quatre espèces de *Culicoides* (Cornet, 1969; Cornet & Chateau, 1970; Cornet & Brunhes, 1994; Borkent, 2014). Parmi cette faune, on retrouve *C. imicola*, espèce présente sur tout le continent Africain et vecteur avéré du virus de la peste équine africaine (PEA) en Afrique Australe mais dont l'implication dans les épizooties de la maladie au Sénégal n'a jamais été établie. Ainsi, identifier les espèces pouvant intervenir dans la transmission du virus de la PEA au Sénégal, un écosystème différent de celui de l'Afrique Australe, est impératif afin de mettre en place des mesures de contrôle spécifique contre ces moucheron.

Comme la plupart des arthropodes hématophages, les *Culicoides* présentent une grande diversité d'hôtes. Certaines espèces sont anthropophiles (*Culicoides grahamii* Austen), tandis que d'autres sont zoophiles ou ornithophiles (Zimmer *et al.*, 2008). Les préférences trophiques des insectes hématophages peuvent être quantifiées soit par une approche directe en comparant les abondances récoltées dans différents pièges à appât (Hair & Turner, 1968; Sullivan *et al.*, 1971), soit par une approche indirecte par identification de l'origine des repas de sang de femelles capturées gorgées (Murray, 1970; Kay *et al.*, 2007). Vivant à proximité des élevages et des endroits humides, la dispersion des *Culicoides* se fait essentiellement par vol actif à la recherche d'hôtes. Les *Culicoides* ont une activité de vol et de piqure principalement crépusculaire, mais peuvent poursuivre leurs activités pendant la nuit.

En dehors de l'Afrique du Sud, très peu d'études ont été réalisées sur la biologie et l'écologie des espèces africaines du genre *Culicoides*. Les seules études approfondies ont été faites en Afrique Centrale: au Cameroun (Nicholas, 1953), au Gabon (Auriault, 1977) et au Congo (Vattier-Bernard *et al.*, 1986; Itoua *et al.*, 1987) et concernent essentiellement *C. grahamii*. Cette espèce est fortement anthropophile, pouvant constituer localement une forte nuisance pour l'homme, et son activité trophique est étroitement liée au lever et au coucher du soleil. Cependant, la majorité des autres espèces étudiées en Afrique Centrale présentent plutôt un comportement zoo-anthropophile comme *Culicoides kumbaensis* (Callot, Kremer, Mouchet et Bach), *Culicoides fulvithorax* (Austen), *Culicoides dubitatus* (Kremer, Rebholtz-Hirtzel et Delécolle) et *Culicoides trifasciellus* (Goetghebuer) (Itoua *et al.*, 1987). En Afrique de l'ouest, la seule étude sur les vecteurs du virus de la peste reste les travaux de Rawlings en Gambie (Rawlings *et al.*, 1998). La seule espèce africaine d'intérêt vétérinaire qui a été

étudiée à ce jour en dehors de l'Afrique Australe est *C. kingi* (Austen) au Soudan et qui présente une activité de vol diurne (El Sinnary *et al.*, 1985).

D'une manière générale, la caractérisation de ces paramètres entomologiques (préférences tropiques et rythme d'activité) s'avère indispensable pour mieux connaître la bio-écologie des espèces vectrices afin de cibler la lutte anti-vectorielle.

La lutte contre les *Culicoides* peut être ciblée sur les différents stades de l'espèce d'intérêt : les stades immatures (larves) ou les imagos (adultes). Aux Etats-Unis, Linley et Davies (1971) ont développé différentes méthodes d'aménagement des marais saumâtres de Floride afin de réduire les populations de *Culicoides* constituant localement une forte nuisance pour l'homme et dont les larves se développent dans ces milieux :

- l'inondation des marécages par endiguement : la technique consiste essentiellement à entourer le marécage d'une longue digue qui retient l'eau à un niveau assez constant. Une hauteur d'eau de 5 à 8 cm au-dessus des monticules de boue les plus élevés est suffisante.
- creusage, remplissage, cloisonnement : de nombreux aménagements touristiques en Floride où vivent de tels insectes ont été faits sur des marais par la méthode du creusage-remplissage puis par cloisonnement. De profonds canaux sont creusés dans la boue du marais (creusage) ; la terre ainsi prélevée est utilisée pour surélever les terrains voisins (remplissage). La construction de cloisonnements en ciment le long des berges des canaux évite leurs dégradations et améliore l'amarrage des bateaux privés. Ce type d'aménagement permet de contrôler de façon permanente les stades immatures des Ceratopogonidae dans la zone ainsi modifiée.
- assèchement : l'assèchement des marais par comblement est très coûteux et difficilement recommandable d'un point de vue écologique et environnemental.

En région Paléarctique, plusieurs techniques de contrôle de ces moucheron piqueurs ont été développées (Carpenter, Mellor, *et al.*, 2008) et visent essentiellement l'espèce *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) en raison de sa forte nuisance (Kettle, 1996; Carpenter *et al.*, 2005; Carpenter, Szmaragd, *et al.*, 2008). Ces efforts ont concerné également les espèces des groupes *Obsoletus* et *Pulicaris*, responsables de la «gale», une dermatite allergique saisonnière récurrente qui affecte les chevaux. Ces méthodes font appel à la destruction (par aménagement) ou à l'application d'insecticides et d'agents pathogènes dans les gîtes larvaires, le contrôle des moucheron adultes par le traitement des étables ou directement sur les animaux avec des insecticides et l'utilisation de répulsifs ou de leurres (Carpenter, Mellor, *et al.*, 2008).

1. Contexte

La peste équine africaine (PEA) et la fièvre catarrhale ovine (FCO) sont inscrites sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE). Les virus de ces deux maladies sont transmis aux hôtes par la piqure de moucheron du genre *Culicoides*. La peste équine est endémique en région subsaharienne et considérée comme à risque d'émergence en Europe (Rawlings *et al.*, 1997; De Vos *et al.*, 2012; Zientara *et al.*, 2012). La fièvre catarrhale ovine affecte principalement les ruminants domestiques (ovins, bovins, caprins) et sauvages. Depuis, les années 2000, l'étude des *Culicoides* a connu un regain intérêt suite à l'émergence de la FCO en Europe (Baldet *et al.*, 2005; Purse *et al.*, 2005; Balenghien & Delécolle, 2009), mais également en raison de l'émergence d'un nouveau virus en 2011 en Allemagne, le virus Schmollenberg touchant les ruminants et transmis également par les *Culicoides* et qui s'est étendu dans toute l'Europe en 2012 et 2013 (Hoffmann *et al.*, 2012; Martinelle *et al.*, 2012; OIE, 2013). A cela s'ajoute l'extension et l'implantation du vecteur Afro-asiatique *C. imicola* dans le Sud de l'Europe (Mellor & Boorman, 1995; Ortega *et al.*, 1998; Capela *et al.*, 2003). Cette crainte est justifiée par l'introduction de la peste équine africaine en Europe dans le passé par le transport de vecteurs infectants par le vent ou par importation d'animaux infectés et la capacité des espèces autochtones à diffuser le virus (Zientara *et al.*, 2012) ravive le regain d'intérêt pour ces espèces. A cela s'ajoute les foyers récents de la peste équine africaine en Afrique de l'Ouest.

2. Rappel des objectifs de la thèse

En région Afro-tropicale, malgré l'importance épidémiologique des espèces du genre *Culicoides*, la taxonomie reste limitée par des clés d'identification locales ou régionales. Les derniers inventaires des espèces de *Culicoides* au Sénégal datent de quatre décennies. Elles n'avaient qu'un caractère taxonomique et ne permettaient pas d'identifier clairement les vecteurs impliqués dans la transmission du virus de la peste équine africaine. Ainsi, le cadre de cette thèse, qui porte sur l'écologie et la lutte contre les *Culicoides* vecteurs de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine au Sénégal, a pour objectif général **d'améliorer nos connaissances sur la taxonomie et bio-écologie des principales espèces de *Culicoides* d'intérêt vétérinaire au Sénégal et d'évaluer des stratégies de lutte contre ces populations de *Culicoides*.**

Pour atteindre cet objectif général, il faut une bonne connaissance des populations vectrices. Ainsi, notre étude reposait sur les objectifs spécifiques suivants :

- Diversité taxonomique, dynamique temporelle et les relations entre les espèces locales de *Culicoides* et l'hôte-cheval dans la zone des Niayes ;
- Etudier le rythme nycthéméral de *Culicoides oxystoma* (espèce locale dominante) ;
- Préciser les préférences trophiques et le rythme nycthéméral des espèces locales de *Culicoides* vecteurs potentiels de la peste équine africaine et de la fièvre catarrhale ovine ;
- Déterminer la sensibilité des espèces locales de *Culicoides* vecteurs potentiels de la peste équine africaine et de la fièvre catarrhale ovine à différentes molécules insecticides ;
- Evaluer l'efficacité de deux formulations insecticides, une formulation Pour-On *Cyperclor Plus*® et un écran imprégné *Zerofly*®, sur les populations locales de *Culicoides*.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1. PRESENTATION GENERALE DE LA ZONE D'ETUDE

Ces études se sont déroulées dans la partie sud de la zone des Niayes, dans les régions de Dakar et de Thiès.

1.1. Localisation

La zone des Niayes constitue un écosystème particulier qui s'étend sur une longueur de 180 km entre Dakar et le Sud du Delta du fleuve Sénégal sur une bande côtière de 25 à 30 km de large (Figure 6). Les Niayes sont des dépressions inter-dunaires plus ou moins inondables en saison des pluies, situées à l'arrière du cordon littoral de la Grande Côte, de Dakar à l'embouchure du fleuve Sénégal.



Figure 6 : Délimitation des différentes zones écologiques du Sénégal (POUR_ORGANISATION DES NATIONS UNIES, 2007).

1.2. Climat et végétation

Le climat des Niayes est de type tropical sub-canarien. Les températures sont fraîches et les amplitudes thermiques faibles (Sagna, 2000). La moyenne mensuelle des températures la plus élevée est de 27,5° C à Dakar et de 28,1° C à Saint-Louis (Faye *et al.*, 1995). La proximité de l'océan favorise le fort taux d'humidité relative que l'on note dans cette région. Elle varie de 15% à 90% selon la distance de la zone par rapport à la mer et suivant la période de l'année. La zone présente une végétation diversifiée avec un recouvrement végétal généralement inférieur à 50%. La pluviométrie dépasse rarement 500mm/an au Sud, dans la région de Dakar et 350mm/an dans la partie Nord près du Delta du fleuve. Sous le double effet de la baisse des pluies et de la pression humaine, le couvert végétal se dégrade et les ressources en eau de surface ont grandement diminué. Des groupements de palmiers à huile (*Elaeis guineensis*) se développent dans les dépressions inter-dunaires des Niayes et le long de la Grande Côte. La zone recèle d'espaces forestiers peu importants localisés à MBao et dans le Littoral atlantique. On rencontre deux grandes saisons au Sénégal : la saison des pluies (de juillet à octobre) et la saison sèche (de novembre à juin). Cependant, la saison sèche peut être subdivisée en saison sèche froide (de novembre à février) et saison sèche chaude (mars à juin). Des précipitations qualifiées d'occultes et appelées « heug » ou pluies des mangues, surviennent souvent en saison sèche, notamment durant la période sèche froide (décembre, janvier et février).

1.3. Activités humaines et économiques

Les contre-performances de l'agriculture rurale et le déficit alimentaire encouragent depuis plusieurs décennies le développement d'une activité agricole urbaine et péri urbaine dont les principaux domaines sont l'horticulture et l'élevage (S. T. Fall *et al.*, 2000). La zone des Niayes regorge de potentialités économiques favorisées par les conditions physiques du milieu et la proximité de grands centres urbains comme Dakar, Thiès, Louga et Saint-Louis.

1.4. Agriculture

La zone des Niayes est la deuxième zone d'exploitation après le bassin arachidier alors que l'ensemble des terres cultivables ne dépasse pas 1%. Les exploitations horticoles dans la région des Niayes sont de deux types : les exploitations maraîchères et les exploitations arboricoles. Les exploitations maraîchères sont caractérisées par les productions de choux, pomme de terre, tomate, carotte, oignon, haricot vert, salade, etc. Quant aux exploitations

arboricoles, elles sont dominées par la production de papaye, banane, noix de coco, vin de palme, etc. (S. T. Fall *et al.*, 2000). Les exploitations agricoles sont caractérisées par des différences importantes, notamment en terme de superficies disponibles et de moyens techniques, avec dans certains cas le recours privilégié voire exclusif à la main-d'œuvre salariée et un niveau d'investissement élevé.

1.5. Elevage

Hébergeant 3% du cheptel national (80 000 à 90 000 bovins, 179 000 ovins et caprins, 17 100 équins et asins et 5 220 000 unités de volailles) (S. T. Fall & Badiane, 2001; Bouyer *et al.*, 2014), l'élevage de la zone des Niayes a une dominante intensive ou semi-intensive (S. T. Fall *et al.*, 2000). Pour l'élevage des ruminants, il existe un système extensif avec pâturage dans les espaces résiduels, les couloirs des exploitations maraîchères. Ces animaux sont parqués la nuit. Le système semi-intensif fait intervenir des pratiques de suppléments le soir après le pâturage. Le système intensif, met en stabulation les animaux pour leur apporter les ressources alimentaires nécessaires pour la production de lait et/ou de viande. La zone des Niayes est la principale région avicole intensive du Sénégal. Son climat et la proximité des marchés urbains sont favorables à l'implantation d'ateliers de production intensive de poulets et d'œufs. La région de Dakar arrive à satisfaire 65 à 70% de la demande nationale en poulet (S. T. Fall *et al.*, 2000).

1.6. Commerce

L'agriculture urbaine et périurbaine dans la zone des Niayes est essentiellement destinée à l'approvisionnement des marchés locaux. La région des Niayes fournit plus de 80% de la production nationale en légumes et 40% en fruits. La région de Dakar absorbe à elle seule 40% de la production en légumes (S. T. Fall *et al.*, 2000). Une partie de cette production est destinée à l'exportation. Le lait est commercialisé par les femmes Peulh sous forme de lait caillé dans les grands centres urbains comme Sébikotane, Rufisque et Dakar. Dans les systèmes d'élevages traditionnels, la commercialisation des animaux n'est pas planifiée. Ils sont vendus chaque fois qu'un besoin se fait sentir dans les systèmes d'exploitation traditionnel. La vente de bovins est dictée par des événements nécessitant d'importantes sommes d'argent (mariage, baptême, construction, frais médicaux, voyage à la Mecque etc.). Les petits ruminants constituent le "compte courant" de l'éleveur et sont mobilisés pour des dépenses telles que l'achat de nourriture, le paiement de main-d'œuvre, etc. Le fumier est

vendu au niveau d'un seul village Peul (Guendouf). Ce fumier est vendu à des citadins installés autour du village et pratiquant l'arboriculture fruitière et le maraîchage. Aussi, la vente de fourrage pour l'alimentation du cheptel urbain est importante.

1.7. Autres

Les Niayes couvrent la moitié des 718 km de la côte maritime du Sénégal. Cette façade atlantique est poissonneuse et fait des Niayes la première région halieutique du Sénégal. La pêche représente la première activité économique des populations. Elle est souvent associée aux cultures maraîchères. Les principaux centres de débarquement sont Saint-Louis, Kayar, Hann. La transformation artisanale concerne le fumage, le salage et le séchage.

L'extraction minière est très présente dans la zone, notamment avec les mines de phosphate dans la région de Thiès, l'extraction du sel au lac Rose de Niague et les carrières de coquillages dans le Gandiolais. L'exploitation de la tourbe est encore latente, même si la région offre de grandes potentialités.

La traction animale est une pratique très répandue dans la zone périurbaine des Niayes. Elle s'explique par l'existence d'un réseau routier assez dense mais insuffisamment ramifié pour atteindre des zones de production reculées. Les particularités topographiques caractérisées par l'existence de dunes de sables limitent également l'accès des périmètres maraîchers aux véhicules. L'animal est souvent la seule alternative susceptible d'apporter une réponse au problème du transport des intrants, du déstockage des produits et de la mobilité du producteur. Les espèces animales utilisées sont en priorité les chevaux et les ânes ; la taille de ce cheptel est faible allant de 1 à 5 unités par exploitation (S. T. Fall *et al.*, 1994).

2. Sites d'études

Des enquêtes ont été réalisées dans 5 centres équestres situés dans le sud de la zone des Niayes dans les régions de Dakar et de Thiès (Figure 7). Les coordonnées géographiques et les effectifs des animaux présents dans les sites d'étude sont donnés dans le tableau I.

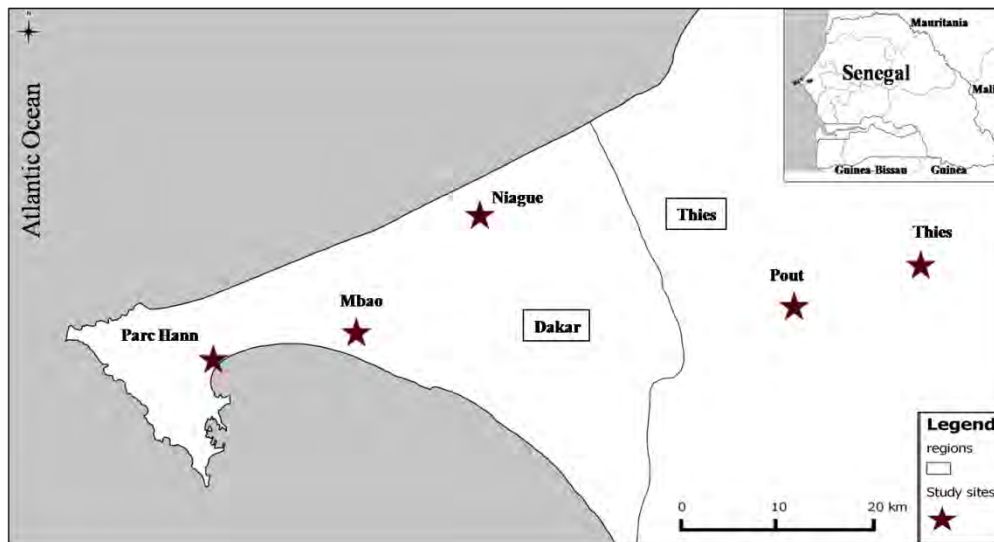


Figure 7 : Localisation des sites d'étude dans les régions de Dakar et Thiès (Sud de la zone des Niayes au Sénégal) (DIARRA 2013).

Tableau I : Coordonnées géographiques et effectifs/espèce des animaux répertoriés dans les sites d'étude.

	Parc Hann	Mbao	Niague	Thiès	Pout
Latitude	14,72827	14,74669	14,82338	14,79397	14,7665
Longitude	-17,4298	-17,32269	-17,24986	-16,95	-17,03572
chevaux	50	32	30	24*	12
poneys	30	0	0	0	0
ânes	0	0	1	0	8
ovins	0	0	3	2	1 700
bovins	0	0	4	0	1 580
caprins	0	3	0	0	240
volailles	0	2	109	50	11 000
chiens	0	0	1	1	0
lapins	0	0	0	13	0
buffles	0	0	0	0	25
autruches	0	0	0	0	150

*dont 19 de passage pour la saillie au moment du recensement (entre avril et juin 2012)

Le choix de la zone sud des Niayes et des 5 sites d'étude repose sur les cas répétés de peste équine africaine recensés par le passé dans la région mais aussi sur le potentiel économique que possède cette région dans le domaine de l'élevage avec l'implantation de nombreuses fermes modernes disposant de races exotiques. A cela s'ajoute les énormes pertes enregistrées sur les chevaux de races dans les centres équestres de la zone sud des Niayes lors de la dernière épizootie de peste équine de 2007 (Akakpo *et al.*, 2011).

3. Echantillonnage des *Culicoides*

Les captures de *Culicoides* ont été réalisées à l'aide de deux types de pièges : un piège à appât animal, identique à celui utilisé par Fall *et al.* (2011; 2013) et des pièges lumineux de type

OVI (Onderstepoort Veterinary Institute), méthode de piégeage couramment utilisée pour capturer les *Culicoides* (Venter *et al.*, 1998; Goffredo & Meiswinkel, 2004).

3.1. Les pièges OVI

Les pièges lumineux sont de type OVI, et ceux qui sont utilisés ici sont conçus en Italie et commercialisés par Istituto Zooprofilattico Sperimentale (Figure 8). Ces pièges fonctionnent sur secteur (220 V), ou avec une batterie (12 V). Le piège comprend un tube néon fluorescent (lumière noire) de 8 Watts et 240 Volts, qui mesure 30 cm. Le tube est accroché sous un « couvercle » métallique bleu. La lumière noire permet d'attirer les insectes la nuit. Un tissu moustiquaire à larges mailles permet de ne piéger que les petits insectes (les gros insectes tels que les papillons sont bloqués par la moustiquaire). Un ventilateur électrique (12cm x 12cm) aspire les insectes qui virevoltent autour du piège attirés par la lumière. Un cône en tissu de type moustiquaire (à mailles très fines) guide les insectes propulsés par le ventilateur vers le pot collecteur en plastique rempli au 1/3 d'eau savonneuse dans lequel les insectes se noient et sont recueillis. Une batterie de véhicule de 12 volts fait fonctionner le piège avec une autonomie suffisante pour assurer trois nuits successives de capture.



Figure 8 : Description des pièges OVI utilisés au cours de notre étude (cliché : Michel Ange DUSOM 2011).

3.1.1. Echantillonnage de *Culicoides* dans le suivi de la dynamique saisonnière

Deux pièges lumineux de type OVI ont été utilisés au cours de l'étude du suivi de la dynamique saisonnière des *Culicoides* à raison de trois nuits consécutives de capture par mois durant un an, de juillet 2011 à juin 2012 pour les sites du Parc Hann, de Mbao, de Thiès et de

Pout, et de novembre 2011 à octobre 2012 pour le site de Niague. Un des pièges lumineux est placé à moins de 5 m de l'ouverture d'un box contenant un cheval et le second dans un angle mort à plus de 10 m des chevaux. Les deux pièges sont placés à une hauteur de 1,5 à 2 m du sol à l'abri du vent et de toute source artificielle de lumière. Les pièges fonctionnent entre 18h et 8h du fait de l'activité crépusculaire et nocturne de la majorité des espèces de *Culicoides*. Ces pièges renseignent particulièrement sur la diversité et l'abondance des espèces de *Culicoides* et sont assez éloignés l'un de l'autre (> 10 m) pour minimiser les interactions qui pourraient exister entre eux (Venter *et al.*, 2012).

Les *Culicoides* collectés sont récupérés le matin (Figure 9A), tamisés pour séparer les insectes de l'eau savonneuse (Figure 9B) puis transférés dans un pot dument labélisé (date, heure de pose, heure de récolte, nom du site, emplacement et type de piège) (Figure 9C). Les échantillons ainsi collectés sont conservés dans l'alcool à 90°, transportés au laboratoire et gardés à l'abri de la lumière jusqu'à identification.



Figure 9 : Les différentes étapes de la collecte des échantillons : A) pot de collecte avec l'eau savonneuse ; B) séparation des insectes collectés de l'eau savonneuse par tamisage ; C) récupération des échantillons avec une pissette contenant de l'alcool 90° (cliché : Claire GARROS 2011).

3.1.2. Echantillonnage de *Culicoides* pour les tests de sensibilité aux insecticides

Les pièges OVI sont utilisés également pour capturer des *Culicoides* vivants destinés aux tests de sensibilité aux matières actives insecticides. Dans ce cas, le pot collecteur contenant l'eau savonneuse est remplacé par une cage (Figure 10). La cage est une petite charpente métallique de forme cubique de 18cm d'arête placée dans un sac en toile moustiquaire à mailles fines, puis recouvert avec du papier absorbant et enfin d'un papier aluminium. Le papier absorbant est imbibé d'eau pour fournir une certaine humidité aux *Culicoides* très sensibles à la dessiccation et le papier aluminium sert à conserver cette humidité. Les pièges fonctionnent entre 19h et 6h. Le choix des sites de capture est fonction de la prédominance des espèces cibles pour réaliser les tests de sensibilité. Les *Culicoides* collectés sont ramenés vivants au laboratoire pour évaluer leur sensibilité à différentes matières actives insecticides.



Figure 10 : Piège OVI adapté pour capturer des *Culicoides* vivants (cliché : Moussa FALL 2013).

3.1.3. Evaluation de l'efficacité de l'écran imprégné Zerofly® sur les *Culicoides*

Les pièges OVI sont aussi utilisés dans l'évaluation de l'efficacité de l'écran imprégné Zerofly®, produit par Vestergaard (<http://www.vestergaard.com/zerofly-livestock>) pour un contrôle effectif des mouches piqueuses et nuisantes comme les glossines et autres mouches d'étable causant des maladies ou perturbant le bétail (bovins, vaches laitières et veaux, porcs). L'écran imprégné Zerofly® consiste en un tulle moustiquaire de maille 1,5x1,5 mm imprégnée en usine de Deltaméthrine (pyréthrinoloïde) à 0,4% de matière active (avec une pureté du produit >98%) et composée de 1,05% de stabilisant aux UV et 98,55% de fibre de tissu de polyéthylène avec une durée de vie de deux ans. Le tissu à larges mailles du piège OVI est remplacé par le tulle moustiquaire Zerofly® à tester. Les *Culicoides* sont collectés dans une cage identique à celle utilisée pour capturer des *Culicoides* vivants (Figure 10). Deux pièges traités contre un témoin ont été utilisés sur trois sites avec une rotation toutes les nuits avec trois sessions de capture par semaine pendant un mois.

3.2. Les pièges à appât animal

Le piège à appât cheval est identique à celui utilisé par Fall *et al.* (2011; 2013) pour des études entomologiques sur les moustiques vecteurs de la fièvre West Nile (Figure 11). Le piège à appât cheval est essentiellement utilisé pour identifier les espèces qui viennent au contact de l'hôte et par la même, celles pouvant être impliquées dans la transmission de la peste équine africaine. Ce piège, de confection locale, est une cage métallique de dimension 2,5m x 1,5m x 2m. Une moustiquaire (de maille 0,25mm x 0,05mm) de 3,5m x 2,5m x 2,5m

accrochée à des piquets recouvre la cage. La moustiquaire est suspendue à environ 15cm du sol pour laisser passer les insectes attirés par le cheval.



Figure 11 : Description du piège à appât cheval utilisé au cours de notre étude (cliché : Michel Ange DUSOM 2011)

Lors de la collecte, la moustiquaire est rabaisée jusqu'au sol et les échantillons sont collectés à l'aide d'un aspirateur à insecte fabriqué localement. Il s'agit d'un tube PVC de 10 cm de diamètre dans lequel est introduit un ventilateur (puissance 7,9 W) alimenté par une batterie électrique de 12 volts produisant un flux d'air suffisamment fort pour aspirer les insectes piégés tout en évitant de les endommager. Un pot collecteur à fond grillage très fin et à bouchon est adapté à l'extrémité de l'aspirateur pour contenir les insectes aspirés.

3.2.1. Identification des vecteurs potentiels de la peste équine africaine

Un seul piège à appât cheval a été utilisé par site au cours de l'étude du suivi de la dynamique saisonnière des *Culicoides*. Les animaux sont approvisionnés en aliment et en eau selon le régime alimentaire en vigueur dans l'écurie. Le piège est installé le soir et la récolte des insectes se fait tôt le matin (avant le lever du soleil) à l'aide d'un aspirateur électrique pendant 10 à 15 mn dans un pot de collecte à fond grillagé. Chaque pot est identifié par sa provenance (site d'étude) et la date de capture. Les échantillons vivants sont ramenés au laboratoire puis tués au froid (-20 C).

3.2.2. Etude du rythme nyctéméral de *Culicoides oxystoma*

Cette étude s'est déroulée près des étables d'expérimentation du Laboratoire National de l'Elevage et de Recherche Vétérinaire (LNERV) de l'Institut Sénégalais de Recherches

Agricoles (ISRA) de Hann où l'espèce *Culicoides oxystoma* (Kieffer) a été récoltée de manière abondante. Deux sessions de capture sur appât mouton de 24h espacées de 2 jours, ont été répétées tous les 3 mois aux différentes saisons climatiques. Les échantillons ont été recueillis toutes les 3 h pendant 10-15 mn sous la moustiquaire à l'aide d'un aspirateur. Ils sont ensuite tués au froid et traités le même jour avant d'être conservés dans de l'alcool à 90° dans un flacon labélisé (date et heure de collecte). La température et l'humidité sont relevées de manière continue pendant toutes les sessions par un enregistreur automatique (thermo-hygromètre HOB0; Onset, Pocasset, MA).

3.2.3. Etude des préférences trophiques et de l'activité nycthémérale des *Culicoides* vecteurs potentiels de la peste équine africaine et de la fièvre catarrhale ovine

L'étude des préférences trophiques et du rythme circadien des *Culicoides* vecteurs potentiels de la peste équine africaine et de la fièvre catarrhale ovine s'est déroulée dans le haras national de Thiès entre le 29 Août et le 28 Septembre 2013. Le choix de cette période est en rapport avec la période d'abondance maximale des *Culicoides* sur le site et celui de la zone d'étude par la présence conjointe de *C. imicola* et *C. oxystoma*. Il s'agit d'une comparaison de 2 hôtes en rotation sur 2 sites. Un cheval et deux moutons ont été utilisés au cours de cette étude. Le cheval est une pouliche demi-sang anglais d'environ un an pesant entre 110 à 120 kg et les moutons, deux brebis de 25 à 30 kg chacune, de race locale. Trois sessions de capture ont été réalisées. Elles consistaient à réaliser 2 jours de piégeage (2 fois 24 heures consécutives) séparés d'une pause de 3 heures, pour permettre la rotation des animaux et le respect des mêmes plages horaires pour toutes les captures. Les collectes d'insectes dans les pièges ont été réalisées toutes les 3 h pendant 10 à 15 minutes à l'aide d'un aspirateur électrique.

3.2.4. Efficacité d'une formulation insecticide Pour-On *Cyperclor Plus*® sur les *Culicoides*

Cette expérience a été réalisée en station au LNERV/ISRA de Hann de Septembre à Novembre (période favorable à *C. oxystoma* et *C. imicola*). Deux pièges à appât moutons ont été utilisés : un piège contrôle (non traité) et un piège expérimental où le mouton a été traité avec 2,5ml de *Cyperclor Plus*®. L'animal traité est séparé du non traité durant toute la durée de l'expérience. La formulation insecticide Pour-On *Cyperclor Plus*® de la société Ceva est indiquée pour le contrôle et le traitement des infestations causées par les ectoparasites des bovins et des porcs. C'est un produit à utilisation topique contenant 50 g/l de Cyperméthrine

(pyréthrinoïde), 70 g/l de Chlorpyrifos (organophosphoré), 50 g/l de butoxyde de pipéronyle (synergiste d'insecticides par blocage du métabolisme de détoxification des insectes) et 5 g/l de citronnelle (huile essentielle de type monoterpénoïde). Cette formulation insecticide à usage topique est appliquée sur la ligne du dos de l'animal à partir du cou jusqu'à la queue. Les deux pièges à appât ont été installés le soir à 17h 30 et séparés de plus de 10m. Les *Culicoides* sont récoltés le matin à 7h 30 à l'aide d'un aspirateur électrique pendant 10 - 15mn. Trois sessions de capture (J1 - J3, J8- J10, J15- J18) ont été réalisées après traitement avec permutation des animaux.

4. Traitement des échantillons récoltés

Les captures sont ramenées au laboratoire pour traitement. Le matériel entomologique de laboratoire est composé de pinces fines (Dumont N°5), de pipettes, d'alcool 90°, de boîtes de pétri, de tubes Eppendorf, de lames et lamelles, de baume du Canada, d'une loupe binoculaire (ZEISS) et d'un microscope (MOTIC).

4.1. Identification des *Culicoides*

L'identification des *Culicoides* repose essentiellement sur des critères morphologiques. Toutefois, nous avons fait appel à la biologie moléculaire pour clarifier le statut des espèces appartenant au groupe Schultzei à la suite de difficultés rencontrées dans leur identification morphologique.

4.1.1. Identification morphologique des *Culicoides*

Les échantillons ramenés au laboratoire sont pré-triés puis identifiés (Figure 12). Le pré-tri consiste à séparer les *Culicoides* des autres insectes suivant les critères de diagnoses du genre. L'identification morphologique des différentes espèces de *Culicoides* est basée sur l'examen à la loupe binoculaire, à un faible grossissement, des dessins alaires. Les espèces difficilement identifiables sont disséquées et montées entre lame et lamelle suivant la technique de Wirth et Marston (1968). Plusieurs clés d'identification ont été utilisées en fonction des espèces rencontrées et de leur appartenance sub-générique ou de groupe (Cornet & Chateau, 1970; Cornet *et al.*, 1974; Boorman, 1979; Boorman & Dipeolu, 1979; Meiswinkel, 1989; Glick, 1990; Meiswinkel, 1991; Cornet & Brunhes, 1994).

Pour les espèces du groupe Schultzei, nous avons rencontré plusieurs spécimens qui ne correspondaient à aucune description d'espèce Afro-tropicale. Ainsi, des groupes d'individus

morphologiquement semblables ont été définis à l'aide de clés d'identification de référence et de la description des espèces du groupe (Boorman, 1989; Cornet & Brunhes, 1994). Un individu de chaque variant phénotypique a été disséqué puis les organes porteurs des caractères diagnostiques (ailes et tête) montés entre lame et lamelle dans du baume de Canada et photographiés à l'aide d'un microscope (Motic Digital Microscope/DMB Series) et le reste du spécimen (thorax et abdomen) est utilisé pour la biologie moléculaire.

Tous les *Culicoides* identifiés sont dénombrés suivant l'espèce, le sexe et l'état de réplétion des femelles, et sont conservés dans de l'alcool 90p. Les échantillons avec plus de 3ml d'insectes sont sous-échantillonnés selon une procédure modifiée issue de Van Ark et Meiswinkel (1992).

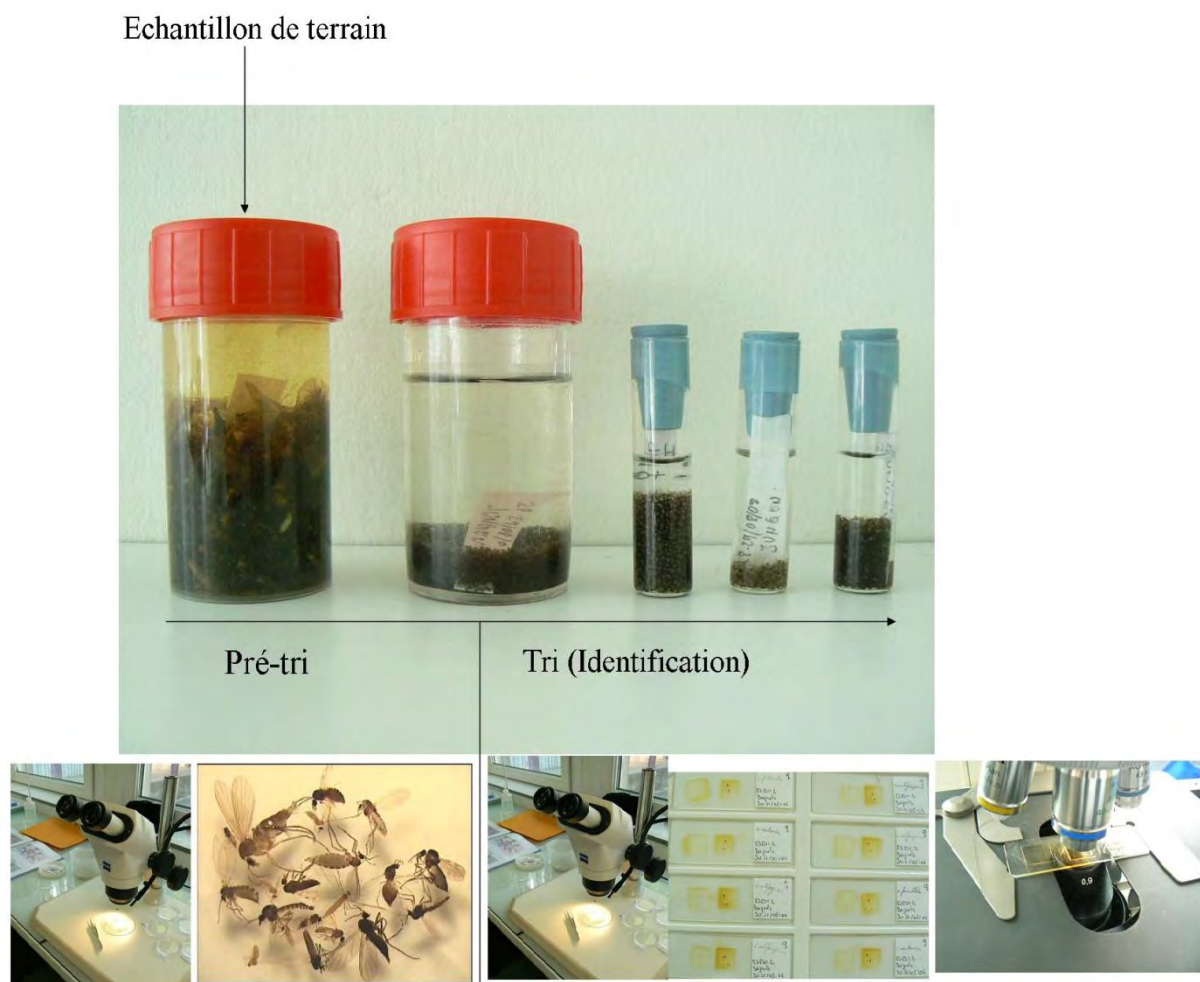


Figure 12 : Les différentes étapes de l'identification des *Culicoides* : le pré-tri consiste à séparer les *Culicoides* des autres insectes et le tri consiste à identifier les *Culicoides* à l'espèce et dans certains cas fait appel au montage entre lame et lamelle (Xavier ALLENE).

4.1.2. Identification moléculaire des *Culicoides*

Nous avons fait appel à la biologie moléculaire à cause des énormes difficultés rencontrées sur l'identification de certaines espèces de *Culicoides*, particulièrement celles appartenant au groupe Schultzei avec la présence de nombreuses variations phénotypiques.

4.1.2.1. Identification des *Culicoides* du groupe Schultzei

3.1.2.1.1. Extraction de l'ADN des *Culicoides* de chaque morpho-groupe

Pour chaque morpho-groupe, l'ADN génomique de 1 à 5 individus (selon leur présence dans les 5 sites) a été extrait individuellement en suivant un protocole d'extraction avec de la résine de Chelex 5% (la résine Chelex100®, *Chelating Ion Exchange Resin*, en solution piège les ions inhibiteurs de PCR et les débris d'insecte). Un volume de 500µl de solution de Chelex à 5%, sous agitation, a été distribué dans chaque tube Eppendorff de 1,5ml. Chaque individu a été enlevé de l'alcool 90p puis séché sur du papier buvard. Avec un cure-dent stérile, l'individu a été récupéré et mis dans un tube Eppendorff avec la solution de Chelex 5% puis broyé à l'aide d'un piston. Les tubes Eppendorff sont ensuite chauffés au bain-marie à 56°C pendant 60 minutes puis à 95°C pendant 30 minutes (pour la lyse thermique). Tout de suite après le chauffage, les tubes Eppendorff sont centrifugés à 13 000 tours/minute pendant 1 minute afin de culotter la résine de Chelex avec les ions inhibiteurs de PCR et les débris cellulaires de *Culicoides*. Les tubes Eppendorff avec le code de l'individu sont ensuite conservés à -20pC durant toute l'expérimentation.

3.1.2.1.2. Choix des marqueurs moléculaires

En l'absence du séquençage du génome complet pour le genre *Culicoides*, la sélection des marqueurs moléculaires a été effectuée en considérant les marqueurs moléculaires préalablement utilisés dans la littérature (COI, ITS1, ITS2) (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2006; Schwenkenbecher *et al.*, 2008). Pour répondre aux objectifs de l'étude, les régions COI (Cytochrome Oxidase I, ADN mitochondrial) et ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2, ADN ribosomal) ont été sélectionnées pour être amplifiées puis séquencées.

3.1.2.1.3. Amplification par PCR et séquençage des régions COI et ITS 2

Les réactions d'amplification par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sont réalisées dans 25µl de volume réactionnel : avec 5µl de tampon 5X ; 0,5µl de dNTPs (10mM) ; 2µl de MgCl₂ (25mM) ; 0,5µl de chaque amorce (10µM) (Tableau II) ; 0,5µl de *Taq polymérase* (5U/µl) ;

15µl d'eau stérile et 1µl d'ADN (surnageant Chelex). Une amplification par PCR en *touch-up* (augmentation de la température d'hybridation au cours des cycles) a été utilisée afin de réduire les amplifications non spécifiques et d'optimiser la qualité d'amplification pour un meilleur séquençage. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 1% (dépôt de 4µl de produit de PCR et 2µl de bleu de charge) avec une coloration au *GelRed* après une migration de 90 minutes à 100 Volts par électrophorèse, avant d'être envoyés à *Cogenics* (Montpellier, France) pour le séquençage.

Tableau II : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'identification des *Culicoides* du groupe *Schultzei*

Gène	Primers	Séquence (5'→3')
CO I	C1J1718 (Forward)	GGA-GGA-TTT-GGA-AAT-TGA-TTA-GT
	C1N2191 (Reverse)	CAG-GTA-AAA-TTA-AAA-TAT-AAA-CTT-CTG-G
ITS 2	5.8S (Forward)	GAT-GAA-GAC-CGC-AGC-AAA-CT
	28S (Reverse)	ATT-TGG-GGG-TAG-TCA-CAC-AT

4.2. Identification du repas de sang des *Culicoides*

L'outil moléculaire a également été utilisé pour l'identification des repas sanguins des femelles récoltées gorgées dans le piège OVI.

4.2.1. Analyse des repas de sang par biologie moléculaire

L'ADN génomique a été extrait à l'aide de kits commerciaux (Macherey- Nagel, Allemagne) à partir de chaque abdomen des femelles gorgées de *Culicoides* identifiées dans 200 µl de tampon PBS à 1 X. Les amorces des hôtes potentiels ont été sélectionnées comme décrit dans la littérature (Kocher *et al.*, 1989; Garros *et al.*, 2011) pour identifier l'origine des repas de sang des femelles *Culicoides* récoltées gorgées. Cette identification a été basée sur l'amplification de la région de cytochrome b de l'ADN du sang tel que décrit par Garros et al. (2011).

4.2.2. Recensement et localisation des hôtes potentiels (par enquête zootechnique)

Des enquêtes zootechniques ont été réalisées dans le cadre du projet dans chaque site d'étude sur un rayon de 2 000 m autour du site de piégeage (Tableau III). Le choix de cette distance est en rapport avec la dispersion active des *Culicoides* (Lillie *et al.*, 1981; Kettle, 1984; Sanders & Carpenter, 2014). La localisation des hôtes a été géoréférencée au cours de chaque

session d'enquête et la densité des hôtes par espèces (bovins, caprins, chevaux, moutons et autres vertébrés) ont été calculées sur quatre anneaux concentriques à des distances de 200, 500, 1 000 et 2 000 m autour du site de piégeage (logiciel MapInfo). Cette méthode a été récemment utilisée pour étudier l'impact de la composition du paysage sur la densité de la punaise *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae), un organisme ravageur du cotonnier en Californie (Sivakoff *et al.*, 2013).

Tableau III : Diversité des hôtes vertébrés sur un rayon de 2km autour de chaque site de piégeage

Site	Latitude	Longitude	Hôtes Vertébrés	Période d'investigation
Parc Hann	14.7283	-17.4298	2 bovins, 275 moutons, 8 chèvres, 80 chevaux, 313 volailles, 4 chiens, 11 lions, 1 tigre, 3 hyènes, 5 chacals, 6 antilopes, 21 crocodiles, 9 tortues, 7 pythons et 2 pumas.	26 et 30 Avril 2012
Mbao	14.7467	-17.3327	9 bovins, 207 moutons, 7 chèvres, 38 chevaux, 566 volailles, 1 chien et 8 lapins.	17 et 18 Mai 2012
Niague	14.8234	-17.2499	426 bovins, 86 moutons, 320 chèvres, 117 chevaux, 13059 volailles, 12 chiens et 9 lapins.	17, 18 et 19 Juillet 2012
Thiès	14.794	-16.95	41 bovins, 142 moutons, 75 chèvres, 24 chevaux, 314 volailles, 7 chiens et 22 lapins.	20 et 21 Mai 2012

4.3. Test de sensibilité aux matières actives insecticides

Le test de sensibilité aux matières actives insecticides a été réalisé à l'aide de la méthode en tube standardisée OMS (WHO, 1981). Cette méthode a pour but d'évaluer et de suivre sur des moustiques adultes le niveau de sensibilité (ou de résistance) à une matière active insecticide. Ce dispositif permet également de comparer l'efficacité de différents insecticides vis-à-vis d'une espèce donnée ou la sensibilité de plusieurs espèces de moustiques – ou de différentes populations de la même espèce de moustiques vis-à-vis d'un insecticide donné. Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures et, s'il s'agit d'un pyréthrinoloïde en termes de mortalité après 24h et d'effet Knock Down (effet KD) au cours de la première heure d'exposition. Ce test initialement développé pour les moustiques a été adapté aux *Culicoides* afin de mesurer leur niveau de sensibilité aux matières actives insecticides (Venail *et al.*, 2011).

4.3.1. Protocole du test de sensibilité aux insecticides

4.3.2. Description du dispositif

Le test en tube est composé d'un tube d'observation et d'un tube d'exposition (les deux tubes sont amovibles) séparés par un tiroir muni d'une trappe permettant d'obstruer ou de rétablir le passage entre les deux tubes. L'autre extrémité de chaque tube est fermée par un bouchon d'aération muni d'un tamis grillagé. Chaque tube est tapissé, pour les besoins du test, de papier maintenu sur les bords par deux bagues métalliques. Le tube d'exposition reçoit du papier imprégné d'insecticide (face imprégnée à l'intérieur) tandis que le tube d'observation reçoit du papier neutre (imprégné de solvant sans insecticide). Nous avons utilisé une moustiquaire à maille fine au niveau de chaque extrémité du tube pour éviter que les *Culicoides* ne s'échappent à cause de leur petite taille (Figure 13).



Figure 13 : Protocole de test tube OMS adapté aux *Culicoides* (cliché : Assane Gueye FALL 2013).

4.3.2.1. Déroulement du test

Les tests de sensibilité ont été réalisés sur les espèces locales de *Culicoides* récoltées sur les sites d'étude et suspectées vectrices de PEA et de FCO. Seules les femelles nullipares, déterminées selon l'absence de pigmentation abdominale (Dyce, 1969), à jeun et collectées sur le terrain la veille du test sont utilisées pour ces essais. Des lots de trente femelles de *Culicoides* nullipares de la même espèce sont distribués dans les tubes d'exposition pendant une heure avec une gamme de 4 à 5 concentrations insecticides utiles c.à.d. donnant une mortalité supérieure à 0% et inférieure à 100% plus une gamme témoin et 4 tubes par concentration. Chaque test complet est répliqué dans la mesure du possible 3 fois. Le test se déroule à une température contrôlée de 25° C et une humidité relative de 70±10%. Après l'heure d'exposition, les *Culicoides* sont transférés délicatement dans le tube d'observation à l'aide d'un aspirateur à bouche. Les tubes d'observation sont conservés en position verticale avec un coton imbibé de jus sucré à 10% pendant 24 heures et sont couverts d'une serviette humide. La mortalité à 24 heures est enregistrée. La mortalité a été calculée comme étant le

total de *Culicoides* morts de l'ensemble des répliques sur le total des exposés, exprimé en pourcentage. La mortalité des témoins est utilisée pour valider le test. Lorsque la mortalité des témoins est supérieure à 20% le test est annulé. Lorsqu'elle se situe entre 5% et 20%, la mortalité du test est corrigée en utilisant la méthode d'Abbott:

Mortalité corrigée = $100 \times \frac{(\% \text{ mortalité observé} - \% \text{ mortalité contrôle})}{(100 - \% \text{ mortalité contrôle})}$ (Abbott, 1925). Lorsque la mortalité des témoins est inférieure à 5%, aucune correction n'est effectuée.

4.3.2.2. Papiers imprégnés et matières actives insecticides

Les papiers utilisés dans cette étude ont été fournis par l'EID Méditerranée de Montpellier. Des pré-gammes de concentrations ont été d'abord testées pour définir les différentes gammes de concentrations à tester. Les tests ont porté sur trois matières actives insecticides : deux pyréthrinoïdes : la Deltaméthrine et la Permethrine et un organophosphoré : le Chlorpyrifos. La Permethrine et la Deltaméthrine ont été retenues comme les matières actives les plus représentatives et les plus couramment utilisées parmi la famille chimique des pyréthrinoïdes (la Permethrine représentant les pyréthrinoïdes du groupe I et la Deltaméthrine les pyréthrinoïdes du groupe II dit alpha-cyanés). Le Chlorpyrifos a été retenu comme la matière active représentant la famille chimique des Organophosphorés. En outre, la Deltaméthrine et le Chlorpyrifos sont les matières actives principales constituant les 2 formulations insecticides que nous avons prévu de tester sur nos populations locales de *Culicoides*, respectivement l'écran imprégné *Zerofly*® et l'application topique *Pour-On Cyperclor Plus*®. Aussi, il était important préalablement à ces essais de formulations insecticides de vérifier la sensibilité de base des populations locales de *Culicoides* vis-à-vis de ces matières actives.

Les matières actives d'une pureté supérieure à 98% ont été fournies par Pestanal® (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, London, UK). Les papiers imprégnés (papier filtre Whatman n° 1 de 90 g / m², 12 x 15 cm) ont été préparés par la même personne pour réduire les biais de manipulations possibles liés à l'imprégnation et pour améliorer la standardisation. Les papiers ont été imprégnés en utilisant un mélange acétone - silicone comme solvant (2 ml par papier, 67% d'acétone et 33% de silicone). Les papiers utilisés dans les tubes contrôles sont uniquement imprégnés avec le solvant. Comme recommandé par l'OMS, les papiers sont imprégnés juste avant la réalisation des tests, conservés dans de l'aluminium à 4°C et utilisés pour un maximum de 3 tests en deçà de 3 mois après leur date d'imprégnation.

5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R (R_Core_Team, 2014).

5.1. Analyses phylogénétiques et des distances génétiques

La qualité et la longueur des séquences ont été vérifiées par BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dans la base de données Genbank. Les séquences validées ont été alignées à partir de l'algorithme CLUSTALW dans BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999). La description des alignements a été faite avec DAMBE version 5.3.2 (Xia & Xie, 2001) et MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Les reconstructions phylogénétiques ont été effectuées en maximum de parcimonie (*maximum parsimony*, MP) et en maximum de vraisemblance (*maximum likelihood*, ML) avec MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). L'(les) arbre(s) phylogénétique(s) retenu(s) sous l'hypothèse du maximum de parcimonie est (sont) celui (ceux) qui requiert (requièrent) le plus petit nombre de changements évolutifs. Lorsque plusieurs arbres sont les plus parcimonieux, un arbre consensuel est alors retenu. Les indices de rétentions (*retention index*, RI) et de cohérence (*consistency index*, CI) pour les reconstructions en MP permettent de mesurer le taux d'homoplasie et ainsi d'évaluer la confiance que l'on peut avoir dans un arbre. La méthode de reconstruction en maximum de vraisemblance (*maximum likelihood*, ML) permet de tester différents modèles d'évolution et d'estimer la longueur des branches en fonction de changements évolutifs. Comparée à la reconstruction en maximum de parcimonie (*maximum parsimony*, MP), la méthode de reconstruction en maximum de vraisemblance est beaucoup plus robuste et moins sensible aux effets de l'attraction de longues branches. En revanche, c'est une méthode qui demande une grande puissance de calcul et qui nécessite le plus de temps. La démarche de reconstruction en ML consiste à rechercher la vraisemblance des données (alignement des séquences) sous différentes hypothèses évolutives d'un modèle évolutif donné et à retenir les hypothèses qui rendent cette vraisemblance maximale. Cette vraisemblance est exprimée par une valeur logarithmique de L ($\ln L$). Toutefois, la vraisemblance de l'arbre n'est pas la probabilité que l'arbre soit "vrai". La recherche du modèle de substitution nucléotidique pour la reconstruction en ML a été effectuée sous le programme *Find Best-Fit Substitution Model* (Tamura *et al.*, 2011), avec un choix du modèle le plus prédictif basé sur les scores de *Bayesian Information Criterion* (BIC). Les modèles avec les plus faibles scores de BIC sont considérés pour décrire le meilleur modèle de substitution et le modèle d'évolution retenu est Tamura92 (modèle d'évolution des séquences qui corrige de multiples erreurs, en tenant compte des différences de taux de transition et de

transversion, et du biais en [G+C]). Les taux d'évolution entre les sites sont modélisés en utilisant une distribution gamma de variation du taux de substitution entre les sites. La robustesse des nœuds internes des arbres obtenus en MP et ML a été testée par 100 ré-échantillonnages de type *bootstrap*. Les nœuds avec des valeurs de *bootstrap* en dessous de 50 ne sont pas considérés, entre 50 et 70 considérées comme faiblement soutenus, entre 70 et 90 considérés comme soutenus et au-dessus de 90 comme fortement soutenus. Les distances génétiques ont été calculées sous le modèle de Jukes-Cantor avec MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) et comparées avec le *barcoding gap* (nouvelle approche phylogénétique pour calculer la variation de la divergence intra- et interspécifiques). L'analyse des distances génétiques entre et au sein de taxa à partir des séquences de la région COI a été comparée au seuil de référence. Chez les diptères, il est accepté un seuil maximum au niveau intraspécifique de 2%, et un seuil minimum au niveau interspécifique de 10-12% qui permet d'évaluer la délimitation spécifique entre taxa. Des séquences de référence ont été téléchargées à partir de la base de données GenBank : BE1 (JN545045), BE2 (JN545046), BE3 (JN545047), BE4 (JN545048), BE5 (JN545049), *C. oxystoma* (AB360978), *C. oxystoma* (AB360979), *C. oxystoma* (AB360980), *C. oxystoma* (AB360981), *C. oxystoma* (AB360982), *C. oxystoma* (AB360983), *C. oxystoma* (AB360984), *C. oxystoma* (AB360985), *C. enderleini* (Ender_EQ2), *C. enderleini* (Ender_EQ3), NU1 (JN545050), NU2 (JN545051), NU3 (JN545052), NU4 (JN545053) et NU5 (JN545054) pour le gène Cytochrome Oxidase I et *C. oxystoma* (AB462279.1) pour le gène Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2). Les groupes externes ont été choisis dans la base de données GenBank parmi les *Culicoides* du sous-genre *Avaritia* (COI : *C. imicola* PICARD1_C1J1718 et PICARD2_C1J1718 ; *C. bolitinos* PICARD1_C1J1718 et PICARD2_C1J1718 ; ITS2 : *C. imicola* AF074019).

5.2. Analyse des données du suivi de la dynamique saisonnière des *Culicoides*

L'abondance mensuelle a été calculée par espèce de *Culicoides* en conservant le nombre maximum d'individus capturés pendant les trois nuits consécutives dans un piège donné. La fréquence de capture est le rapport du nombre de nuits de présence d'une espèce sur le total des nuits de capture par site. Le taux de gorgement d'une espèce est le rapport des femelles gorgées sur le total des femelles de cette espèce.

Les abondances mensuelles ont été comparées entre méthodes de capture à l'aide du test de corrélation de Pearson.

Les abondances mensuelles ont été cumulées sur l'année pour évaluer la diversité des espèces de *Culicoides* par piège et par site. Une analyse inter (site) et intra-classe (type de piège) a été

réalisée à partir d'une analyse en composante principale centrée des logarithmes népériens des pourcentages d'abondances cumulées par espèces, par site et par type de piège (Benzécri, 1983; Dolédec & Chessel, 1987). La diversité des espèces a été estimée avec les indices de Shannon et de Simpson-Yule.

5.3. Rythme nycthéméral de *Culicoides oxystoma*

L'abondance de *C. oxystoma* a été modélisée à l'aide d'un modèle linéaire généralisé bêta-binomial (Lawless, 1987). Nous avons utilisé la température, l'humidité, les heures de collecte et l'interaction de premier ordre entre le temps de collecte et la température. Le meilleur modèle a été choisi sur la base des critères d'informations Akaike (AICC), et l'importance des effets fixes a été testée en utilisant le test du rapport de vraisemblance (Hurvich & Tsai, 1995; Burnham & Anderson, 2002). Nous avons également vérifié que les modèles répondent aux données à l'aide d'un test de la Qualité d'Ajustement (Agresti, 1990).

5.4. Etude des préférences trophiques et de l'activité nycthémérale des vecteurs potentiels de la PE et de la FCO

Les abondances ont été comparées entre hôtes par espèces en utilisant les données brutes ou corrigées par le poids des hôtes. Les taux de gorgement sont calculés en divisant le nombre de femelles gorgées sur le total des femelles capturées. L'abondance des espèces de *Culicoides* a été modélisée à l'aide d'un modèle Poisson à effet mixte par la méthode d'approximation de Gauss-Hermite sur la log-vraisemblance. Nous avons utilisé la session (1 à 6) comme un effet aléatoire, et le site et l'hôte (cheval, mouton) comme des effets fixes. La sélection des effets du modèle d'abondance a été basée sur un test du rapport de vraisemblance, et la corrélation de Pearson a été utilisée comme un test global de qualité de l'ajustement.

5.5. Analyse des repas de sang

Pour étudier la sélection des hôtes vertébrés (équidé, ovine, bovine, caprine et autres vertébrés) par les *Culicoides*, nous avons effectué la corrélation (*Pearson's product-moment correlation*) entre les pourcentages de variations des hôtes vertébrés avec les repas de sang identifiés à partir des *Culicoides* et le pourcentage de ces mêmes hôtes sur chaque anneau autour du piège (200, 500, 1 000 et 2 000 m).

5.6. Tests de sensibilité aux matières actives insecticides

L'analyse classique dose-réponse a été effectuée suivant les recommandations de l'OMS (WHO, 2013). Les données ont été analysées par une analyse de régression des probits (Finney, 1947). Le logiciel PriProbit ver. 1.63 a été utilisé pour obtenir les valeurs de sensibilité (DL50 et DL90) et les courbes sigmoïdes des estimations dose-réponse de chaque matière active d'insecticide ont été tracées pour chaque espèce.

5.7. Efficacité de l'écran imprégné *Zerofly*®

Nous avons utilisé à chaque fois des modèles à effets mixtes avec le traitement en effet fixe et le site en effet aléatoire. Le modèle de Poisson a été utilisé pour mesurer les différences de densités alors que pour expliquer les taux de mortalité, le modèle binomial a été utilisé.

5.8. Efficacité du Pour-on *Cyperclor Plus*®

L'impact du traitement Pour-on a été étudié en utilisant des modèles linéaires mixtes. Le temps depuis le traitement et leurs interactions ont été utilisés comme effets fixes, et le site comme effet aléatoire. Le total des captures par piège et le taux de femelles gorgées ont été utilisés comme variable de réponse, à l'aide des modèles de Poisson et binomial respectivement.

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

1. Diversité taxonomique du genre *Culicoides* au Sénégal

1.1. Résultats

Les résultats de l'analyse phylogénétique des espèces du groupe *Schultzei* ont fait l'objet d'une publication (Annexe 1). Nous avons utilisé 85 séquences pour la reconstruction phylogénétique (63 séquences obtenues de nos échantillons, 20 séquences extraites de Genbank appartenant à des individus du groupe *Schultzei* et 2 séquences de *C. imicola* utilisées comme out group). Le séquençage du gène COI de *C. schultzei* a échoué. Quatre individus de chaque forme de *C. kingi* ont été séquencés avec succès : 4 de la forme Kenya (KF682484-KF682485, KF682491-KF682492); et 4 de la forme Sénégal (KF682487, KF682489-KF682490, KF682494) tous collectés dans la région des Niayes au Sénégal. Le maximum de vraisemblance et les arbres Bayesiens représentent la même topologie. Six lignées phylogénétiques distinctes ont été clairement différenciées (Figure 14). Un clade regroupe les individus affiliés à l'espèce *C. kingi*, incluant à la fois les formes Sénégal et Kenya, et les trois séquences non identifiées en provenance de spécimens collectés en Israël (JN545050-51, JN545053). Un autre clade inclut tous les spécimens de *C. enderleini* de différentes origines. Les spécimens de *C. oxystoma* forment deux clades distincts, l'un comprenant tous les échantillons des régions Paléarctique (Israël, Japon) et Australasienne (Australie) et l'autre, tous les individus du Sénégal (région Afro-tropicale). La distance génétique moyenne entre ces deux clades est deux fois plus élevée que la moyenne des variations à l'intérieur d'un clade. Les spécimens du Sénégal sont identifiés comme *C. oxystoma*, et toutes les variations phénotypiques observées (Figure 15) se retrouvent dans un même clade.

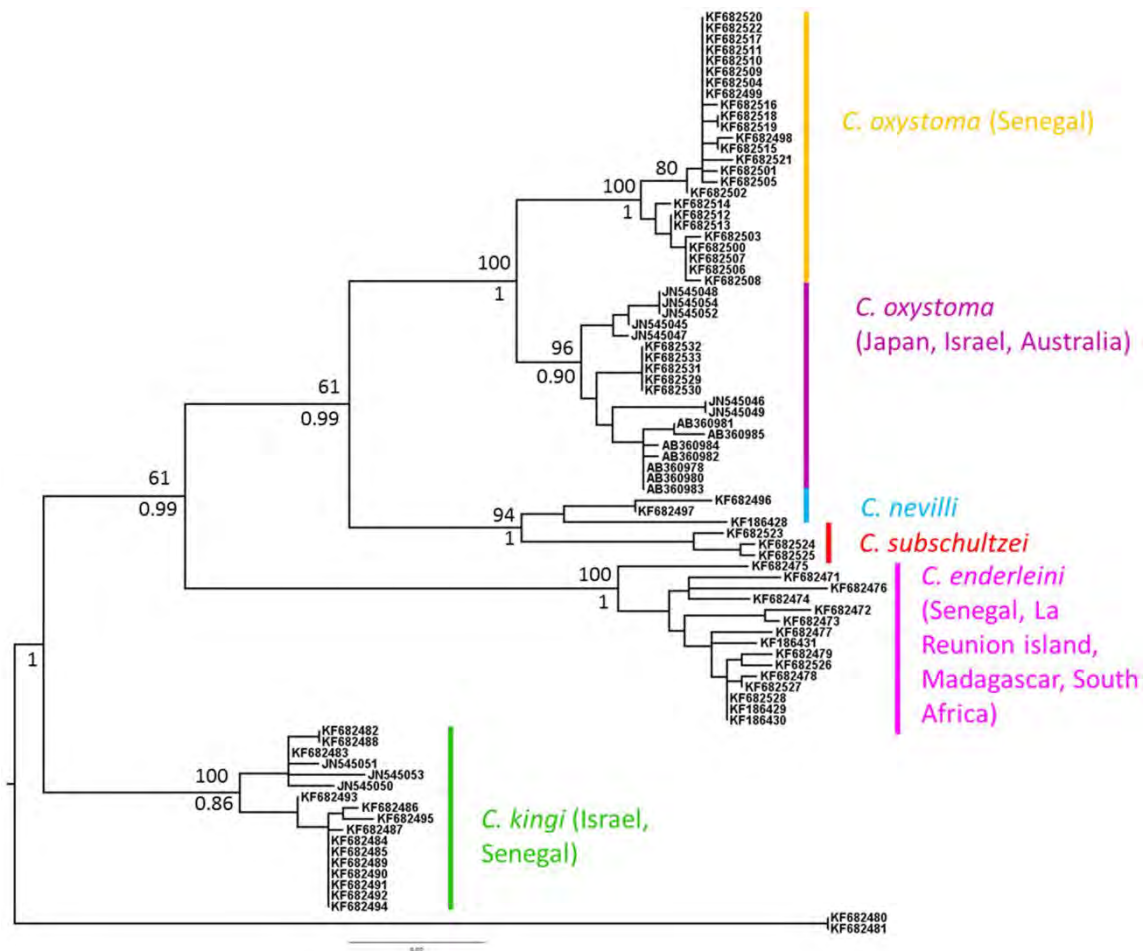


Figure 14 : Analyse phylogénétique des espèces du groupe Schultzei en utilisant les données de séquences du gène COI.

Cette analyse moléculaire a permis de confirmer l'examen morphologique de 82 506 spécimens provenant des 5 sites d'étude des Niayes et d'y révéler la présence de quatre espèces appartenant au groupe Schultzei (Figure 16). Ces espèces sont donc : *Culicoides kingi* (Austen), avec les deux formes Kenya (forme type) (Figure 15A) et Sénégal de Cornet et Brunhes (Figure 15B) (variant), *C. oxystoma* (avec de larges variations phénotypiques) (Figure 15), *C. enderleini* et *Culicoides nevillei* (Cornet et Brunhes). A noter que *C. nevillei* n'est présent que sur trois sites d'étude, alors que les trois autres espèces sont présentes et abondantes sur les cinq sites échantillonnés. *Culicoides kingi* sensu stricto a été décrit avec deux taches dans la cellule cubitale et une plus grande extension des taches claires correspondant à la forme Kenya.

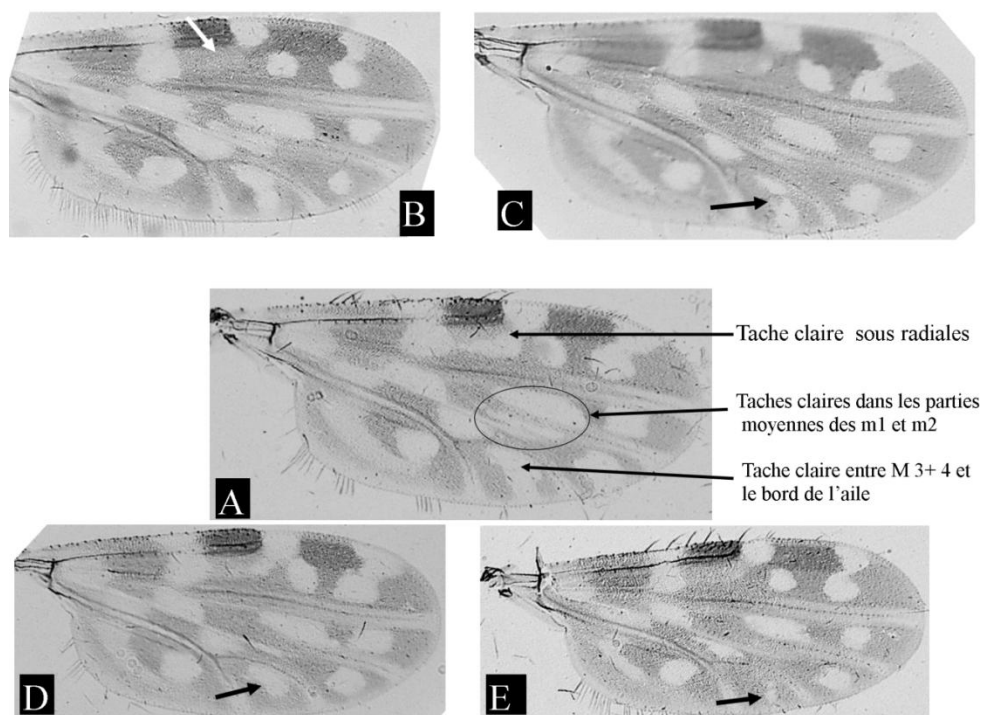


Figure 15 : Variation phénotypique de *C. oxystoma* au Sénégal. A = forme typique ; B, C, D, E = variants (cliché : Moussa FALL 2012).

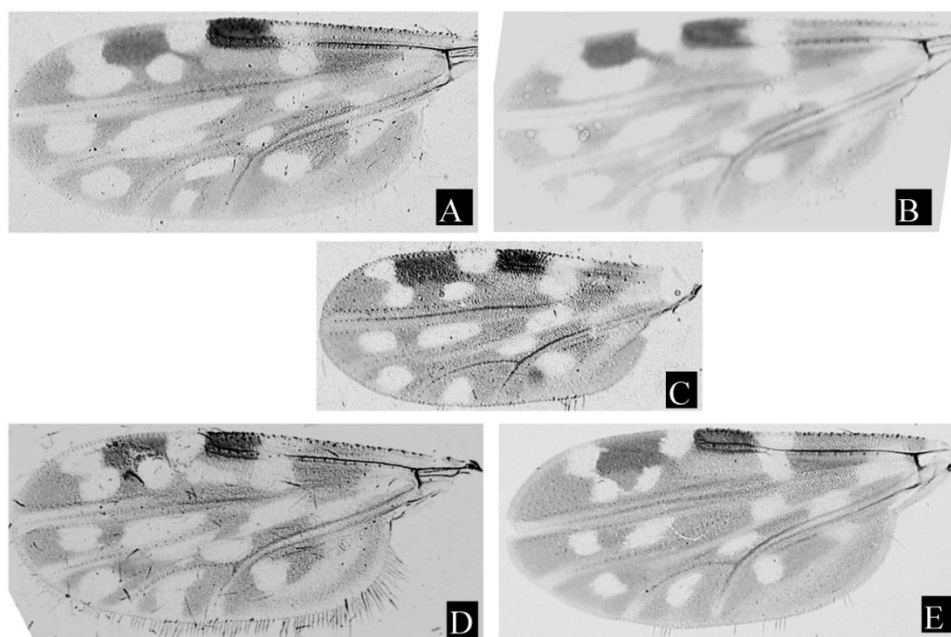


Figure 16 : Diversité taxonomique du groupe Schultzei au Sénégal. *C. kingi* (A= forme Kenya ; B= forme Sénégal) ; C) *C. nevilli* ; D) *C. oxystoma* et E) *C. enderleini* (cliché : Moussa FALL 2012).

De plus, au cours du suivi de la dynamique saisonnière des *Culicoides* dans les cinq sites d'étude de la zone des Niayes, un total d'au moins 41 espèces a été identifié, dont 19 espèces nouvelles pour la faune de *Culicoides* du Sénégal portant la liste des *Culicoides* du Sénégal à 53 espèces (Tableau IV).

Tableau IV : Nouvelle liste des espèces de *Culicoides* au Sénégal. Cette mise à jour est faite à partir des espèces capturées dans un suivi entomologique réalisé de juillet 2011 à juin 2012 dans la zone des Niayes.

Espèces signalées et non retrouvées	Espèces signalées et retrouvées	Espèces nouvellement identifiées
<i>C. africanus</i> Clastrier	<i>C. accraensis</i> Carter, Ingram et Macfie	<i>C. austeni</i> Carter, Ingram et Macfie
<i>C. camicasi</i> Cornet et Château	<i>C. clarkei</i> Carter, Ingram et Macfie	<i>C. azerbaijdzhanicus</i> Dzharfarov
<i>C. chateaui</i> Cornet	<i>C. congolensis</i> Clastrier	<i>C. bolitinos</i> Meiswinkel
<i>C. dasyops</i> Clastrier	<i>C. dekeyseri</i> Clastrier	<i>C. hortensis</i> Khamala et Kettle
<i>C. dutoiti</i> de Meillon	<i>C. dispar</i> Clastrier	<i>C. leucostictus</i> Kieffer
<i>C. grahamii</i> Austen	<i>C. distinctipennis</i> Austen	<i>C. milnei</i> Austen
<i>C. kobae</i> Cornet et Château	<i>C. enderleini</i> Cornet et Brunhes	<i>C. miombo</i> Meiswinkel
<i>C. krameri</i> Clastrier	<i>C. expectator</i> Clastrier	<i>C. murphyi</i> Clastrier et Wirth
<i>C. micheli</i> Cornet et Château	<i>C. fulvithorax</i> Austen	<i>C. nigripennis</i> Carter, Ingram et Macfie
<i>C. moucheti</i> Cornet et Kremer	<i>C. gambiae</i> Clastrier et Wirth	<i>C. oxystoma</i> Kieffer
<i>C. peretti</i> Cornet et Château	<i>C. imicola</i> Kieffer	<i>C. pretoriensis</i> Kremer et Nevill
<i>C. saboyae</i> Cornet	<i>C. kingi</i> Austen	<i>C. punctithorax</i> Carter, Ingram et Macfie
	<i>C. moreli</i> Clastrier	<i>C. quinquelineatus</i> Goetghebuer
	<i>C. neavei</i> Austen	<i>C. sellersi</i> Boorman et Dipeolu
	<i>C. nevilli</i> Cornet and Brunhes	<i>C. translucens</i> Khamala et Kettle
	<i>C. nivosus</i> de Meillon	<i>C. trifasciellus</i> Goetghebuer
	<i>C. pseudopallidipennis</i> Clastrier	<i>C. vomensis</i> Boorman et Dipeolu
	<i>C. pycnostictus</i> Ingram et Macfie	<i>C. wansoni</i> Goetghebuer
	<i>C. ravus</i> de Meillon	<i>C. yankari</i> Boorman et Dipeolu
	<i>C. robini</i> Cornet	
	<i>C. similis</i> Carter, Ingram et Macfie	
	<i>C. vicinus</i> Clastrier	

1.2. Discussion

Le genre *Culicoides* est caractérisé par une large diversité taxonomique. Le genre renferme plus de 1 300 espèces valides (Borkent, 2014). La revue de la littérature indique 34 espèces présentes au Sénégal, un nombre qui est loin de refléter la réalité. L'étude des *Culicoides* est particulièrement rendue difficile par des travaux parcellaires et par conséquent des clés d'identification régionales et datées. Ces difficultés sont accentuées par les nombreuses mises en synonymies et descriptions d'espèces nouvelles. Au cours de notre étude, nous n'avons pas

échappé à ces difficultés. Tout au début de nos travaux, nous avons rencontré des problèmes dans l'identification des espèces du genre *Culicoides* et surtout celles du groupe Schultzei. *Culicoides schultzei* est un des taxa le plus souvent cité dans la littérature relative à la taxonomie des *Culicoides*. C'est une espèce qui présente de grandes variations phénotypiques et qui est considérée par certains auteurs comme une espèce unique, alors que d'autres auteurs estiment qu'il existe plusieurs espèces voisines et ont donc créé de nouveaux noms pour certains morphotypes (Cornet & Brunhes, 1994). Beaucoup de confusions existent dans la littérature entre *C. oxystoma*, *C. schultzei* et *Culicoides subschultzei* (Cornet et Brunhes) (Boorman, 1989; Cornet & Brunhes, 1994; Morag *et al.*, 2012). Ainsi, Boorman (1989) suggéra de se référer à *C. oxystoma* pour la plupart des mentions de *C. schultzei* ou de groupe Schultzei en région Paléarctique et Orientale. Cornet et Brunhes (1994) ont rassemblé et étudié plus de 2 000 spécimens en provenance de diverses zones de la région Afro-tropicale afin de clarifier cet imbroglio taxonomique dans lequel se trouvent les espèces du groupe Schultzei. Ces travaux ont abouti à l'identification de six espèces en région Afro-tropicale ainsi qu'à l'élaboration d'une clé dichotomique.

Les espèces identifiées comme *C. subschultzei* à l'aide de cette clé présentent une tache claire sous les radiales, caractère typique de *C. kingi* (Delécolle, communication personnelle). La présence de la tache claire sous les radiales n'a pas été prise en compte par la clé de Cornet et Brunhes (1994). Ces espèces sont par la suite appelées des *kingi* atypiques. La revue de la littérature portant sur la description des autres espèces du groupe telles que *C. oxystoma* et *Culicoides neoschultzei* (Boorman et Meiswinkel), nous a permis d'attribuer les *C. kingi* atypiques comme étant *C. oxystoma* correspondant avec la forme décrite par Arnaud (1956) (deux taches dans la cellule cubitale) et celle de Boorman (1989) (une tache dans la cellule cubitale entre la nervure M_{3+4} et le bord de l'aile) ainsi que d'autres variations phénotypiques. Cette identification morphologique de *C. oxystoma* au Sénégal ne correspond pas à la distribution géographique des espèces du groupe en région Afro-tropicale (Boorman, 1989; Cornet & Brunhes, 1994). En effet, seules les espèces *C. schultzei*, *C. kingi*, *Culicoides rhizophorensis* (Khamala et Kettle), *C. enderleini*, *C. nevilli*, *C. subschultzei* et *C. neoschultzei* sont connues dans la région Afro-tropicale, alors que *C. oxystoma* n'est reconnue présente que dans les régions Paléarctique, Orientale et Australasienne (Boorman, 1989; Cornet & Brunhes, 1994). En raison de l'importance épidémiologique du groupe Schultzei et de la prédominance d'espèces de ce groupe dans nos captures, aussi bien sur

piège lumineux que sur piège à appât, nous avons fait appel à la biologie moléculaire afin de statuer sur l'identité taxonomique de ces spécimens.

Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier trois spécimens jusque-là indéterminés (JN545050-51, JN545053) collectés par Morag et al. (2012) en Israël comme étant l'espèce *C. kingi*, ce qui confirme la présence de cette espèce dans ce pays. Cette étude a également confirmé que les formes Kenya et Sénégal de *C. kingi* décrites par Cornet et Brunhes (1994) et qu'ils différenciaient de par leur écologie larvaire mais également par certains critères phénotypiques à l'état adulte, ne sont pas en fait des espèces distinctes.

La similitude génétique entre les échantillons paléarctiques (Israël, Japon) et australiens de *C. oxystoma* et ceux du Sénégal confirme l'identité de cette espèce et permet l'identification première de *C. oxystoma* au Sénégal et par conséquent en région Afro-tropicale. *Culicoides oxystoma* est une espèce très répandue avec une aire de distribution couvrant trois Écozones (régions Paléarctique, Orientale et Australasienne) et qui présente plusieurs variations phénotypiques. Les échantillons du Sénégal, se trouvant dans un clade distinct et présentant de nombreuses variations phénotypiques (Figure 15), appartiennent à la même espèce. L'existence de deux clades (l'un en région Afro-tropicale et l'autre en régions Paléarctique, Orientale et Australasienne) suggère l'existence de deux lignées au sein de *C. oxystoma* indiquant un certain niveau d'isolement reproductif dans cette espèce. Cette variation génétique entre les populations du Sénégal d'une part et Paléarctique et Australasienne d'autre part justifie la nécessité de faire des explorations plus poussées de la morphotaxonomie de cette espèce. Cette hypothèse serait en accord avec les soupçons de Boorman (1989) sur une possible différenciation au sein de *C. oxystoma*, et par conséquent d'une lignée Afro-tropicale et d'une lignée paléarctique, orientale et australasienne. Malgré la similarité morphologique entre *C. oxystoma* et *C. subschultzei*, l'analyse COI indique que ces deux espèces sont distinctes avec *C. subschultzei* étant plus proche génétiquement de *C. nevilli* que de *C. oxystoma*. Les tentatives d'amplification d'ADN à partir des échantillons de *C. schultzei* d'Afrique du Sud ont échoué, probablement parce que l'ADN des individus était dégradé (spécimens collectés en 1996). Ainsi, d'autres recherches doivent être mises en œuvre, sur l'espèce *C. schultzei*, mais aussi sur d'autres espèces membres du groupe Schultzei comme *C. rhizophorensis* et *C. neoschultzei* afin de clarifier leur statut taxonomique au sein de ce groupe.

L'inventaire faunistique réalisé dans une région géographique relativement limitée au sud de la zone des Niayes a permis d'actualiser la liste des *Culicoides* du Sénégal à 53 espèces et

surtout de mettre en évidence la présence et la forte abondance de *C. oxystoma*, espèce dont la distribution se limitait préalablement aux régions Paléarctique, Orientale et Australasienne (Boorman, 1979; Wirth & Hubert, 1989). Au Sénégal, au moins 4 espèces font désormais partie du groupe Schultzei : *C. enderleini*, *C. kingi*, *C. nevillei*, et *C. oxystoma*. D'autres espèces appartenant au groupe Imicola comme *C. bolitinos* et *Culicoides miombo* (Meiswinkel) et au groupe Milnei comme *Culicoides austeni* (Carter, Ingram et Macfie), *Culicoides hortensis* (Khamala et Kettle), *C. milnei*, *Culicoides quinquelineatus* (Goetghebuer) et *Culicoides wansoni* (Goetghebuer) ont été aussi mises en évidence pour la première fois au Sénégal. Aussi, cet inventaire faunistique a permis de retrouver le mâle jusque-là inconnu de *Culicoides yankari* (Boorman et Dipeolu). Douze autres espèces préalablement recensées au Sénégal n'ont pas été retrouvées dans cette étude : elles avaient été capturées préalablement dans d'autres régions bioclimatiques du pays (Cornet, 1969; Cornet & Chateau, 1970).

2. Bio-écologie des *Culicoides* potentiels vecteurs de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine au Sénégal

2.1. Résultats

2.1.1. Diversité des *Culicoides* et étude du contact *Culicoides*-Cheval dans cinq sites de la zone des Niayes

Les données du suivi temporel réalisé dans 5 sites d'étude de la zone des Niayes ont été valorisées par la publication de 2 articles scientifiques (cf. annexe 2 et 3). Au total, 254 338 spécimens du genre *Culicoides* dont 209 543 femelles (82,4%) et 44 795 mâles (17,6%) ont été collectés et identifiés par les deux méthodes d'échantillonnage (pièges lumineux et piège à appât cheval) sur les 515 nuit-pièges réalisées (Tableau V). Les principales espèces capturées étaient *C. oxystoma* (41,4% du total des captures), *C. kingi* (39,0%), *C. imicola* (10,0%), *C. enderleini* (3,9%) et *C. nivosus* (1,4%). Cette co-dominance de *C. oxystoma* et *C. kingi* est illustrée par des indices de Shannon de 1,39 (valeur maximale de 3,7) et de Simpson-Yule de 0,34.

Un total de 23 669 spécimens a été capturé dans le piège à appât cheval (9,3% du total des captures) contre un total de 230 669 spécimens dans les pièges lumineux (représentant 90,7% du total des captures). Seules 19 des 41 espèces recensées par le piège lumineux se retrouvent dans le piège à appât cheval. Aucune espèce n'a été exclusivement retrouvée dans le piège à appât cheval.

Culicoides oxystoma a été l'espèce dominante sur cheval (22 302 spécimens, 94,22% du total des captures). Les trois espèces les plus abondantes, *C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. kingi*, ont représenté 98,18% des collectes (23 239 spécimens) et les huit plus abondantes, qui regroupent *C. enderleini* et *C. bolitinos*, 99,5% des collectes.

Tableau V : Abondance mensuelle maximale cumulée [nombre de *Culicoides* (pourcentage)] sur l'année par type de piégeage (OVI : pièges lumineux; PA : pièges à appât cheval) et par site.

	Parc hann		Mbao		Niague		Pout		Thiès		Total	Rang
	OVI	PA	OVI	PA	OVI	PA	OVI	PA	OVI	PA		
<i>C. oxystoma</i>	5 414 (66,65)	199 (75,95)	22 888 (69,94)	9 290 (97,37)	1 381 (3,11)	8 (2,33)	1 476 (49,27)	12 (35,29)	910 (38,91)	373 (65,10)	41 951 (41,39)	1
<i>C. kingi</i>	128 (1,58)	3 (1,15)	4 073 (12,45)	104 (1,09)	34 894 (78,56)	148 (43,02)	139 (4,64)		74 (3,16)	3 (0,52)	39 566 (80,43)	2
<i>C. imicola</i>	261 (3,21)	5 (1,91)	3 718 (11,36)	90 (0,94)	4 588 (10,33)	58 (16,86)	558 (18,62)	17 (50,00)	702 (30,01)	157 (27,40)	10 154 (90,45)	3
<i>C. enderleini</i>	1 021 (12,57)	4 (1,53)	1 165 (3,56)	40 (0,42)	1 279 (2,88)	3 (0,87)	325 (10,85)	1 (2,94)	152 (6,50)	2 (0,35)	3 992 (94,39)	4
<i>C. nivosus</i>	451 (5,55)	10 (3,82)	306 (0,94)		267 (0,6)	9 (2,62)	297 (9,91)	2 (5,88)	80 (3,42)	2 (0,35)	1 424 (95,79)	5
<i>C. austeni</i>	303 (3,73)	27 (10,31)	1 (<0,01)		559 (1,26)	87 (25,29)			6 (0,26)		983 (96,76)	6
<i>C. similis</i>	134 (1,65)	3 (1,15)	169 (0,52)	3 (0,03)	271 (0,61)		64 (2,14)		48 (2,05)	1 (0,17)	693 (97,44)	7
<i>C. gambiae</i>	1 (0,01)		34 (0,10)		450 (1,01)	7 (2,03)	3 (0,10)		6 (0,26)		501 (97,94)	8
<i>C. moreli</i>	4 (0,05)		101 (0,31)	8 (0,08)	215 (0,48)	16 (4,65)	28 (0,93)		9 (0,38)	2 (0,35)	383 (98,32)	9
<i>C. bolitinos</i>	3 (0,04)		22 (0,07)	4 (0,04)	82 (0,18)	4 (1,16)	9 (0,30)	1 (2,94)	115 (4,92)	21 (3,66)	261 (98,57)	10
<i>C. distinctipennis</i>	78 (0,96)		64 (0,20)		102 (0,23)	1 (0,29)	10 (0,33)		2 (0,09)		257 (98,83)	11
<i>C. milnei</i>	217 (2,67)	5 (1,91)	4 (0,01)		30 (0,07)						256 (99,08)	12
<i>C. murphyi</i>	55 (0,68)		22 (0,07)		114 (0,26)	1 (0,29)	1 (0,03)	1 (2,94)	4 (0,17)		198 (99,27)	13
<i>C. leucostictus</i>	14 (0,17)	3 (1,15)	68 (0,21)	1 (0,01)	23 (0,05)		50 (1,67)		21 (0,90)		180 (99,45)	14
<i>C. miombo</i>	1 (0,01)		25 (0,08)		56 (0,13)	1 (0,29)	20 (0,67)		48 (2,05)	7 (1,22)	158 (99,61)	15
<i>C. pseudopallidipennis</i>			28 (0,09)		16 (0,04)		4 (0,13)		44 (1,88)	4 (0,70)	96 (99,70)	16
<i>C. hortensis</i>	25 (0,31)	3 (1,15)			33 (0,07)	1 (0,29)					62 (99,76)	17
<i>C. accraensis</i>	2 (0,02)		1 (<0,01)		2 (<0,01)				38 (1,62)		43 (99,81)	18
<i>C. pycnostictus</i>	4 (0,05)		13 (0,04)		6 (0,01)		8 (0,27)		10 (0,43)		41 (99,85)	19
<i>C. translucens</i>					2 (<0,01)				25 (1,07)		27 (99,87)	20
<i>C. pretoriensis</i>			9 (0,03)						16 (0,68)	1 (0,17)	26 (99,90)	21
<i>C. azerbaijdzhanicus</i>	2 (0,02)				16 (0,04)		2 (0,07)		5 (0,21)		25 (99,92)	22
<i>C. dekeyseri</i>					20 (0,05)						20 (99,94)	23
<i>C. neavei</i>			9 (0,03)						1 (0,04)		10 (99,95)	24
<i>C. trifasciellus</i>					1 (<0,01)		1 (0,03)		8 (0,34)		10 (99,96)	25
<i>C. nevilli</i>	3 (0,04)		2 (0,01)	1 (0,01)					1 (0,04)		7 (99,97)	26
<i>C. exspectator</i>									5 (0,21)		5 (99,98)	27
<i>C. nigripennis</i>									4 (0,17)		4 (99,98)	28
<i>C. ravus</i>	1 (0,01)				2 (<0,01)		1 (0,03)				4 (99,98)	29
<i>C. robini</i>	1 (0,01)		1 (<0,01)		1 (<0,01)						3 (99,99)	30
<i>C. quinquelineatus</i>					2 (<0,01)						2 (99,99)	31
<i>C. vomensis</i>									2 (0,09)		2 (99,99)	32
<i>C. wansoni</i>			2 (0,01)								2 (99,99)	33
<i>C. clarkei</i>									1 (0,04)		1 (99,99)	34
<i>C. congolensis</i>					1 (<0,01)						1 (99,99)	35
<i>C. dispar</i>					1 (<0,01)						1 (100,00)	36
<i>C. fulvithorax</i>									1 (0,04)		1 (100,00)	37
<i>C. punctithorax</i>									1 (0,04)		1 (100,00)	38
<i>C. sellersi</i>			1 (<0,01)								1 (100,00)	39
<i>C. vicinus</i>					1 (<0,01)						1 (100,00)	40
<i>C. yankari</i>			1 (<0,01)								1 (100,00)	41
	8 123	262	32 727	9 541	44 415	344	2 996	34	2 339	573	101 354	

Un total de 127 197 *Culicoides* a été collecté par les pièges lumineux situés à moins de 5m des chevaux, alors que les pièges lumineux situés à plus de 10m des chevaux ont collectés 103 473 *Culicoides*. Le nombre total de *Culicoides* par espèce a été fortement corrélée entre les pièges ($r = 0,95$; $p < 0,001$), les neuf espèces les plus abondantes (98% du total des collectes des deux pièges) étant identiques. Les trois ou quatre espèces les plus abondantes (*C. oxystoma* et/ou *C. kingi*, *C. imicola* et *C. enderleini*) ont présenté le même rang dans chaque site, à la seule exception du site de Mbao où *C. kingi* et *C. imicola* étaient au rang 2 et 3 dans le piège lumineux $< 5m$ des chevaux (12,8% et 9,2% de la collecte totale) et inversement au rang 3 et 2 dans le piège lumineux $> 10m$ des chevaux (15,2% et 24,1%). Les différences de représentation proportionnelle étaient faibles entre les deux pièges lumineux pour les quatre espèces les plus abondantes (moyenne = 4 %, $N = 20$), avec seulement trois différences $> 4\%$: les différences étaient de 33% entre les collectes sur piège lumineux $< 5m$ et du piège lumineux $> 10m$ pour *C. oxystoma* à Mbao, mais de -10% pour cette espèce à Hann, et de -18% pour *C. kingi* à Niague.

Les abondances mensuelles estimées par les pièges lumineux situés à moins de 5m des chevaux et des pièges lumineux situé à plus de 10m des chevaux étant très corrélées statistiquement ($r = 0,73$, $p < 0.001$), ces données ont été groupées pour le reste des analyses en conservant l'abondance maximale observée par espèce, par site et par mois. Il est à noter que le piège lumineux situé le plus proche des chevaux capture tendanciuellement plus de *Culicoides* que l'autre piège lumineux.

Nous avons comparé les collectes des pièges à appât cheval aux collectes des pièges lumineux en utilisant deux approches complémentaires: 1) une analyse en composantes principales (ACP) en utilisant la décomposition interclasse et intraclasse pour quantifier l'influence relative des sites et des deux types de pièges sur la diversité des *Culicoides* dans son ensemble, et 2) les corrélations entre les collectes des pièges à appât cheval et les collectes des pièges lumineux par espèce.

Dans une première étape, l'analyse en composante principale (ACP) a été effectuée sur les logarithmes népériens des pourcentages d'abondances cumulées par espèces, par site et par type de piège. Les quatre premiers axes représentent 89,8% de la variance cumulée (Figure 17A respectivement 41,3%, 63,2% et 78,6% pour chacun des trois premiers axes).

La variance de l'analyse interclasse (entre sites) explique 74,0% (contre 44,9% prédit par un test de permutation, $p < 0,01$) de la variance de l'ACP, contre 26,0% pour l'analyse intraclasse (entre types de piège), illustrant que l'effet du site était beaucoup plus important dans la diversité des *Culicoides* que l'effet du piège. Ce résultat a été illustré par la

ressemblance de la figure 17A (ACP) à la figure 17C (ACP avec une maximisation de la variance entre les sites) avec l'opposition sur l'axe 1 entre le site Niague caractérisé par *C. kingi* et les autres sites caractérisés par *C. oxystoma*, et sur l'axe 2 entre les sites du Parc de Hann et de Mbao caractérisées par *C. milnei* et *C. austeni* et les sites de Pout et de Thiès caractérisées par *C. imicola* et *C. bolitinos*. La Figure 17D illustre l'opposition entre Mbao caractérisé à la fois par *C. oxystoma* et *C. kingi* et Parc de Hann et Pout caractérisées par *C. enderleini* et *C. nivosus* sur l'axe 3. En effet, dans le Parc de Hann, *C. oxystoma* était dominant (66,7% des captures des pièges lumineux) et était associée à *C. enderleini* (12,6%) ; à Mbao *C. oxystoma* était prédominante (69,9%) en association avec *C. kingi* (12,5%) et *C. imicola* (11,4%) ; à Niague l'espèce majeure était *C. kingi* (78,6%) en association avec *C. imicola* (10,3%) ; à Pout *C. oxystoma* était dominante (49,3%) aux côtés de *C. imicola* (18,6%) et *C. enderleini* (10,9%) et à Thiès *C. oxystoma* était prédominante (38,9%), suivie par *C. imicola* (30,0%). Ainsi, il existe un gradient ouest/est d'abondance croissante de *C. imicola* (de 3,2 à 30,0%) et décroissante de *C. oxystoma* (de 66,7 à 38,9%), à l'exception de Niague où *C. oxystoma* est rare (3,1%).

L'analyse intraclasse (entre types de pièges) a révélé des différences de diversité de capture entre les pièges lumineux et le piège à appât cheval (Figure 17B). Cette structure est principalement attribuable à *C. kingi* et *C. enderleini*, qui ont été principalement capturés par les pièges lumineux (au total l'abondance mensuelle cumulée est respectivement de 39 308 et 3 942 pour le piège lumineux contre 258 et 50 pour le piège à appât cheval).

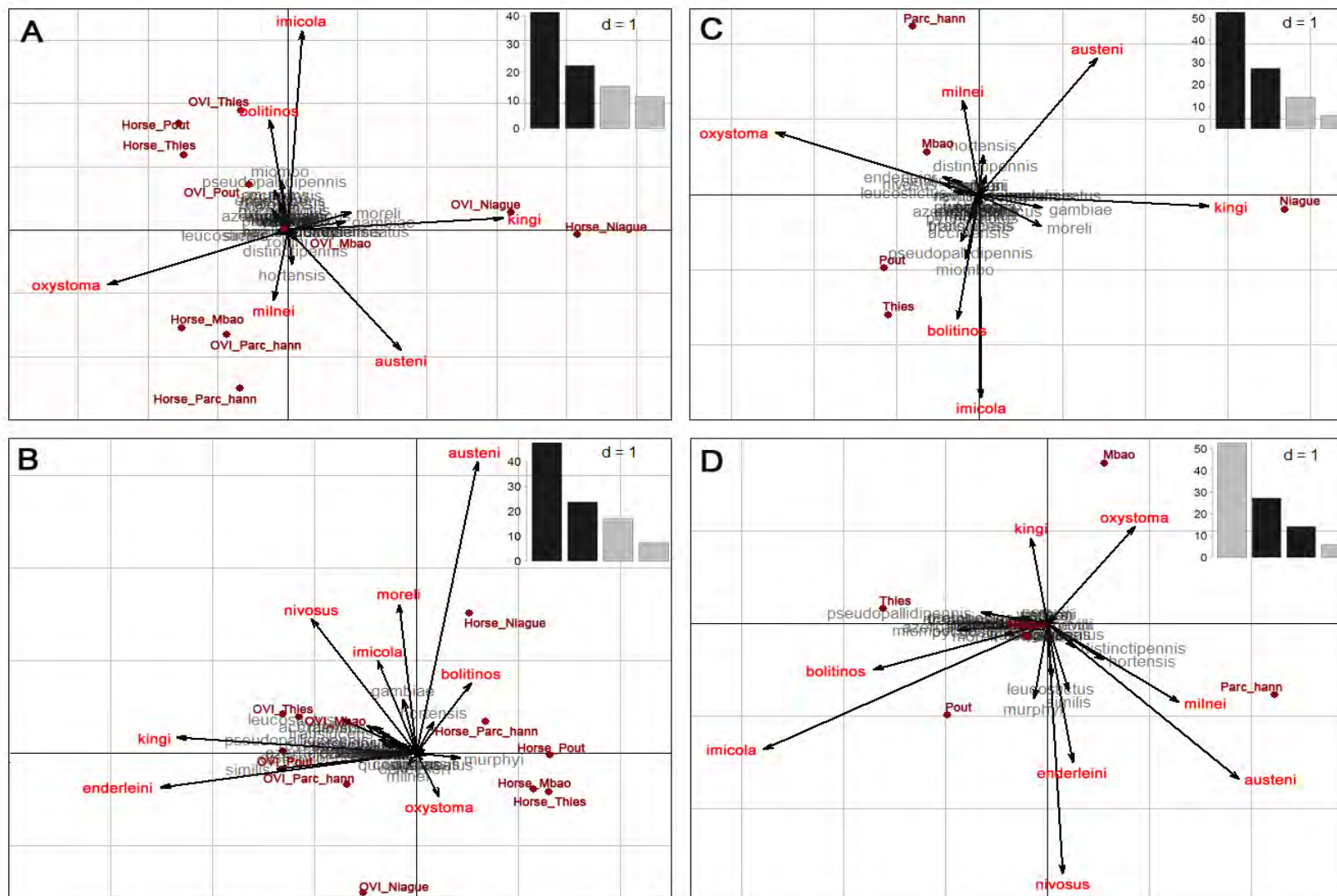


Figure 17 : Diversité des *Culicoides* capturés par site d'étude et par type de piègeage (OVI : pièges lumineux; Horse : pièges a appât cheval). A : analyse en composante principale (ACP) centrée des logarithmes népériens des pourcentages d'abondances cumulées par espèces, par site et par type de piège (axe1/axe 2). B : analyse intraclasse de l'ACP (axe1/axe 2). C et D : analyse interclasse de l'ACP (axe1/axe 2 et axe 2/axe 3)

Dans une deuxième étape, les corrélations ont été évaluées entre les collectes sur appât cheval et les pièges lumineux. Les abondances mensuelles de femelles de *C. oxystoma* capturées par piégeage lumineux sont corrélées à celles obtenues sur l'appât cheval sur les sites du Parc Hann, de Mbao et de Thies (Figure 18), mais pas sur les deux autres sites (Niague, Pout) où cette espèce n'est presque pas capturée sur cheval. Sur les premiers 3 sites, le piège lumineux surestime le taux d'attaque sur cheval de *C. oxystoma* d'un facteur de 1,57 ($R^2 = 85,4$; $p < 0,001$). *Culicoides kingi* n'est capturé sur appât cheval qu'à Mbao et Niague. Sur ces 2 sites (Figure 18), le piège lumineux surestime largement le taux d'attaque sur cheval de *C. kingi* d'un facteur de 3,82 ($R^2 = 74,1$; $p < 0,001$). Les captures sur piège lumineux de *C. imicola* sont corrélées aux abondances estimées sur piège à appât cheval dans les sites de Mbao et Thies (Figure 18), où le piège lumineux surestime largement le taux d'attaque d'un facteur de 2,41 ($R^2 = 75,6$; $p < 0,001$). Il n'y a pas de corrélation entre les captures sur piège lumineux et piège à appât cheval pour *C. enderlenini* et *C. nivosus* dans les cinq sites ($R^2 = 0,18$; $p < 0,001$ et $R^2 = 0,15$; $p = 0,47$ respectivement).

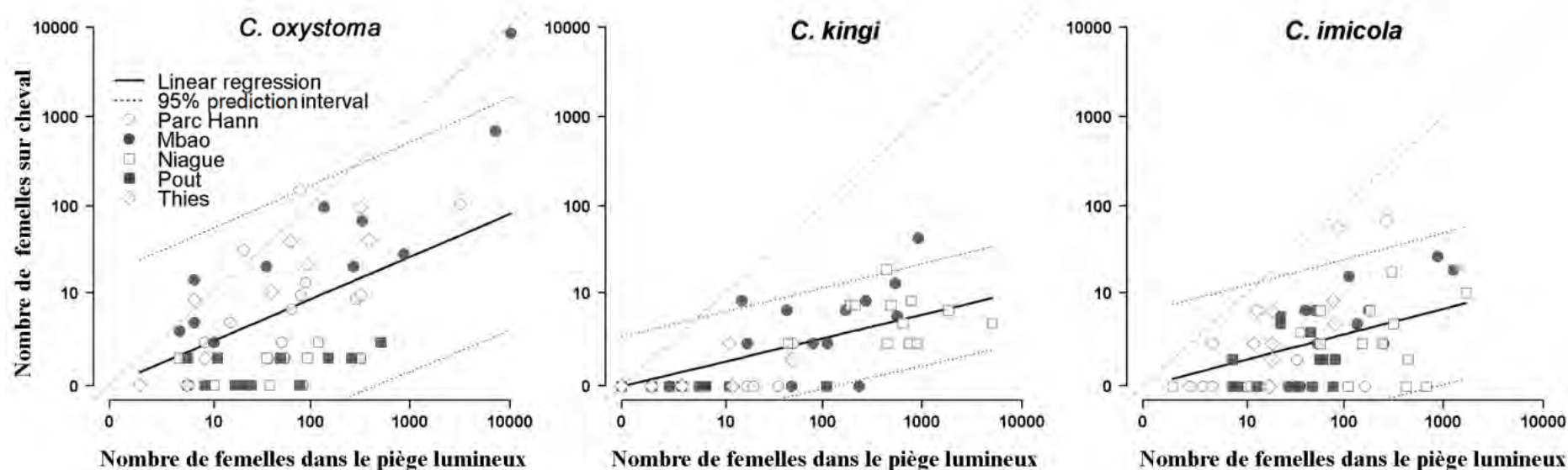


Figure 18 : Corrélation entre les abondances mensuelles de femelles observées dans le piège lumineux et dans le piège à appât cheval pour les trois principales espèces de *Culicoides* (*C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. kingi*) dans les 5 sites d'étude.

2.1.2. Dynamique saisonnière des *Culicoides* dans cinq sites de la zone des Niayes

La dynamique saisonnière montre, d'une manière générale, des abondances élevées à Mbao, moyennes à Hann et à Thies et relativement faibles à Pout et à Niague (Tableau VI). Les trois espèces les plus abondantes dans les pièges à appât cheval (*C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. kingi*) présentent une grande variabilité entre sites (Tableau VI). Ainsi, *C. oxystoma* a présenté à Mbao une valeur moyenne de 772 femelles/piège/nuits, contre environ 20 femelles/piège/nuits au Poney club de Hann et à Thies, et quasiment nulle à Niague et Pout. Les plus fortes abondances sur cheval ont été observées dans la seconde moitié de la saison des pluies (septembre et octobre) au Parc Hann, à Mbao et à Thiès pour *C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. kingi* (Figure 19). Dans ces 3 sites, le pic principal d'abondance est associé à un pic secondaire pendant la saison sèche chaude avant le démarrage des précipitations. Ces espèces ont des abondances faibles pendant la saison sèche froide (novembre à février). En revanche, à Niague, *C. kingi* est présent sur cheval tout au long de l'année, et *C. imicola* est dominant surtout pendant les saisons sèches (Figure 19).

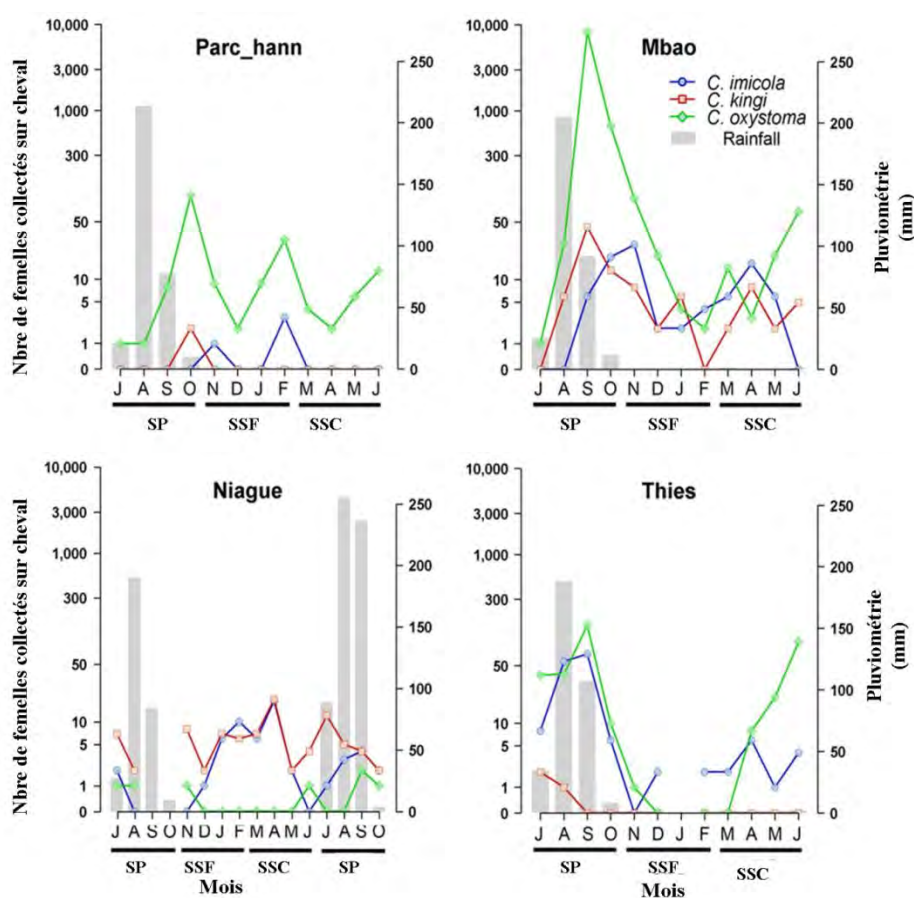


Figure 19 : Dynamique des abondances mensuelles de femelles des 3 principales espèces de *Culicoides* (*C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. kingi*) dans le piège à appât cheval en fonction des saisons (SP=saison des pluies ; SSF=saison sèche froide ; SSC= saison sèche chaude) dans les sites d'étude. NB : les données d'abondance ont été transformées en $\log_{10}(n+1)$; le site de Pout n'est pas représenté étant donné les faibles abondances observées.

Tableau VI : Moyenne d'abondance mensuelle maximale cumulée (M) $\pm$ déviation standard (SD) et fréquence (Freq) de femelles des 3 principales espèces de *Culicoides* collectées sur piège à appât cheval dans les 5 sites d'étude.

Sites \ Espèces	<i>C. oxystoma</i>		<i>C. imicola</i>		<i>C. kingi</i>	
	M $\pm$ SD	Freq (%)	M $\pm$ SD	Freq (%)	M $\pm$ SD	Freq (%)
Mbao	772.25 $\pm$ 2390.65	100	7.33 $\pm$ 8.70	75	8 $\pm$ 11.96	83.33
Parc Hann	15.75 $\pm$ 28.68	100	0.33 $\pm$ 0.88	16.67	0.16 $\pm$ 0.57	8.33
Niague	0.5 $\pm$ 0.65	42.86	3.92 $\pm$ 4.95	78.57	6.21 $\pm$ 4.67	100
Pout	0.7 $\pm$ 0.67	60	1.6 $\pm$ 1.77	70	-	-
Thiès	30.33 $\pm$ 46.81	66.67	13.08 $\pm$ 23.6	83.33	0.25 $\pm$ 0.61	16.67
Total	614.62 $\pm$ 2111.27	87.5	20 $\pm$ 22.11	100	11.75 $\pm$ 10.60	100

2.1.3. Etude des taux de gorgement des *Culicoides* dans cinq sites de la zone des Niayes

Seules les femelles des groupes *Imicola*, *Schultzei* et *Milnei* ont été trouvées gorgées dans le piège à appât cheval (Tableau VII). A titre de comparaison, peu de femelles de *Culicoides* ont été trouvées gorgées dans les pièges lumineux avec un taux de gorgement global de 1,2% contre 36,7% dans le piège à appât cheval. Les différences des taux de gorgement entre espèces sont significatives dans le piège à appât cheval (test de Kruskal Wallis, $p = 0,03$). Globalement, les taux de gorgement peuvent être répartis en trois groupes. Les espèces qui ont un taux de gorgement supérieur à 75% dans lesquelles se trouve *C. bolitinos*, un des vecteurs avérés du virus de la peste équine africaine en Afrique du Sud, les espèces qui ont un taux de gorgement compris entre 50 et 75% dont *C. imicola* le vecteur principal du virus de la peste équine africaine en Afrique et celles qui ont un taux inférieur à 50% dont les espèces du groupe *Schultzei*: *C. oxystoma*, *C. enderleini* et *C. kingi*. Les femelles des espèces *Culicoides gambiae* (Clastrier et Wirth), *Culicoides leucostictus* (Kieffer), *Culicoides murphyi* (Clastrier et Wirth), *C. nevillei*, *Culicoides nivosus* (De Meillon) et *C. similis* (Carter, Ingram et Macfie), rares dans les captures sur appât cheval, n'ont pas été capturées gorgées.

Tableau VII : Taux de gorgement global des femelles de *Culicoides* collectées dans le piège à appât cheval dans les cinq sites d'étude.

<i>Culicoides</i>	Nombre de femelles gorgées [total de femelles]	Taux de gorgement en %
<i>C. hortensis</i> ‡	4 [4]	100
<i>C. milnei</i> ‡	4 [5]	80
<i>C. bolitinos</i> *	28 [36]	77,8
<i>C. miombo</i> *	6 [8]	75
<i>C. imicola</i> *	299 [465]	64,5
<i>C. pseudopallidipennis</i> *	3 [5]	60
<i>C. austeni</i> ‡	85 [156]	54,5
<i>C. moreli</i> ‡	16 [44]	36,4
<i>C. oxystoma</i> †	7943 [21941]	36,2
<i>C. enderleini</i> †	20 [99]	20,2
<i>C. kingi</i> †	62 [308]	20,1

* espèces du groupe *Imicola* ; † espèces du groupe *Schultzei* ; ‡ espèces du groupe *Milnei*

2.1.4. Préférences trophiques estimées par l'analyse de l'origine des repas de sang

Ce travail réalisé par le projet en 2014 sur les échantillons du suivi entomologique dans les cinq sites de 2011-2012 fera l'objet d'une publication en cours (cf annexe 6).

2.1.4.1. Echantillonnage des *Culicoides*

Seules les femelles gorgées collectées des pièges lumineux ont été utilisées pour cette étude. Un sous échantillonnage de 270 individus appartenant à *C. kingi*, *C. imicola* et *C. oxystoma* a été testé sur un total de 1 865 spécimens collectés. L'abondance et la diversité de ces trois espèces de *Culicoides* varient en fonction des sites de piégeage (Tableau VIII).

Tableau VIII : Abondance et diversité des *Culicoides* collectés pour l'analyse de l'origine des repas de sang.

<i>Culicoides</i>	Mbao	Niague	Parc Hann	Thies	Nbre total
<i>C. kingi</i>	10 (15,87%)	53 (84,13%)	0	0	63
<i>C. imicola</i>	17 (30,36%)	4 (7,14%)	2 (3,57%)	33 (58,93%)	56
<i>C. oxystoma</i>	42 (27,81%)	2 (1,32%)	56 (37,09%)	51 (33,78%)	151

2.1.4.2. Amplification de l'ADN génomique et identification

L'amplification de la région du cytochrome b de l'ADN génomique des repas de sang ingérés n'a été possible que chez 57,41% des individus testés (155 sur 270). Tous les repas de sang identifiés proviennent des bovins, des chevaux ou de vertébrés non identifiés et aucun repas de sang mixte n'a été identifié sur les *Culicoides* au cours de cette étude (Tableau IX).

Tableau IX : Origine des repas de sang des femelles de *Culicoides* gorgées collectées sur les différents sites d'étude.

		Hôtes vertébrés					Total n (Tr)
	Espèces	Bovin	Chèvre	Mouton	Cheval	Autres vertébrés	
Parc Hann	<i>C. oxystoma</i>	-	-	-	11 (47,83%)	12 (52,17%)	23 (47,83%)
Mbao	<i>C. imicola</i>	-	-	-	3	-	3 (100%)
	<i>C. kingi</i>	-	-	-	5	-	5 (100%)
	<i>C. oxystoma</i>	-	-	-	37	-	37 (100%)
Niague	<i>C. kingi</i>	23 (56%)	-	-	9 (22%)	9 (22%)	41 (78%)
Thies	<i>C. imicola</i>	1 (4,35%)	-	-	22 (95,65%)	-	23 (100%)
	<i>C. oxystoma</i>	-	-	-	23	-	23 (100%)

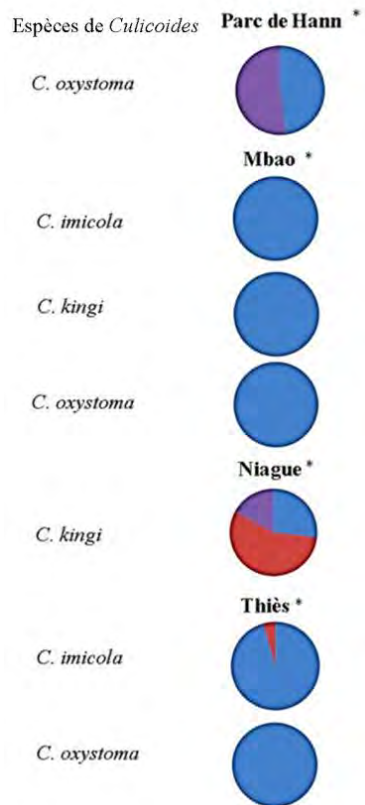
n= nombre de femelles gorges testées positives par site de piégeage ; Tr= taux de réussite de l'identification des hôtes pour chaque espèce en fonction des sites

2.1.4.3. Corrélation entre les données des enquêtes zootechniques et les repas de sang identifiés

La comparaison de l'origine des repas de sang obtenus des femelles de *Culicoides* par rapport à la diversité et à l'abondance des hôtes vertébrés situés à différentes distances du point de piégeage informe sur les préférences trophiques des principales espèces de *Culicoides* dans la région des Niayes (Figure 20).

Culicoides imicola s'est gorgé aux environs du site de capture à moins de 200 m (Figure 21) avec une forte corrélation à Thiès ($R^2 = 0,998$, $t = 35,118$, $df = 3$, $p < 10^{-3}$). Pour *C. oxystoma*, les coefficients de corrélation similaires ont été trouvés dans le site de Parc de Hann ($R^2 = 0,543$, $t = 1,122$, $df = 3$, $p = 0,343$) et Mbao ($R^2 = 0,957$, $t = 88,77$, $df = 3$, $p = 0,014$) à toutes les distances (Figure 21). Par contre à Thiès, la corrélation la plus élevée a été observée à 200 m ($R^2 = 0,999$, $t = 227,25$, $df = 3$, $p < 10^{-3}$). La différence de comportement trophique de *C. oxystoma* entre les sites de Thiès et du Parc de Hann, s'expliqueraient par la disponibilité des hôtes autour du point de piégeage. Dans le site de Thiès, le haras est isolé des habitations et le troupeau de bovins le plus proche est situé à 1 000 m du point de piégeage tandis que le site du Parc de Hann est situé dans une agglomération, en plus de la présence d'autres animaux sauvages (mammifères et oiseaux) dans ce site. Pour *C. kingi*, la corrélation la plus élevée a été observée à 2 000 m dans le site de Niague ($R^2 = 0,95$, $t = 5,299$, $df = 3$, $p = 0,013$) (Figure 21).

Résultats des repas de sang identifiés par PCR



Composition des hôtes vertébrés suivant la distance Distance maximale par rapport au piège

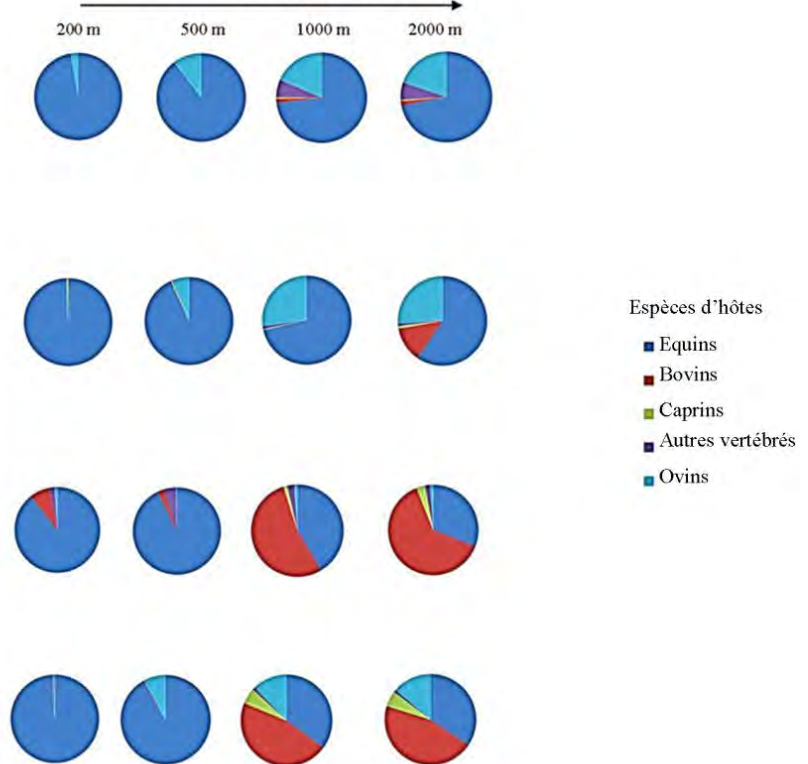


Figure 20 : Comparaison entre l'origine des repas de sang ingérés par les *Culicoides* et la composition des hôtes vertébrés à différents rayons autour du point de piégeage

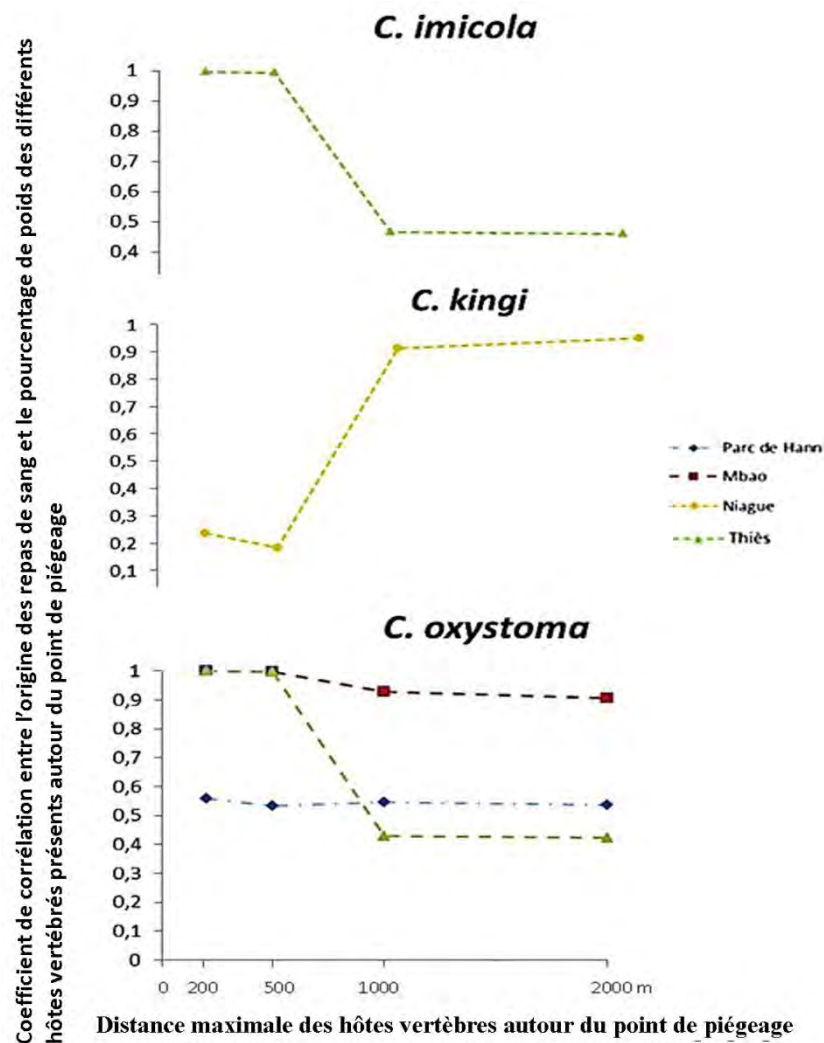


Figure 21 : Corrélation entre les hôtes sélectionnés (origine des repas de sang) par les femelles des principales espèces de *Culicoides* et les hôtes vertébrés présents à différentes distances du point de piégeage dans chaque site d'étude

2.1.5. Etude du rythme circadien de *C. oxystoma*

Ce travail, réalisé sur le seul site de Hann à l'intérieur du LNERV à proximité du parc zoologique situé à environ 800m du poney club (site de collecte lors du suivi temporel). Les données ont été valorisées par une publication d'un article scientifique (cf annexe 4). Un total de 441 individus appartenant à 9 espèces a été collecté durant huit sessions de capture (deux sessions par saison climatique). Les captures sont dominées par *C. oxystoma* avec 418 spécimens collectés (94,78% du total). Les mâles ont été plus abondants que les femelles avec 302 (72,25%) et 115 (27,75%) individus respectivement. Les taux de captures des mâles ont été les plus élevés en avril (79,67% du total) et en juillet (59,77%) alors que pour les femelles, les fortes abondances ont été enregistrées en janvier (80%) et en octobre (61,54%). *Culicoides oxystoma* est présent toute l'année, avec une abondance maximale observée en avril (saison sèche chaude) avec 400 individus collectés. L'abondance minimale a été enregistrée en

janvier (saison sèche froide) avec seulement 5 individus capturés. L'activité circadienne de recherche d'hôte est similaire toute l'année avec une activité journalière bimodale avec un pic matinal et un autre crépusculaire, excepté en octobre (Figure 22). Toutefois, des différences spécifiques en amplitude et en période de pic sont notées entre sessions. En effet, l'heure d'apparition du pic d'activité était variable suivant les saisons. En janvier et avril, le pic matinal apparaît bien après le lever du soleil (10h30) alors qu'il apparaît au environ du lever du soleil (7h30) en juillet. Aucun pic matinal n'a été observé en octobre. L'activité crépusculaire est relativement similaire entre les saisons.

Durant la saison sèche, la moyenne des températures observées aux mois de janvier et avril était relativement similaire avec 23,5°C [17,9-32,6] et 22,8°C [18,5-33,2] respectivement, par contre, les taux moyens d'humidité étaient plus grande variables avec 71,6% [38,2-94,6] en avril et 58,4% [17,4-87,8] en janvier. Cette moyenne des températures a augmenté par la suite et atteint 28°C [24,8-35,4] en juillet avec un maximum de 30,8°C [24,6-44,2] en fin de saison des pluies en octobre. En revanche, l'humidité était relativement constante entre juillet et octobre avec respectivement 76,6% [46,3-94,1] et 74,2% [28,7-98,8]. Bien que des différences de températures soient observées dans l'année, les pics d'activité matinale et crépusculaire apparaissent toujours autour d'une température de 27°C alors que pour l'humidité, elle a été variable suivant les saisons, mais d'une manière générale, le taux d'humidité décroît le matin et augmente le soir.

Le nombre de mâles et de femelles collecté sur toute l'année était fortement corrélée ($r=0,897$; $p < 0,001$) montrant des profils d'activité similaires (Figure 22). Ainsi, les données d'abondance des mâles et femelles ont été regroupées pour les analyses. Globalement, l'abondance de *C. oxystoma* augmente avec la température (jusqu'au seuil de 27°C) et diminue avec l'humidité. Toutefois, cette activité est faible entre 13h30 et 16h30 (Figure 22), période de la journée où les températures étaient maximales et l'humidité minimale. Les activités les plus élevées ont été observées à l'aube et au crépuscule.

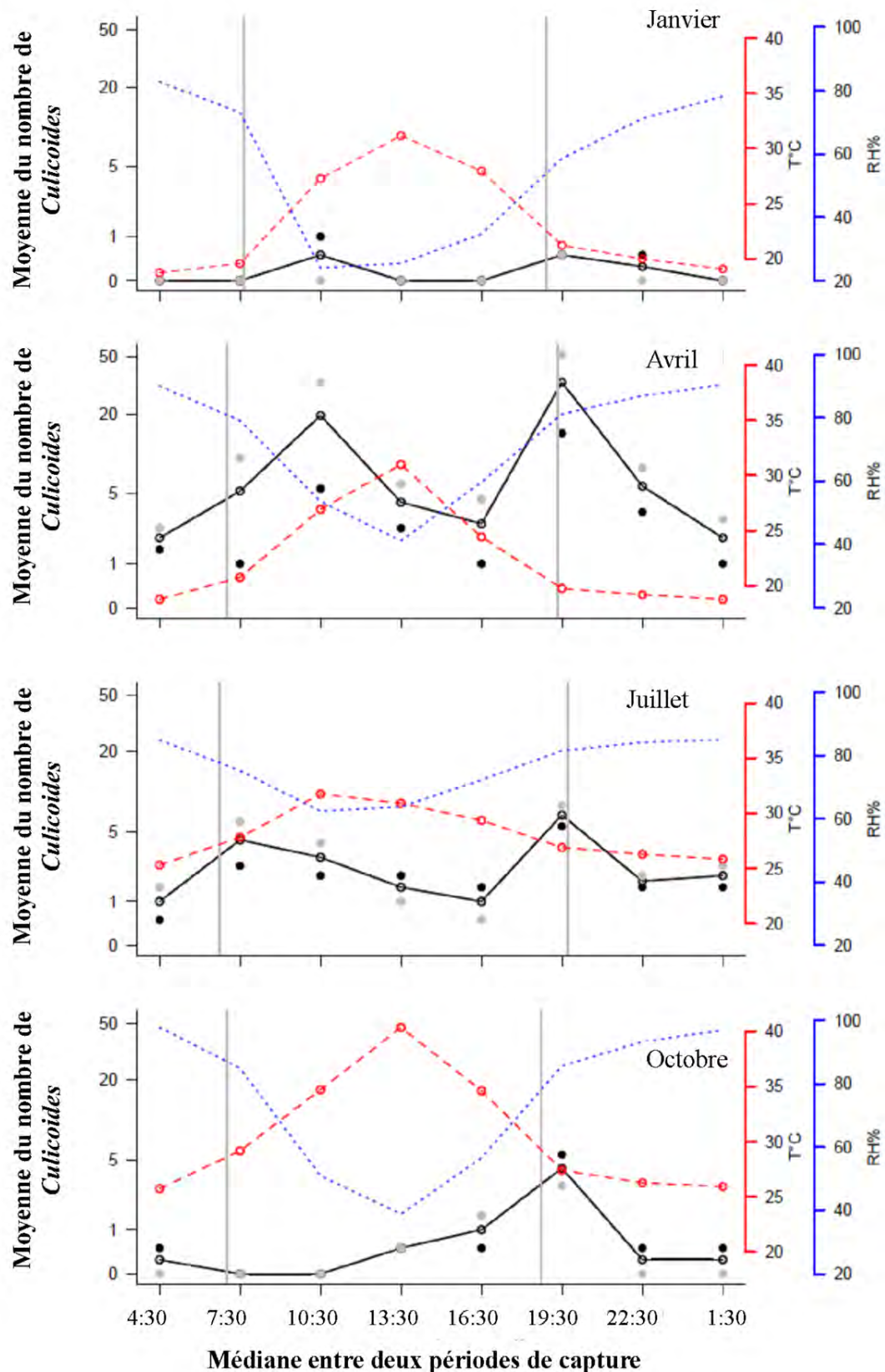


Figure 22 : Rythme circadien de *C. oxystoma* durant les quatre saisons climatiques (Janvier : saison sèche froide, Avril : saison sèche chaude, Juillet : début saison des pluies, Octobre : fin saison des pluies). Les lignes noires représentent la moyenne du nombre de capture des deux nuits consécutives (log10 scale), et les points gris et noir, la moyenne du nombre des mâles et des femelles respectivement. Les variations journalières de températures (en °C) sont représentées en pointillés rouges et l'humidité (en %) en bleu. Les barres verticales grises représentent le lever et le coucher du soleil.

2.1.6. Etude des préférences trophiques et activité nycthémerale des vecteurs potentiels de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine

Ce travail réalisé à Thiès en saison des pluies (Août-Septembre 2012) pendant la période d'abondance des *Culicoides* sur ce site a été valorisé par la publication d'un article scientifique (cf. annexe 5). Un total de 1 259 *Culicoides* a été capturé, dont 54 mâles. Le piège cheval a capturé 1 215 *Culicoides*, soit 96,5% du total des captures, contre 44 pour le piège mouton, soit 3,5% (Tableau X). 11 espèces ont été identifiées au total, toutes présentes dans le piège cheval alors que seules 8 sont présentes dans le piège mouton. *Culicoides oxystoma*, le seul représentant du groupe Schultzei, constitue l'espèce dominante des captures avec 928 spécimens soit 73,7% du total des captures. Les espèces d'abondance moyenne appartiennent au groupe Imicola, à savoir *C. imicola*, avec 214 individus soit 17% du total des captures, *C. bolitinos*, avec 55 individus (4%) et *Culicoides pseudopallidipennis* (Clastrier) avec 34 spécimens (3%). Ensemble, ces 4 espèces représentent 98% des *Culicoides* collectés (Tableau X). Les taux de gorgement de ces espèces varient entre 40 et 50% sur cheval tandis que ce taux est de l'ordre de 20% sur mouton pour *C. oxystoma* (Tableau X). Les autres espèces comme *C. trifasciellus*, *Culicoides translucens* (Khamala et Kettle), *C. nivosus*, *Culicoides nigripennis* (Carter, Ingram et Macfie), et *Culicoides moreli* (Clastrier) sont rares dans les collections. Enfin, les espèces telles que *Culicoides accraensis* (Carter, Ingram et Macfie) et *C. leucostictus* ne semblent pas être attirées par les appâts cheval et mouton et leur capture semble accidentelle, car elles ne sont représentées que par quelques rares spécimens de femelles gravides ou de mâles. La population de *Culicoides* collectée est relativement jeune avec une parité de l'ordre de 30%.

Globalement, le nombre de *Culicoides* est équilibré entre les deux sites de capture (593 sur pour l'un et 600 pour l'autre). Cependant, le nombre de femelles capturées varie de manière importante par session. Ce nombre brut ou corrigé par le poids des hôtes est toujours largement supérieur sur cheval pour *C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis* (Figure 23). De 96 à 98% des femelles ont été capturées sur l'hôte cheval (Tableau X). Le meilleur modèle prédisant l'abondance des femelles de *C. oxystoma* est le modèle complet avec le site et l'hôte en effets fixes et la session en effet aléatoire ($r = 0,99$). Les prédictions du modèle donnent, pour les effets fixes, un rapport de 80 entre les femelles de *C. oxystoma* collectées sur cheval et sur mouton (le cheval pesant 2 fois le poids des brebis) et un rapport de 2,5 entre les 2 sites.

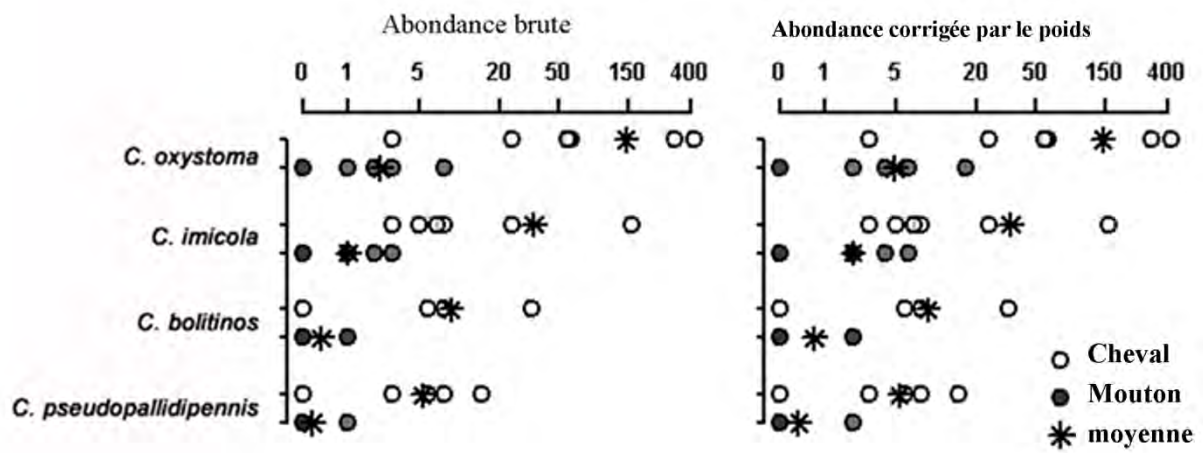


Figure 23 : Abondance brute et corrigée par le poids des hôtes pour les principales espèces de *Culicoides* (*C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis*) collectées sur appâts cheval ou mouton.

Tableau X : Effectif de *Culicoides* collectés lors des 6 sessions de captures sur appâts cheval et mouton.

Espèces	Total					Piège appât cheval								Piège appât mouton								Rapport cheval /total
	Rang	(C%)	F	(P)	M	F	Go	(Go%)	N	P	G	M	F	Go	(Go%)	N	P	G	M			
<i>C. oxystoma</i>	1	73,7	881	35,8	47	867	381	43,9	308	176	2	36	14	3	21,4	10	1	0	11	98,4		
<i>C. imicola</i>	2	90,7	212	12,8	2	206	99	48,0	91	14	2	1	6	1	-	4	0	1	1	97,2		
<i>C. bolitinos</i>	3	95,1	55	16,1	0	53	22	41,5	26	4	1	0	2	1	-	0	1	0	0	96,4		
<i>C. pseudopallidipennis</i>	4	97,8	33	5,6	1	32	14	43,8	17	1	0	0	1	1	-	0	0	0	1	97,0		
<i>C. trifasciellus</i>	5	98,7	11	-	0	11	3	-	6	2	1	0	0	-	-	-	-	-	0	-		
<i>C. translucens</i>	6	99,1	4	-	1	1	0	-	0	0	1	1	3	1	-	0	0	2	0	-		
<i>C. nivosus</i>	7	99,4	3	-	1	0	0	-	0	0	0	1	3	2	-	0	0	1	0	-		
<i>C. nigripennis</i>	8	99,7	3	-	1	2	0	-	0	2	0	1	1	0	-	0	0	1	0	-		
<i>C. accraensis</i>	9	99,9	2	-	0	1	0	-	0	0	1	0	1	0	-	0	0	1	0	-		
<i>C. moreli</i>	10	100,0	0	-	1	1	0	-	0	1	0	0	0	-	-	-	-	-	0	-		
<i>C. leucostictus</i>	11	100,0	1	-	0	0	0	-	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-	0	-		
TOTAL			1 205	30,4	54	1 174	519	44,2	448	200	7	41	31	9	29,0	14	2	6	13	97,4		

(C%) : pourcentage cumulé des abondances ; F : nombre de femelles ; (P) : taux de parité ; M : nombre de mâles ; Go : nombre de femelles gorgées ; (Go%) : pourcentage de gorgement ; N : nombre de femelles nullipares ; P : nombre de femelles pares ; G : nombre de femelles gravides.

La Figure 24 représente l'abondance des femelles de *C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis* collectées quel que soit l'hôte en fonction de l'heure de collecte. Au sein de chaque espèce, les abondances observées par heure de collecte des femelles nullipares, pares, gravides et gorgées sont corrélées entre elles, laissant suggérer qu'il n'y a pas de différence d'heure d'activité entre les stades physiologiques des femelles. *Culicoides oxystoma* peut être capturé toute la journée avec cependant deux pics marqués : le premier après le lever du soleil, et le second crépusculaire. *Culicoides imicola* a une activité nocturne, et un pic d'activité crépusculaire. Les espèces *C. bolitinos*, et *C. pseudopallidipennis* semblent présenter des pics d'activité matinale et crépusculaire, mais l'interprétation reste délicate à cause des faibles effectifs capturés.

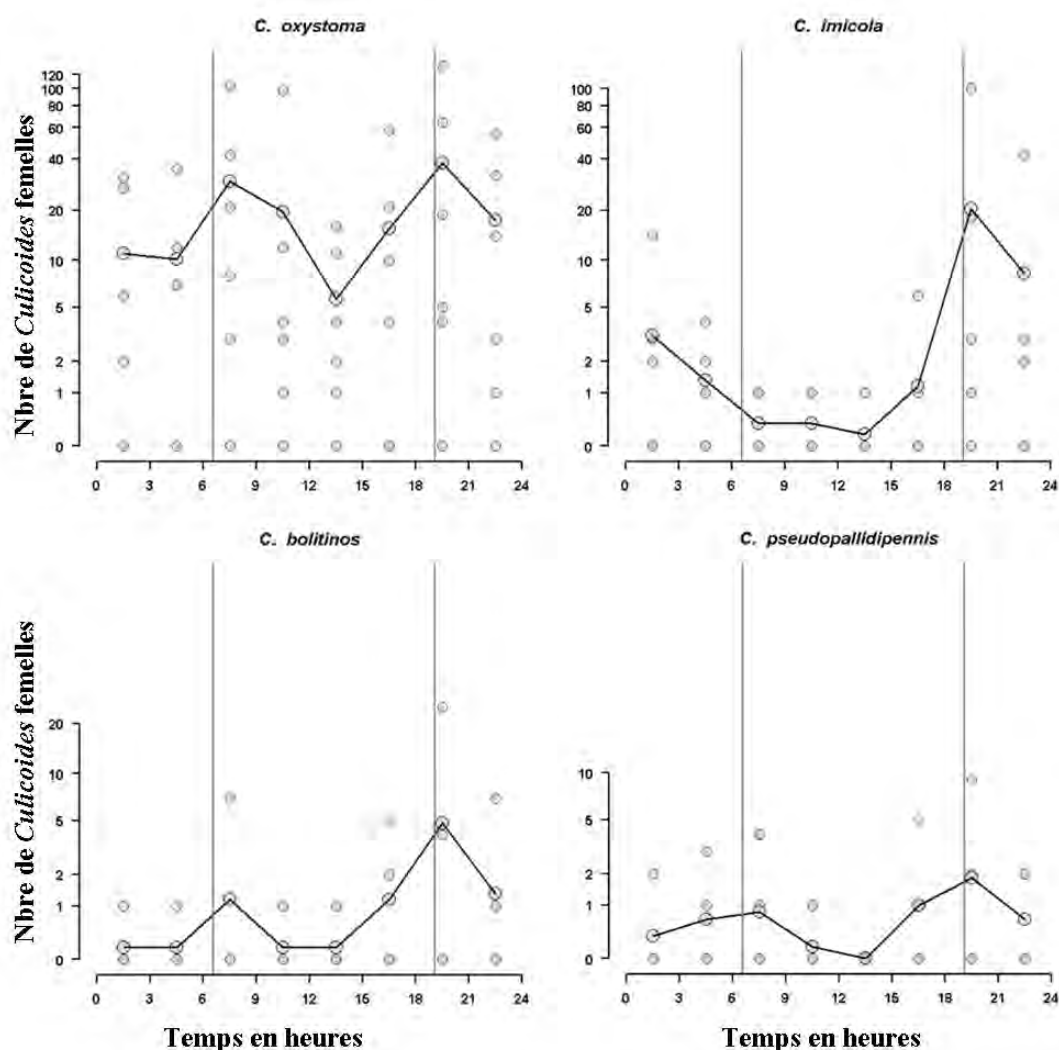


Figure 24 : Activité nyctémérale des femelles de *C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis*, à savoir le nombre de femelles capturées quel que soit l'hôte en fonction de l'heure de collecte (3h, 6h, 9h, ... , 24h). Les symboles reliés par la ligne noire représentent la moyenne des observations. Les lignes grises verticales symbolisent l'heure de lever et de coucher du soleil.

Par ailleurs, un autre Ceratopogonidae du genre *Forcipomyia* et du sous-genre *Lasiohelea* remarquablement agressif sur les hôtes et particulièrement sur le cheval a été observé. Un total de 738 spécimens de ce *Lasiohelea* sp. (non identifié au niveau de l'espèce) a été collecté dont 645 sur cheval, soit 87,4% des individus collectés, avec un taux de gorgement de 80,0% contre 93 sur mouton, soit 12,6%, avec un taux de gorgement de 70,3%. Cette espèce non identifiée de *Lasiohelea* sp. présente une activité diurne marquée par un pic pré-crépusculaire (Figure 25).

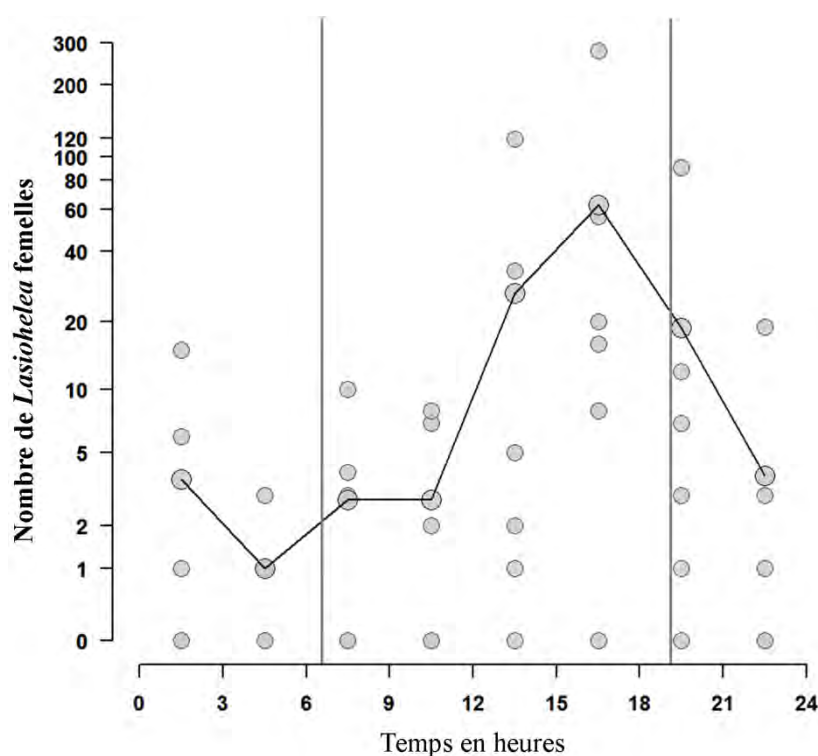


Figure 25 : Activité nyctémérale des femelles de *Lasiohelea* sp, à savoir le nombre de femelles collectées quel que soit l'hôte en fonction des heures de collecte. Les symboles reliés par la ligne noire représentent la moyenne des observations. Les lignes grises verticales symbolisent l'heure de lever et de coucher du soleil.

2.2. Discussion

2.2.1. Diversité des *Culicoides* et étude du contact *Culicoides*-Cheval dans la zone des Niayes

Culicoides oxystoma est l'espèce dominante au contact des chevaux dans une région connue pour ses foyers anciens de peste équine (Sarr *et al.*, 1987), et où la dernière épizootie de peste équine en 2007 a entraîné de nombreuses pertes (Akakpo *et al.*, 2011; Diouf *et al.*, 2013). La comparaison des deux types de piège montre que le piège à appât est plus sélectif que le piège lumineux confirmant des études précédentes (Viennet *et al.*, 2011; Scheffer *et al.*, 2012). Le piège à appât apparaît donc mieux indiqué pour des études plus fines du contact hôte-vecteur visant à identifier les espèces de *Culicoides* impliquées dans la transmission d'agents pathogènes comme le virus de la peste équine. Cette tendance est illustrée par une surreprésentation des espèces telles que *C. kingi*, *C. imicola*, *C. enderleini* et *C. nivosus* dans les pièges lumineux par rapport aux pièges à appât cheval et inversement pour *C. oxystoma*.

Il est maintenant clairement établi que les pièges lumineux surestiment les taux de piqûres des *Culicoides* sur les animaux (Viennet *et al.*, 2011; Scheffer *et al.*, 2012). Néanmoins, les deux méthodes ont donné la même image de diversité de *Culicoides* dans son ensemble, comme mise en évidence par la décomposition de l'ACP de la variance dans l'interclasse (entre sites) et au sein de la classe (entre pièges). Cette ACP a été réalisée en utilisant la représentation proportionnelle plutôt que l'abondance pour éviter un « effet de la taille » en raison des différences importantes d'abondance entre sites et pièges. En utilisant l'abondance dans l'ACP, les données ont été structurées principalement le long d'un axe unique, montrant l'opposition de *C. kingi* et *C. enderleini* entre les pièges lumineux avec une forte abondance et les pièges à appât cheval avec une faible abondance. Cette structuration provoquée par *C. kingi* et *C. enderleini* a été également constaté dans l'analyse intraclasse. Le piège à appât cheval a collecté peu d'espèces et est donc plus approprié pour étudier le contact hôte/vecteur car plus sélectif. La différence se traduit par la surreprésentation des espèces comme *C. oxystoma* (1,57 sur une échelle de log10), *C. kingi* (3,82 sur une échelle de log10) et *C. imicola* (2,41 sur une échelle de log10) dans les pièges lumineux par rapport aux pièges à appât cheval. Déterminer les facteurs de correction est cruciale pour redimensionner les dynamiques d'abondance établies d'une manière générale en routine avec des pièges lumineux (méthode de piégeage plus commode), aux taux de piqûres probables qui pourraient être utilisés dans les modèles de transmission.

Des études faites en Inde montrent que *C. oxystoma* est une espèce euryhaline avec une présence tout au long de l'année dans l'estuaire de l'île de Sagar (Ray & Choudhury, 1988; Poddar *et al.*, 1992). *Culicoides oxystoma* est présente aussi dans les rizières au Sud du Japon (Yanase *et al.*, 2013). Les larves de cette espèce peuvent se développer dans la boue ou dans le sable. Ce qui pourrait expliquer, d'une manière générale, l'abondance de *C. oxystoma* dans la zone des Niayes (dépressions inter-dunaires plus ou moins inondables en saison des pluies). L'abondance de *C. oxystoma* au contact des chevaux dans la zone des Niayes questionne sur son rôle dans la transmission du virus de la peste équine au Sénégal. La compétence vectorielle de cette espèce vis-à-vis de ce virus d'intérêt vétérinaire n'a jamais été testée. *Culicoides oxystoma* est connu en régions Paléarctique et Orientale pour être impliqué dans la transmission d'arboviroses bovines comme Akabane au Japon (Kurogi *et al.*, 1987; Yanase *et al.*, 2005) ; elle est suspectée de transmettre le virus de la Epizootic haemorrhagic disease (EHD) en Israël (Morag *et al.*, 2012) et son implication est avérée dans la transmission du virus de la FCO en Inde (Dadawala *et al.*, 2012).

D'autres espèces comme *C. imicola* et *C. kingi* peuvent être relativement importantes au contact des chevaux suivant les sites d'étude. A Mbao, cela concerne *C. imicola*, *C. kingi* mais aussi *C. enderleini* ; à Niague, *C. kingi* et à Thiès, *C. imicola*. Cette dernière espèce est le vecteur avéré du virus de la peste équine en Afrique du Sud (Venter *et al.*, 2006) et probablement au Maghreb (Maroc) et dans la péninsule Ibérique (Espagne et Portugal) (Rawlings *et al.*, 1997). *Culicoides imicola* est aussi le vecteur majeur du virus de la FCO en Afrique du Sud, au Maghreb et dans le Sud de l'Europe (Mellor *et al.*, 2000). Le rôle vecteur du virus de la peste équine pour *C. kingi* et de *C. enderleini* n'est pas clairement établi. *Culicoides kingi* a été trouvé infecté sur le terrain par EHDV au Soudan (Mellor *et al.*, 1984). *Culicoides enderleini* est un vecteur potentiel du virus de la FCO en Afrique du Sud (Nevill *et al.*, 1992; Venter *et al.*, 2006) et des infections expérimentales conduites sur des spécimens de terrains ont montré que le virus de la PEA pouvait être isolé de cette espèce dix jours après un repas de sang infecté en laboratoire (Venter, Wright, *et al.*, 2009). *Culicoides bolitinos*, la seconde espèce vectrice avérée du virus de la peste équine en Afrique du Sud, est rare dans les sites d'étude de la région des Niayes et à priori ne jouerait pas un rôle important dans la transmission du virus de la peste équine au Sénégal. D'une manière générale, c'est une espèce principalement rencontrée dans les régions subtropicales avec un climat frais et humide comme les zones de faible à moyenne altitude de l'Afrique du Sud (Venter *et al.*, 1996) et de l'île de la Réunion (Desvars *et al.*, 2015).

2.2.2. Suivi de la dynamique saisonnière des *Culicoides* dans la zone des Niayes

En zone tropicale, les périodes de fortes densités de *Culicoides* sont généralement observées en fin de saison des pluies avec des baisses notables de population au cours de la saison sèche en relation avec la pluviométrie, l'hygrométrie et les températures conditionnant non seulement la productivité des gîtes larvaires mais aussi l'activité des adultes (Herniman *et al.*, 1983; Mellor *et al.*, 2000). La même tendance a été notée dans la zone des Niayes au Sénégal où les plus fortes abondances de *Culicoides* et notamment de l'espèce dominante, *C. oxystoma*, sont observées en fin de saison des pluies (septembre et octobre) et dans une moindre mesure en fin de saison sèche (juin). Cette dynamique saisonnière pour l'espèce dominante sur piège à appât cheval est fortement corrélée avec celle observée sur piège lumineux (Diarra *et al.*, 2014). Ces deux pics d'abondance coïncident avec les périodes d'émergence et d'expansion des cas de peste équine lors de l'épizootie de 2007 (Diouf *et al.*, 2013).

Les dynamiques de populations des trois espèces dominantes au contact du cheval présentent des profils variables selon le site. Les variations intersites dans la dynamique de *C. oxystoma* peuvent dépendre des conditions écologiques locales et en particulier de la productivité des habitats larvaires disponibles (Bishop *et al.*, 1994). En effet, les sites de Mbao et de Hann sont caractérisés par la présence à proximité d'un cours d'eau et d'un marécage respectivement alors que la mise en eau et la production des gîtes larvaires dépendraient plus des seules précipitations à Thiès. Certaines espèces du groupe *Schultzei* sont régulièrement trouvées le long des ruisseaux et des canaux de drainage et dans la boue plutôt pauvre en matière organique (Wirth & Dyce, 1985). *Culicoides kingi*, espèce des milieux saumâtres (Cornet & Brunhes, 1994), est l'espèce dominante sur le site de Niague situé à proximité du lac Retba (lac Rose) caractérisé par l'exploitation du sel. Sur ce site, l'abondance de cette espèce est maximale en fin de saison sèche (juin), diminue avec les pluies qui pourraient entraîner une dilution des teneurs en sel des gîtes de reproduction et donc des conditions de développement moins favorables à l'espèce. Ce phénomène est connu chez *Anopheles melas* (Diptera: Culicidae), une espèce de moustique membre du complexe *Anopheles gambiae* dont les larves halophiles se développent dans les lagunes ouest-africaines (Akogbeto, 1995). Quant à *C. imicola*, cette espèce est très abondante à Mbao et à Thiès avec une activité annuelle quasi permanente mais son écologie larvaire reste peu connue et nécessite des investigations pour être élucidée, notamment au Sénégal.

2.2.3. Taux de gorgement des *Culicoides* dans la zone des Niayes

Les taux de gorgement des espèces du groupe Imicola, dont *C. bolitinos* et *C. imicola* recoltées dans le piège à appât cheval sont élevés confirmant les préférences trophiques de ces deux espèces pour les chevaux (Nevill & Anderson, 1972; Meiswinkel *et al.*, 2000) et le rôle probable de *C. imicola* dans la transmission de la peste équine au Sénégal du fait de son abondance et de son rôle vecteur avéré en Afrique du Sud (Venter *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2006). En revanche, les taux de gorgement moyens sur cheval des principales espèces du groupe Schultzei (*C. oxystoma*, *C. kingi* et *C. enderleini*) pourraient être compensés par leurs abondances, notamment pour *C. oxystoma*, si elles s'avèrent compétentes pour la transmission du virus de la peste équine.

Les individus gorgés ont été faiblement présents dans les pièges lumineux de type OVI. Cette faible présence des individus gorgés dans les pièges lumineux résulterait d'une attraction préférentielle des femelles à jeun à la recherche d'un repas de sang (Lassen *et al.*, 2011; Viennet *et al.*, 2011; Lassen *et al.*, 2012). Ainsi l'utilisation d'un cheval comme appât permet, en plus de mesurer l'abondance et la diversité des espèces avec les pièges lumineux, de quantifier l'attractivité du cheval mais aussi l'agressivité des *Culicoides* sur cet hôte. Des expériences complémentaires seront effectuées pour mieux préciser les préférences des potentiels vecteurs du virus de la PEA par analyse des repas de sang des femelles gorgés récoltés dans les pièges lumineux et par piégeage sur différents appâts.

2.2.4. Préférences trophiques par analyse de l'origine des repas de sang

Une autre approche pour quantifier les préférences trophiques des insectes hématophages est l'identification de l'origine des repas de sang sur des femelles gorgées recoltées sur le terrain (Murray, 1970; Kay *et al.*, 2007). Les premières méthodes d'identification de l'origine des repas de sang des vecteurs hématophages développées ont été des techniques immunologiques par test de fixation du complément sur la base de la détection de l'anticorps de l'hôte (Staak *et al.*, 1981) et immuno-enzymatique (ELISA), qui détecte spécifiquement les immunoglobulines de l'hôte, par développement de conjugués spécifiques au genre ou à l'espèce d'hôte potentiel (Chow *et al.*, 1993; Blackwell *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 2001). Ces techniques sont laborieuses et limitées par des réactions croisées indésirables (Hunter & Bayly, 1991). En outre, elles sont peu réalisables pour les vecteurs se gorgeant sur des hôtes sauvages en raison de la difficulté d'obtenir des conjugués spécifiques pour ces hôtes particuliers (Buitrago *et al.*, 2012). Le développement récents de la biologie moléculaire

permet une identification fiable et efficace des repas de sang (Gokool *et al.*, 1993; Ngo & Kramer, 2003; Garros *et al.*, 2011; Buitrago *et al.*, 2012).

Cette étude s'est heurtée à des effectifs relativement faibles de *Culicoides* gorgés récoltés dans les pièges OVI. D'autres méthodes d'échantillonnage pour évaluer les préférences trophiques pourraient être entreprises telles que la collecte des femelles gorgées au repos. Toutefois, cette approche nécessite au préalable d'améliorer nos connaissances encore faibles sur les gîtes de repos des *Culicoides* mais également d'établir des protocoles spécifiques.

Dans cette étude, les repas de sang ont été identifiés par amplification de la région du cytochrome b de l'ADN génomique extrait de l'abdomen des espèces de *Culicoides* gorgées en utilisant la PCR multiplex et la PCR standard. Les tailles des fragments du cytochrome b attendus ont été validées avec succès. Parmi les individus étudiés, 42,59% des repas de sang n'ont pas été identifiés. Ce taux de réussite relativement faible de l'identification des repas de sang est observé dans des études précédentes (Lassen *et al.*, 2012; Viennet, Garros, Gardes, *et al.*, 2012). Cependant, d'autres études ont montré des taux de réussite d'environ 90% sur les *Culicoides* (Garros *et al.*, 2011; Ninio *et al.*, 2011) et de près de 100% avec les Culicidae (Molaei & Andreadis, 2006).

La réussite du test utilisé est sans doute en rapport avec le nombre d'amorces spécifiques d'hôtes utilisées et de la spécificité des vecteurs étudiés à ces hôtes. Ainsi, en l'absence d'un recensement précis des hôtes présents sur les sites d'étude, cette méthode indirecte ne donne qu'une information qualitative, c'est-à-dire la liste des hôtes sur lesquels telle espèce est capable de se gorger en conditions naturelles. En plus, les *Culicoides* présentent un large spectre d'hôtes (Mullens *et al.*, 2005; Carpenter, Szmaragd, *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009; Garros *et al.*, 2011; Viennet, Garros, Gardes, *et al.*, 2012). Aux Etats-unis, Tanner et Turner (1974) ont montré que les effectifs de captures de *Culicoides arboricola* (Root et Hoffman) sont équilibrés sur les mammifères et les oiseaux, mais se gorge plus sur oiseaux que sur mammifères. En Europe, *Culicoides chiopterus* (Meigen) a été capturée abondamment sur piège à appât mouton (Carpenter, Szmaragd, *et al.*, 2008), mais cette espèce a été trouvée à plusieurs reprises gorgée sur bovin même dans une ferme ovine (Garros *et al.*, 2011; Bobeva *et al.*, 2015).

Le faible taux de réussite de nos échantillons est probablement dû aussi à la faible quantité de sang ingérée par les *Culicoides* sur un hôte, qui peut être insuffisante pour une détection ou en raison de la qualité du repas de sang. En effet, le processus de digestion dénature rapidement l'ADN génomique de l'hôte rendant impossible son identification (Kent & Norris, 2005;

Oshaghi *et al.*, 2005). A cela s'ajoute, la longue durée de conservation des spécimens dans l'alcool 90° qui peut aussi dégrader l'ADN génomique du sang ingéré.

Ces études nous montrent que l'origine des repas de sang varie selon l'espèce de *Culicoides*, le site de piégeage et la disponibilité des hôtes. *Culicoides oxystoma* s'alimente principalement sur chevaux à moins de 200 m du point de piégeage à Mbao et Thiès alors que dans le site du Parc de Hann, seulement 48% des individus de *C. oxystoma* se gorge sur des chevaux, tandis que 52% sur des hôtes vertébrés non identifiés. Aucun repas de sang n'a été identifié provenant des caprins ou ovins chez *C. oxystoma*. Le fort taux de repas de sang non identifié au Parc de Hann peut être expliqué par la présence du parc zoologique situé à 800 m. Ainsi, *C. oxystoma* pourrait se gorger sur les animaux du parc ou sur des chiens aux alentours du point de capture.

Concernant *C. imicola*, le cheval représente son hôte préféré comme montré au cours de cette étude et cette espèce s'alimente principalement aux voisinages des sites de piégeage (200m) dans les deux sites où elle a été collectée en abondance. Toutefois, cette espèce est capable de s'alimenter sur bovins (Braverman *et al.*, 2004) et sur ovins (Du Toit, 1944, 1962) qui sont présents dans le voisinage. Ce large spectre d'hôtes de *C. imicola* explique à la fois son implication dans la transmission de nombreux virus importants en santé animale, mais aussi la diversité des hôtes affectés par les virus qu'elle transmet (Du Toit, 1944; Theodoridis *et al.*, 1973; Davies & Walker, 1974; Mellor *et al.*, 1984; Nevill *et al.*, 1988; Al Busaidy & Mellor, 1991; Venter *et al.*, 2000; Meiswinkel & Paweska, 2003; Mellor & Hamblin, 2004).

Culicoides kingi s'alimente principalement sur les chevaux aux environs de 200 m du point de piégeage à Mbao alors qu'à Niague, cette espèce se gorge sur un large éventail d'hôtes vertébrés (56% sur bovins, 22% sur cheval et 22% sur autres vertébrés). Ainsi, *C. kingi* semble être plus attirées par les bovins dans le site de Niague. Ces observations concordent avec l'implication de *C. kingi* dans la transmission au Soudan d'*Onchocerca gutturosa*, une filaire parasite des bovins (EL Sinnary & Hussein, 1980). Ceci expliquerait aussi la faible présence de *C. kingi* dans le piège appât cheval et le faible taux de gorgement malgré la forte dominance de cette espèce collectée avec les pièges lumineux dans ce site. A Mbao, les bovins étaient rares jusqu'à 2 km, ainsi, *C. kingi* s'alimente sur les chevaux. Ce comportement opportuniste qui consiste à se gorger sur d'autres espèces en l'absence de l'hôte privilégié est connu chez les *Culicoides* (Kettle, 1977; Schmidtman *et al.*, 1980; Viennet, 2011). En effet, *C. obsoletus*, en fonction de la disponibilité des hôtes peut s'alimenter sur les oiseaux ou sur les mammifères (Lassen *et al.*, 2011; Lassen *et al.*, 2012). Ce comportement opportuniste ou

déviations trophiques est bien connu chez les moustiques (Culicidae). *Anopheles gambiae* et *An. funestus*, deux vecteurs majeurs du paludisme au Sénégal (Faye *et al.*, 2011), présentent des comportements trophiques étroitement liés à l'homme. Des études de préférences trophiques sur ces vecteurs montrent une grande plasticité de ces espèces, avec une déviation en faveur du bétail lorsque l'homme est relativement peu présent (Robert & Carnevale, 1984; Dia *et al.*, 2001; Dia *et al.*, 2008).

Aucun repas de sang mixte n'a été observé au cours de cette étude. Toutefois, des travaux de détermination de l'origine des repas de sang en zone Paléarctique montrent l'existence de repas de sang mixte chez les *Culicoides* (Garros *et al.*, 2011; Bobeva *et al.*, 2015).

La dispersion active (du fait du vol de l'insecte) des femelles à la recherche d'un repas de sang est largement étudiée dans de nombreuses espèces d'insectes d'intérêt médical telles que les moustiques (Bugher & Taylor, 1949; Bruce-Chwatt & Hayward, 1956; Abdel-Malek & Abdel Aal, 1966). La compréhension de ce comportement de dispersion est importante dans la dynamique des maladies à transmission vectorielle. En effet, le taux de progression des fronts épidémiologiques est sous influence des facteurs liés à la disponibilité des vecteurs, de l'hôte et des conditions environnementales (Pioz *et al.*, 2012). Bien que cette approche indirecte puisse être biaisée par la présence d'animaux non identifiés aux voisinages des points de piégeage, nos résultats sont en accord avec le comportement de dispersion des *Culicoides* (Lillie *et al.*, 1981; Kettle, 1984). En effet, la dispersion active des *Culicoides* est généralement limitée à quelques centaines de mètres (Campbell & Kettle, 1975; Linhares & Anderson, 1990) avec un maximum enregistré de 6 km (Kluiters *et al.*, 2015). La capacité de dispersion active des femelles de *Culicoides* est similaire à celle d'autres insectes diptères hématophages comme les moustiques tels qu'*An. gambiae* et *An. funestus*, les vecteurs majeurs du paludisme en Afrique Sub-saharienne, qui se situe entre 350 et 650 m (Costantini *et al.*, 1996; Midega *et al.*, 2007). Le comportement alimentaire des espèces étudiées est fonction du site et la disponibilité des hôtes.

Il a été observé que les *Culicoides* se sont gorgés sur cheval dans tous les sites (le cheval était l'hôte le plus dominant autour des points de piégeage). Cette observation est conforme aux résultats obtenus dans les études du contact hôte/vecteur et les études des préférences trophiques et activité nyctémérale que nous avons réalisées dans la même zone des Niayes. *Culicoides oxystoma* et *C. imicola* montrent des préférences pour les chevaux par rapport aux moutons. Cette tendance s'expliquerait par le choix de nos sites d'étude (les centres équestres). Ces travaux ont été réalisés dans des centres équestres dans l'objectif de mieux connaître les *Culicoides* (vecteurs de la peste équine) suite à la dernière épizootie de 2007 au

Sénégal. Le choix de l'hôte est principalement déterminé par des facteurs écologiques, sa disponibilité et l'approche pratique pour étudier le choix de l'hôte par comparaison des réponses de différentes espèces d'insectes à plusieurs hôtes alternatifs (Gillies, 1972). Ainsi, travailler uniquement dans des centres équestres fait que les *Culicoides* soient trouvés essentiellement gorgés sur chevaux.

En plus des méthodes d'évaluation des préférences trophiques de terrain, analyses des repas de sang et des captures sur différents appâts, des études complémentaires peuvent être entreprises au laboratoire pour mieux préciser ces préférences alimentaires par la mesure de l'olfactomètre à double choix (Dekker *et al.*, 2001).

2.2.5. Rythme circadien de *C. oxystoma*.

L'intérêt de l'étude du rythme d'activité circadien de *C. oxystoma* est à la fois justifié par l'identification première de cette espèce au Sénégal et les données préliminaires sur son abondance et ses taux de gorgement relatifs sur cheval dans la région des Niayes. Le choix du site de Hann est justifié par la prédominance de cette espèce dans les captures du suivi temporel. Cette espèce est présente tout au long de l'année avec des densités maximales observées en saison chaude et sèche (avril) et au début de la saison des pluies (juillet). Cette expérimentation montre des divergences avec les résultats du suivi temporel. Ces différences se situent au niveau des abondances mais surtout de la période d'apparition du pic. Ces différences pourraient s'expliquer par une différence des points de capture. Bien qu'on soit dans le même site (Parc de Hann), cette étude s'est déroulée à l'intérieur du LNERV à proximité du parc zoologique séparé par un mur de plus de 2 m et situé à environ 800 m du poney club (site de collecte lors du suivi temporel). Une autre hypothèse serait la différence d'appât utilisé. En effet, au cours de cette étude nous avons utilisé un mouton comme appât contre un cheval lors du suivi temporel. En d'autres termes, les faibles abondances pourraient découler de différence d'attractivité entre ces deux hôtes (mouton et cheval) par rapport à l'espèce prédominante, *C. oxystoma*. Cette possible différence d'attractivité entre cheval et mouton nous a conduits à évaluer, plus tard, les préférences trophiques des potentiels vecteurs entre ces deux hôtes sensibles des virus de la PEA et de la FCO. Le choix de l'appât mouton s'explique par une indisponibilité d'un cheval pour l'expérimentation mais surtout par les attaques des *Culicoides* sur les ovins, qui sont par ailleurs les hôtes les plus sensibles au virus de la FCO, endémique au Sénégal.

Culicoides oxystoma présente une activité circadienne bimodale, observée au coucher et au lever du soleil sauf en octobre avec l'absence du pic matinal. Les mâles et les femelles présentent des profils d'activité similaire. Les paramètres abiotiques tels que la température et l'humidité ont eu des effets importants sur l'activité de cette espèce. De manière générale, la diminution des valeurs moyennes de la température et de l'humidité et leur augmentation au-delà d'un certain seuil réduisent de manière significative l'activité de *C. oxystoma*. L'activité de *C. oxystoma* est observée à des températures comprises entre 20°C et 27°C et une humidité relative de plus de 80%.

L'activité bimodale observée chez *C. oxystoma* (matinale et crépusculaire) a été décrite chez d'autres espèces de *Culicoides* (Kettle & Linley, 1968; Service, 1969; Nelson & Bellamy, 1971; Auriault, 1977; El Sinnary *et al.*, 1985; Viennet, Garros, Rakotoarivony, *et al.*, 2012) et la faible activité journalière a été attribuée aux paramètres abiotiques. D'une manière générale, l'activité de vol des *Culicoides* est influencée par les paramètres météorologiques tels que l'intensité lumineuse, la température et l'humidité, qui sont étroitement liés (Kettle & Linley, 1968; Service, 1969; Nelson & Bellamy, 1971; Auriault, 1977; El Sinnary *et al.*, 1985; Zimmer, 2007). La température freine l'activité des *Culicoides* au dessus et en dessous de certaines limites (Auriault, 1977; Zimmer *et al.*, 2008) et le pic matinal décalé de 3h plus tôt en juillet est probablement dû à une forte augmentation des températures au cours de cette saison. En effet, les pics matinaux des mois de janvier, avril et juillet sont observés toujours autour d'une température moyenne de 27°C et au-delà de ce seuil, l'activité de vol diminue, montrant les limites thermiques sur l'activité de *C. oxystoma*. L'absence de pic d'activité matinale en octobre est probablement due à une température trop élevée y compris tôt le matin, c'est effectivement le mois le plus chaud de l'année dans la région d'étude. Bien que variable entre les saisons, l'amplitude de l'activité de vol était toujours plus importante au crépuscule comme cela a été décrit pour d'autres espèces de *Culicoides* (Nelson & Bellamy, 1971; Auriault, 1977; El Sinnary *et al.*, 1985; Blackwell, 1997; Viennet *et al.*, 2011). Les conditions favorables à l'activité de vol de *C. oxystoma* semblent se situer à une température environnant 27°C et une humidité relative supérieure à 80%. Toutefois, d'autre paramètre météorologique tel que le vent, paramètre que nous n'avons pas pu mesurer, pourrait affecter l'activité de vol des *Culicoides*. Pour des vents de 10 m/s, le nombre de piqûres de *C. belkini* diminue, devient nul pour des vents de 15 m/s et les captures les plus importantes se font par vent faible ou nul (Duval *et al.*, 1978).

L'étroite association entre les mâles et femelles de *C. oxystoma* observée au cours de nos expérimentations suscite des interrogations. A notre connaissance, c'est la première fois que

des mâles de *Culicoides* sont collectés si abondamment dans un piège avec un appât animal. L'abondance relative des mâles de *C. oxystoma* dans ces collections peut être expliquée par l'emplacement du piège. Le piège a été placé entre les arbres pour éviter ou réduire l'exposition des animaux au soleil. En effet, les *Culicoides* sont rencontrés pendant la journée dans les zones ombragées de végétation et/ou sous la face inférieure des feuilles (Zimmer, 2007). En outre, les mâles se nourrissent de nectar et de pollen, et fréquentent ainsi le sommet des arbres (Goetghebuer, 1952; Chaker, 1981; Rieb, 1982). Une autre hypothèse pourrait être le comportement d'accouplement de *C. oxystoma*. Très peu d'études décrivent le comportement d'accouplement des *Culicoides* (Campbell & Kettle, 1979; Zimmer *et al.*, 2008). Campbell et Kettle (1979) ont décrit le comportement de reproduction de *C. brevitarsis*, indiquant que des essaims se formaient en présence ou en l'absence d'un hôte : la présence de l'hôte augmentait la taille de l'essaim en étant un repère d'attraction pour les femelles, et réduisait la distance entre l'essaim et le bétail. L'accouplement dans des essaims a bien été décrit pour de nombreuses espèces de diptères (Downes, 1969). L'accouplement des femelles a lieu dans des essaims formés de nombreux mâles localisés autour d'endroits spécifiques. Ces essaims de mâles se forment au crépuscule et durent environ 20 minutes. Les femelles se rapprochent généralement des essaims à la rencontre d'un mâle pour la copulation. Ce comportement de reproduction typique chez de nombreuses espèces de diptères pourrait expliquer la forte abondance des mâles capturés dans cette étude. Bien qu'aucune étude spécifique n'ait été réalisée sur le comportement d'accouplement de *C. oxystoma*, nos résultats suggèrent que l'hôte pourrait aussi être un "marqueur spécifique" pour la reproduction de cette espèce.

Les résultats de cette étude questionnent sur l'attractivité du cheval et du mouton par rapport à *C. oxystoma* et de façon concomitante sur les préférences trophiques de cette espèce. Ainsi, une étude de comparaison entre appât cheval et mouton a été réalisée couplée à l'étude de l'activité de vol des principales espèces de *Culicoides* d'intérêt vétérinaire dans la région des Niayes.

2.2.6. Préférence trophique et activité nycthémerale des vecteurs potentiels de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine

Le choix des appâts utilisés au cours de cette étude (cheval contre mouton) est justifié par l'importance vétérinaire des maladies (PEA et de FCO) et aussi par les résultats controversés en termes de période d'abondance des *Culicoides* et d'attractivité des hôtes observées entre le

suivi temporel de la dynamique et le rythme circadien de *C. oxystoma*. Le choix d'hôte par les insectes hématophages est un facteur déterminant l'intensité de la transmission des pathogènes associés (Gubbins *et al.*, 2008). Définir la communauté d'hôtes des insectes hématophages est essentiel pour identifier les espèces d'insectes et de vertébrés impliquées dans la transmission des maladies vectorielles, avec comme conséquence la possibilité d'influencer l'intensité de la transmission en tenant compte de l'abondance et de la localisation des hôtes (par exemple, éloigner les porcs des habitations, hôtes amplificateurs du virus de l'encéphalite japonaise, transmis par les moustiques dont *Culex tritaeniorhynchus* Giles principal vecteur en zone rurale rizicole et peri-urbaine en Asie) (Viennet, 2011).

Les taux d'attaque observés sur les différents hôtes ont été variables au cours des différentes sessions de capture. Les captures sur appât dépendent en effet de facteurs propres à l'hôte tenant compte des préférences trophiques respectives de chaque espèce de *Culicoides* mais aussi comme nous l'avons déjà souligné des facteurs météorologiques. Parmi les principaux facteurs météorologiques en cause, les fortes variations de température sont connues. En saison sèche et froide en Afrique de l'Ouest (au Sénégal), il suffit d'une nuit moins froide (condition thermique favorable) pour voir la quantité des captures augmenter dans les pièges lumineux (Cornet, 1969). Aussi, le rendement des captures est généralement meilleur lors des nuits sans lune (Cornet, 1969; Auriault, 1979; Itoua *et al.*, 1987). Les préférences trophiques des insectes hématophages ont une base génétique mais dans la réalité, ces préférences trophiques sont relativement plastiques (qualifiée d'opportuniste) dépendant de la disponibilité (présence et abondance) des hôtes préférentiels (Viennet, Garros, Gardes, *et al.*, 2012; Takken & Verhulst, 2013). Le nombre de fosses olfactives sur les antennes des *Culicoides* femelles a été corrélé avec la préférence d'hôte, et les espèces ornithophiles ont été prétendues avoir plus de fosses olfactives que les espèces se nourrissant sur les mammifères (y compris l'homme) (Jamnback, 1965). Aussi, l'attractivité d'un hôte préférentiel donné pour des insectes hématophages dépend de la taille de l'hôte, de sa chaleur, du dioxyde de carbone (CO₂) dégagé ou de sa couleur (Dow *et al.*, 1957; Humphreys & Turner, 1973; Edman *et al.*, 1974; Lardeux *et al.*, 2007). Les paramètres météorologiques tels que le vent, peuvent aussi perturber le panache des émanations d'odeur de l'hôte ou l'activité de vol des insectes. Toutefois, les facteurs influençant l'attractivité des *Culicoides* ne sont pas entièrement compris. La couleur de l'hôte ne semble pas avoir une influence sur le taux d'attaque de *Culicoides sanguisuga* (Coquillett) et de *Culicoides guttipennis* (Coquillett) (Humphreys & Turner, 1973). Des études récentes ont montré que *C. imicola* préfère attaquer la partie arrière d'un veau en particulier sur les taches noires (Braverman *et al.*, 2004). Le dioxyde de carbone

semble attirer des spécimens du complexe *variipennis* en Amérique du Nord (Nelson, 1965; Mullens, 1995), alors que le piège à succion appâté de CO₂ collecte seulement quelques spécimens de *C. obsoletus* ou de *Culicoides parroti* (Kieffer) en Espagne (Mullens *et al.*, 2005; Gerry *et al.*, 2009). Il a été clairement établi que la taille de l'hôte, en corrélation avec la quantité d'émanations (CO₂, température corporelle, eau), influence l'attractivité de *Culicoides furens* (Poey) et de *Culicoides hollensis* (Melander et Brues) (Koch & Axtell, 1979), de *C. sanguisuga* et de *C. guttipennis* (Humphreys & Turner, 1973).

L'activité des *Culicoides* est aussi variable durant le jour pour les espèces ayant une activité de pique diurne et l'intensité de cette activité est étroitement liée à trois facteurs climatiques que sont la luminosité, la température et l'hygrométrie (Auriault, 1977). Il semble qu'une température élevée et non une forte luminosité constitue un facteur limitant de l'activité de pique des *Culicoides* (Auriault, 1977). Chez *Culicoides grahamii* (Austeni), espèce qualifiée de diurne, la période de forte activité en fin de journée se produit à de très faibles valeurs de la luminosité (1 à 4 lux) et peut persister même jusqu'à 30 minutes après le coucher du soleil (Auriault, 1979).

La prédominance de *C. oxystoma* dans le piège à appât cheval au cours de cette étude est conforme aux résultats obtenus avec le même procédé de piégeage dans le cadre de l'étude du contact *Culicoides*/Cheval réalisée lors du suivi temporel sur 5 sites de la région des Niayes. L'activité de cette espèce matinale et crépusculaire a été déjà observée dans l'étude du rythme circadien de *C. oxystoma* réalisée sur le site de Hann. Cette étude montre une préférence de *C. oxystoma* et trois espèces du sous-genre *Avaritia* (*C. imicola*, *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis*) pour le cheval par rapport aux moutons. Cette forte abondance des *Culicoides* collectés sur appât cheval a été observée par Viennet *et al.* (2012) pour des espèces de *Culicoides* paléarctiques comme *Culicoides scoticus* (Downes et Kettle), *Culicoides dewulfi* (Goetghebuer) et *C. obsoletus*, sans que les auteurs ne puissent conclure à une plus grande attractivité intrinsèque des chevaux par rapport aux autres hôtes utilisés (mouton, vache, chèvre et poule), ou à une relation non linéaire entre le poids et l'attractivité (le cheval étant de loin l'hôte le plus grand). Dans notre étude, le nombre de femelles capturées varie de manière importante par session. Ce nombre brut ou corrigé par le poids des hôtes est toujours largement supérieur sur cheval pour *C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis* et 96 à 98% des femelles sont capturées sur cet hôte. Par conséquent, le différentiel limité de poids entre cheval et moutons suggère que cette différence d'abondance entre hôte soit liée à une réelle plus grande attractivité du cheval pour les 4 espèces de *Culicoides* collectées.

Culicoides imicola est une espèce nocturne mais aussi exophage (B. J. H. Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). Son activité de vol nocturne mis en évidence dans notre étude est en conformité les résultats obtenus par ces auteurs en Afrique du Sud. *Culicoides bolitinos* et *C. pseudopallidipennis* ont aussi une activité nocturne. *Culicoides trifasciellus* (Goetghebuer) n'a été capturé que dans le piège à appât cheval pendant la nuit. Cependant, les faibles captures ne permettent pas de tirer de conclusions sur son activité nyctémérale et sur ses préférences trophiques. Cette espèce peut être capturée sur homme et semble vraisemblablement zoo-anthropophile (Itoua *et al.*, 1987). Cette espèce se trouve aussi dans une incertitude taxonomique avec des espèces proches comme *Culicoides brosetti* (Vattier et Adam) et *Culicoides dubitatus* (Kremer, Rebholtz-Hirtzel et Delécolle) (Kremer *et al.*, 1975). A cela s'ajoute l'inexistence de clé d'identification proposée pour ces espèces.

La famille des Ceratopogonidae contient quelques 125 genres parmi lesquels les genres *Austroconops*, *Culicoides*, *Forcipomyia* sous-genre *Lasiohelea*, et *Leptoconops* renferment des espèces hématophages. La nuisance de l'espèce du sous-genre *Lasiohelea* sp non identifiée que nous avons collecté dans notre étude est certaine sur le cheval et le mouton. Le rôle vectoriel des espèces de ce sous genre n'est pas clairement établi. Des études menées en Australie montrent qu'une espèce de *Lasiohelae* sp, d'activité de vol journalière, est un vecteur biologique potentiel de *Leishmania* sp, proche de *Leishmania enrietti*, parasite du kangourou rouge (*Macropus rufus*) (Dougall *et al.*, 2011). Les seules femelles que nous avons capturées au cours de notre étude ne nous ont pas permis une identification précise à l'espèce. Des études complémentaires seraient nécessaires pour identifier précisément cette espèce que nous avons capturée en abondance (et gorgée) sur cheval et sur mouton (moins abondante sur mouton) dans la région des Niayes au Sénégal.

3. Contrôle des *Culicoides* potentiels vecteurs de la peste équine au Sénégal

3.1. Résultats

3.1.1. Sensibilité des *Culicoides* à la Deltaméthrine, Perméthrine et au Chlorpyrifos

La sensibilité intrinsèque de trois espèces locales d'intérêt vétérinaire *C. imicola*, *C. oxystoma* et *C. kingi* a été déterminée vis à vis de trois matières actives : la deltaméthrine, la perméthrine et le chlorpyrifos. Un total de 3 269 *Culicoides* femelles nullipares (1 335 *C. imicola*, 948 *C. oxystoma* et 986 *C. kingi*) a été utilisé au cours des essais réalisés suivant le test tube OMS adapté. La lecture de la mortalité à 24 heures montre des différences de sensibilité en fonction de l'espèce et de la matière active (Tableau XI et XII ; Figures 26, 27 et 28). La deltaméthrine a été plus toxique que la perméthrine, elle-même plus toxique que le chlorpyrifos. Les valeurs des DL50 et DL90 les plus faibles sont observées pour *C. imicola* pour les trois matières actives testées. Les intervalles de confiances à 95% (95% IC) (Tableau XI et XII) indiquent une grande variabilité de la réponse pour une même espèce à chaque matière active.

Globalement, pour les trois espèces, nous avons utilisé comme valeurs de référence, les DL50 et DL90 obtenues suivant le même protocole avec ces trois matières actives sur *Culicoides nubeculosus* (Meigen), espèce Paléarctique maintenue en colonie au Cirad de Montpellier et considérée comme sensible aux insecticides (espèce de référence). Ces travaux en cours de publication (Venail *et al.*, 2015) ont permis d'établir les doses diagnostic des trois matières actives concernées (deltaméthrine, perméthrine, chlorpyrifos) pour *C. nubeculosus* et les populations françaises (Corse) de *C. imicola* (Tableau XIII).

La comparaison des sensibilités de *C. imicola* obtenues suivant ce même protocole avec ces trois matières actives par une analyse de modèle de régression logistique, montre que la population du Sénégal est significativement moins sensible que celle de la Corse (France) à la deltaméthrine ($P = 0,016$) ; en revanche elle est significativement plus sensible à la perméthrine ($p < 10^{-3}$) et au chlorpyrifos ($p = 0,021$). Les espèces du Sénégal *C. imicola* et *C. oxystoma* montrent une sensibilité à la deltaméthrine comparable à l'espèce de référence *C. nubeculosus* avec une mortalité légèrement supérieure pour *C. imicola* ($p = 0,178$) et inversement pour *C. oxystoma* ($p = 0,065$) ; alors que *C. kingi* est significativement moins sensible à la deltaméthrine que *C. nubeculosus* ($p = 0,004$). Avec la perméthrine, *C. imicola* et *C. kingi* sont significativement plus sensibles que *C. nubeculosus* ($p < 10^{-3}$) et ($p = 0,025$) respectivement, alors que *C. oxystoma* est statistiquement comparable à *C. nubeculosus*

($P = 0,1120$). Contre le chlorpyrifos, *C. imicola* et *C. oxystoma* sont significativement plus sensibles que *C. nubeculosus* ($p < 10^{-3}$) alors que *C. kingi* a une sensibilité comparable à *C. nubeculosus* ($p < 0,227$).

Globalement, les populations de ces trois espèces du Sénégal semblent sensibles aux trois matières actives testées à l'exception de *C. kingi* avec la deltaméthrine qui montre une baisse de sensibilité par rapport à toutes les autres espèces testées, y compris l'espèce de référence. La DL90 de *C. kingi* pour la deltaméthrine est plus de 10 fois supérieure à la dose diagnostique (DD) de *C. nubeculosus*, de 43,7 fois supérieure à la DD de *C. imicola* et plus de 6 fois supérieure à la DD des moustiques tels qu'*An. gambiae* vecteur majeur du paludisme (0,05% à la deltaméthrine). La baisse de sensibilité de *C. kingi* questionne sur la résistance des *Culicoides* aux insecticides surtout dans une zone de culture maraîchère avec une forte utilisation de pesticides contre les ravageurs de récolte.

Tableau XI : Évaluation de la sensibilité (DL₅₀ et DL₉₀, exprimées en % de matière active/surface) de *Culicoides imicola*, *Culicoides oxystoma* et *Culicoides kingi* à la deltaméthrine, à la perméthrine et au chlorpyrifos.

Matières actives	Espèces								
	<i>C. imicola</i>			<i>C. oxystoma</i>			<i>C. kingi</i>		
	rép (n)	DL50 (95%IC)	DL90 (95%IC)	rép (n)	DL50 (95%IC)	DL90 (95%IC)	rép (n)	DL50 (95%IC)	DL90 (95%IC)
Pyréthrinoïdes									
Deltaméthrine	3 (424)	0,0004 (0,0004-0,0005)	0,0013 (0,0011-0,0016)	2 (295)	0,0012 (NA)	0,0136 (NA)	3 (478)	0,0090 (0,0038-0,0202)	0,3059 (0,0897-5,5020)
Perméthrine	3 (521)	0,0033 (0,0022-0,0045)	0,0161 (0,0109-0,0319)	2 (306)	0,0351 (0,0270-0,0453)	0,3287 (0,2249-0,5435)	2 (299)	0,0191 (0,0151-0,0237)	0,0891 (0,0676-0,1269)
Organophosphoré									
Chlorpyrifos	2 (390)	0,0116 (0,0063-0,0195)	0,0881 (0,0443-0,3688)	3 (347)	0,0351 (0,0080-0,0670)	0,0870 (0,0510-5,5134)	2 (209)	0,0667 (0,0525-0,0822)	0,1201 (0,0939-0,2315)

rép= nombre de réplicat ; n= nombre de *Culicoides* ; DL= dose létale ; (NA = ?)

Tableau XII : Évaluation de la sensibilité (DL₅₀ et DL₉₀, exprimées en mg/m2 de matière active) de *Culicoides imicola*, *Culicoides oxystoma* et *Culicoides kingi* à la deltaméthrine, à la perméthrine et au chlorpyrifos.

Matières actives	Espèces								
	<i>C. imicola</i>			<i>C. oxystoma</i>			<i>C. kingi</i>		
	rép (n)	DL50 (95%IC)	DL90 (95%IC)	rép (n)	DL50 (95%IC)	DL90 (95%IC)	rép (n)	DL50 (95%IC)	DL90 (95%IC)
Pyréthrinoïdes									
Deltaméthrine	3 (424)	0,1819 (0,1477-0,2154)	0,4876 (0,3897-0,6939)	2 (295)	0,4704 (NA)	4,9827 (NA)	3 (478)	3,2806 (NA)	111,35 (NA)
Perméthrine	3 (521)	1,2248 (0,3538-2,2270)	5,8834 (3,0087-74,184)	2 (306)	12,812 (8,3369-19,083)	119,65 (68,402-287,19)	2 (299)	6,9611 (4,7414-9,7813)	32,455 (21,527-59,742)
Organophosphoré									
Chlorpyrifos	2 (390)	4,2406 (0,4197-17,497)	32,079 (NA)	3 (347)	12,801 (NA)	31,703 (NA)	2 (209)	24,2983 (NA)	43,7305 (NA)

rép= nombre de réplicat ; n= nombre de *Culicoides* ; DL= dose létale ; (NA = ?)

Tableau XIII : Evaluation de la sensibilité (DL₅₀, DL₉₀ et DD, exprimées en % de matière active) de *Culicoides nubeculosus* (référence, insectarium Cirad France) et de *Culicoides imicola* (population sauvage Corse, France) aux matières actives de la deltaméthrine, perméthrine et chlorpyrifos d'après Venail et al. 2015.

Matières actives	<i>Culicoides imicola</i>			<i>Culicoides nubeculosus</i>		
	DL ₅₀	DL ₉₀	DD	DL ₅₀	DL ₉₀	DD
	(95%CI)	(95%CI)	(mg/m ²)	(95%CI)	(95%CI)	(mg/m ²)
Deltaméthrine	0,0002	0,0008	0,007	0,0003	0,0019	0,03
	(0,0001-0,0002)	(0,0005-0,0014)	(2,75)	(0,0001-0,0004)	(0,0012-0,0043)	(11,13)
Perméthrine	0,0194	0,0812	0,77	0,0102	0,1045	2,65
	(0,0171-0,0219)	(0,0695-0,0975)	(284,41)	(0,0080-0,0117)	(0,0849-0,1337)	(973,45)
Chlorpyrifos	0,0274	0,1273	1,36	0,0725	0,1661	0,82
	(0,0176-0,0388)	(0,0784-0,3535)	(500,15)	NA	NA	(301,56)

DL= dose létale ; DD= dose diagnostique ; Selon le Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte anti-vectorielle, la dose diagnostique d'un insecticide est égale au double de la CL 100 observée sur la souche sensible (OMS, 1992).

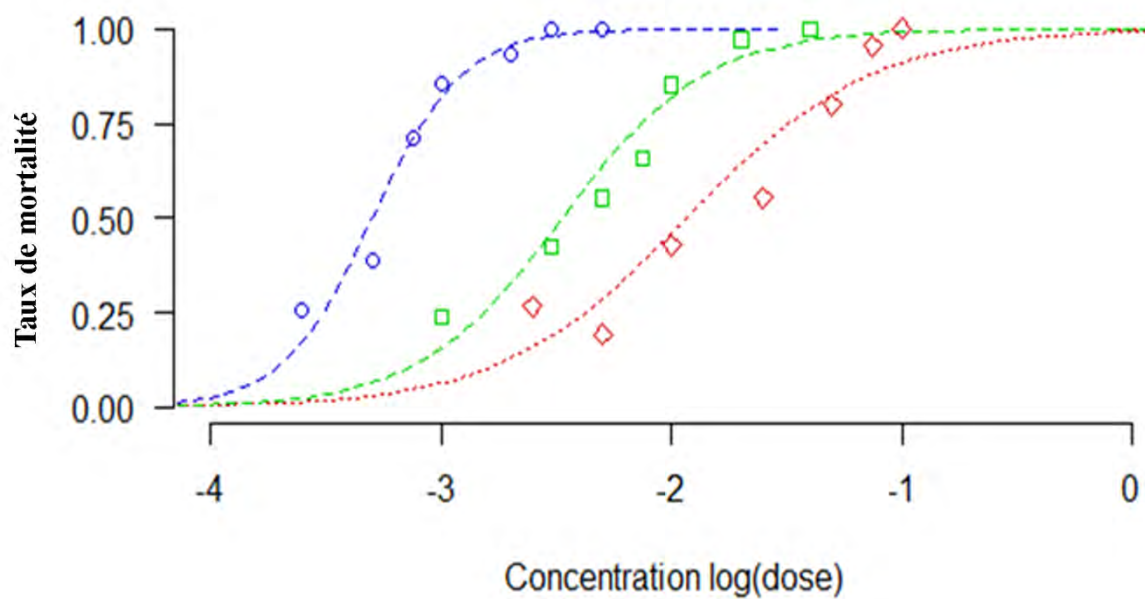


Figure 26 : Sensibilité de *Culicoides imicola* à la deltaméthrine (bleu), à la perméthrine (vert) et au chlorpyrifos (rouge).

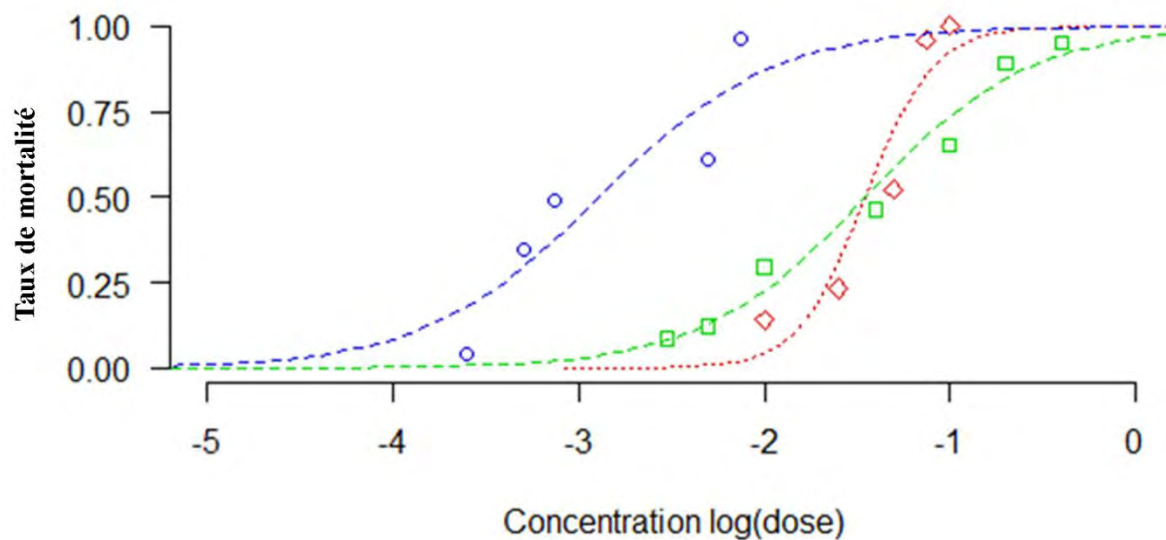


Figure 27 : Sensibilité de *Culicoides oxystoma* à la deltaméthrine (bleu), à la perméthrine (vert) et au chlorpyrifos (rouge).

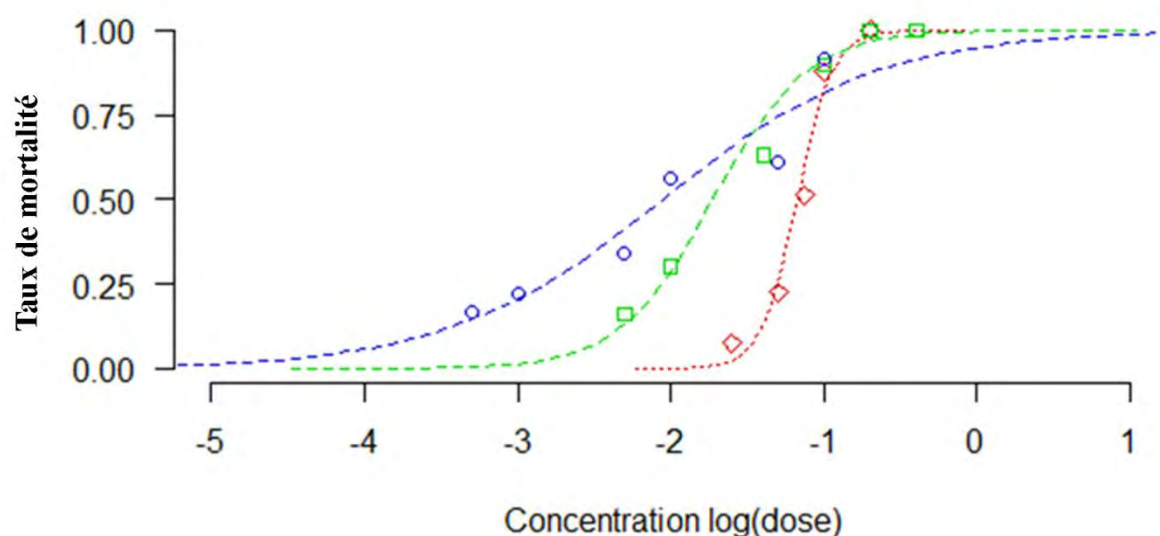


Figure 28 : Sensibilité de *Culicoides kingi* à la deltaméthrine (bleu), à la perméthrine (vert) et au chlorpyrifos (rouge).

3.1.2. Évaluation de l'efficacité d'une moustiquaire imprégnée sur les *Culicoides* : le Zerofly®

Cette étude s'est déroulée dans le site de Hann, entre janvier et février 2014. La famille des Ceratopogonidae a été représentée par trois genres (*Culicoides*, *Forcipomyia* et *Alluaudomyia*). Seules les femelles sont retenues pour analyser les données. Les captures ont été dominées par les genres *Culicoides* et *Forcipomyia* avec respectivement 187 et 89 spécimens collectés (Tableau XIV).

Tableau XIV : Évaluation de l'efficacité de la moustiquaire Zerofly® sur la densité des Ceratopogonidae à l'aide de pièges OVI.

Genres	Témoin				Traités				Tot
	Tot (EP)	Nb / piège / nuit	MR (%)	MD (%)	Tot (EP)	Nb / piège / nuit	MR (%)	MD (%)	
<i>Culicoides</i>	66 (n=5)	13,2	45 (68,18)	6 (28,57)	121 (n=10)	12,1	75 (61,98)	12 (26,08)	187
<i>Forcipomyia</i>	54 (n=5)	10,8	46 (85,18)	3 (37,5)	35 (n=10)	3,5	28 (80)	4 (57,14)	89

Tot= total ; EP= effort de piégeage ; MR= mortalité à la récolte ; MD= mortalité différée ; Nb= nombre ; %= pourcentage

Un total de 187 *Culicoides* femelles a été capturé. Seul l'effectif de *C. oxystoma* a été suffisant à la fois dans le témoin et dans les traités pour être analysé (Tableau XV).

Tableau XV : Évaluation de l'efficacité de la moustiquaire Zerofly® sur la densité des *Culicoides* à l'aide de pièges OVI.

Espèces	Témoin				Traités				
	Tot (EP)	Nb / piège / nuit	MR (%)	MD (%)	Tot (EP)	Nb / piège / nuit	MR (%)	MD (%)	Tot Fem (%)
<i>C. oxystoma</i>	55 (n=5)	11	37 (67,27)	6 (33,33)	78 (n=10)	7,8	41 (52,56)	9 (24,32)	133 (71,12)
<i>C. imicola</i>	6 (n=5)	1,2	5 (83,33)	0 (0)	24 (n=10)	2,4	17 (70,33)	3 (42,85)	30 (16,04)
<i>C. murphyi</i>	2 (n=5)	0,4	2 (100)	-	7 (n=10)	0,7	6 (85,71)	0 (0)	9 (4,81)
<i>C. austeni</i>	0 (n=5)	0	-	-	5 (n=10)	0,5	5 (100)	-	5 (2,67)
<i>C. distinctipennis</i>	0 (n=5)	0	-	-	5 (n=10)	0,5	5 (100)	-	5 (2,67)
<i>C. nivosus</i>	2 (n=5)	0,4	0 (0)	0 (0)	2 (n=10)	0,4	1 (50)	0 (0)	4 (2,14)
<i>C. kingi</i>	1 (n=5)	0,2	1 (100)	-	0 (n=10)	0	-	-	1 (0,53)
<i>C. similis</i>	0 (n=5)	0	-	-	0 (n=10)	0	-	-	0 (0)

Tot= total ; EP= effort de piégeage ; MR= mortalité à la récolte ; MD= mortalité différée ; Nb= nombre

L'analyse de toutes les espèces de *Culicoides* confondues montre que le filet imprégné n'a pas d'effet significatif sur les effectifs capturés ($p = 0,7$) (Figure 29A). Le filet imprégné n'a pas affecté les taux de mortalité instantanée ($p = 0,4$) et différée ($p = 0,9$) versus le filet témoin (Figure 29B et 29C).

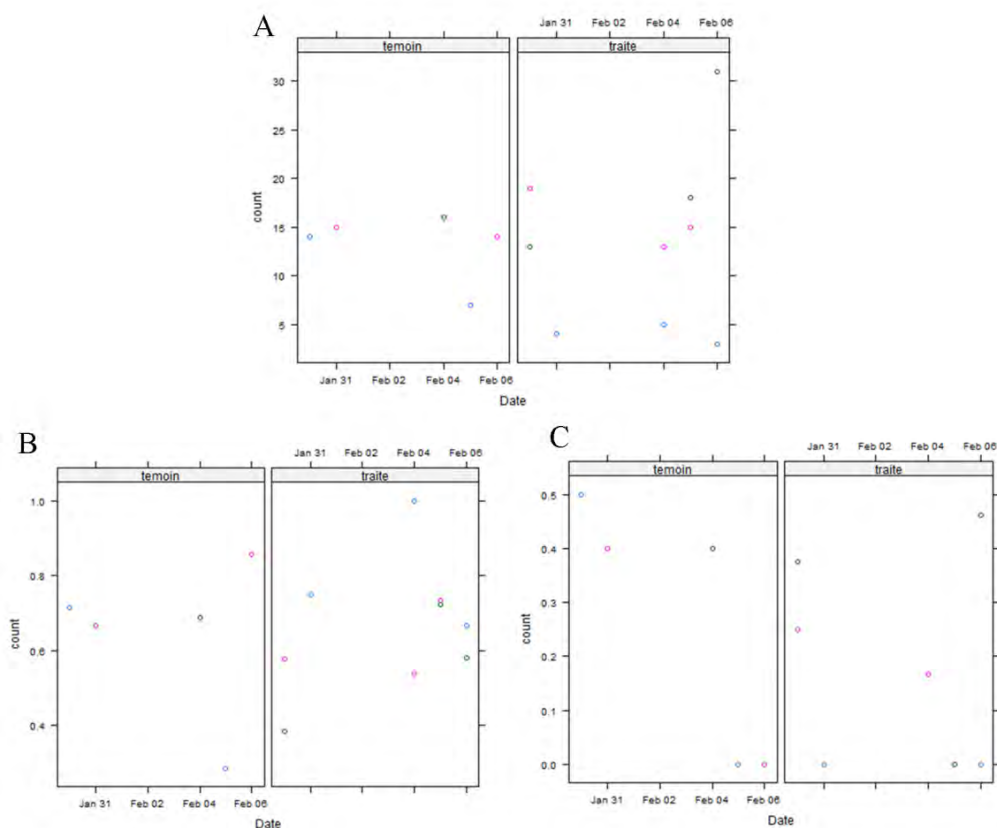


Figure 29 : Effet de la moustiquaire Zerofly® sur les captures de *Culicoides* (toutes espèces confondues). A) Effet du traitement sur les effectifs capturés. B) Effet du traitement sur les taux de mortalité instantanée. C) Effet du traitement sur les taux de mortalité différée à 24h. Les trois couleurs correspondent aux trois sites entre lesquels les pièges lumineux ont été tournés.

A l'échelle de l'espèce, la moustiquaire Zerofly® n'a pas d'effet significatif sur les effectifs capturés de *C. oxystoma* ($p = 0,07$) (Figure 30A). Aussi, aucun effet significatif n'est observé sur les mortalités instantanées ($p = 0,09$) (Figure 30B) et sur les mortalités différées ($p = 0,6$) (Figure 30C). Les captures des spécimens des autres espèces de *Culicoides* n'ont pas été suffisantes pour une analyse statistique.

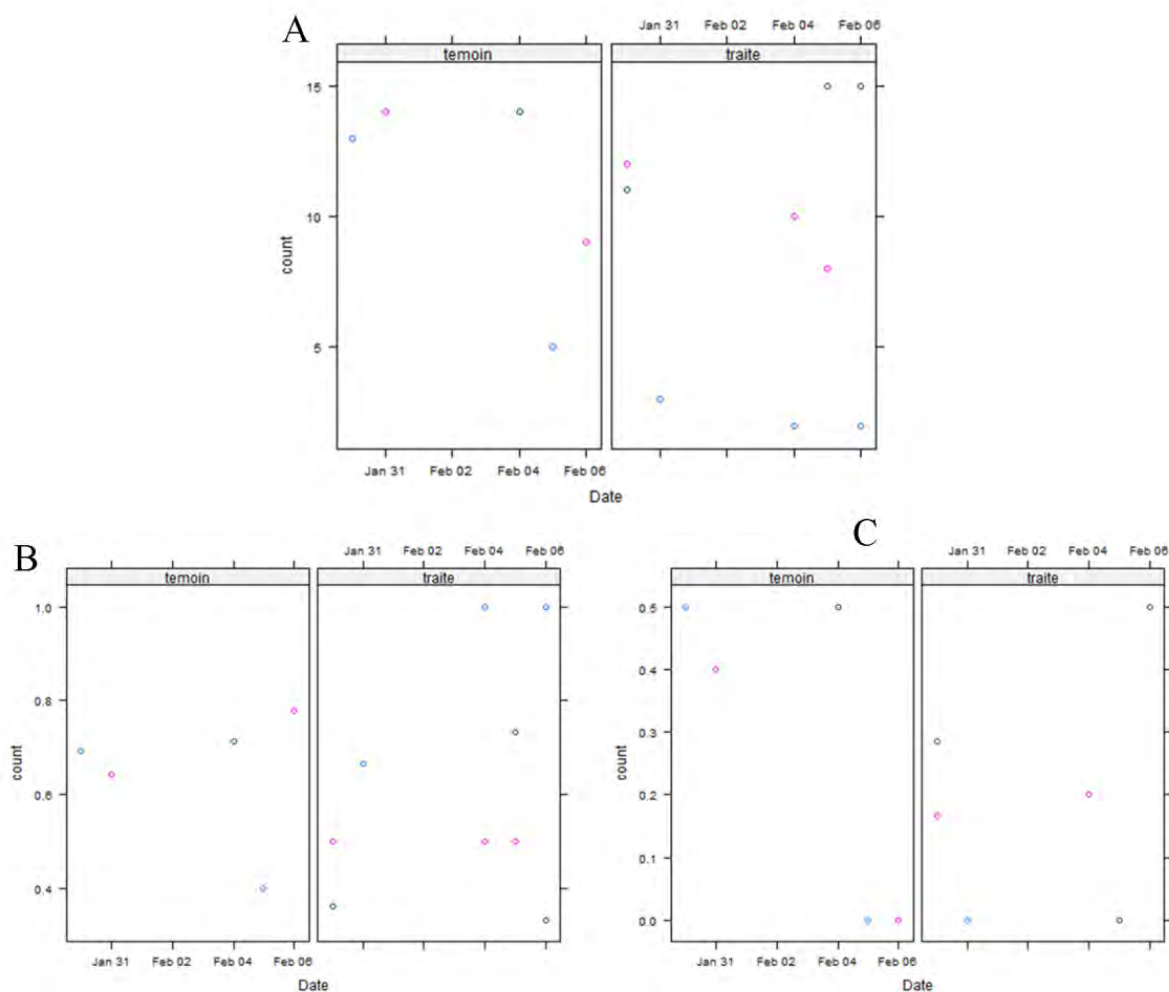


Figure 30 : Effet de la moustiquaire Zerofly® sur les captures de *Culicoides oxystoma*. A) Effet du traitement sur les effectifs capturés. ; B) Effet du traitement sur les taux de mortalité instantanée. C) Effet du traitement sur les taux de mortalité différée à 24h. Les trois couleurs correspondent aux trois sites entre lesquels les pièges lumineux ont été tournés.

L'effet de la moustiquaire Zerofly® a été très significatif en réduisant les captures globales de *Forcipomyia* par rapport au filet témoin ($p < 0,001$) (Figure 31A). Cependant, cet effet n'a pas été significatif sur les mortalités instantanées ($p = 0,5$) (Figure 31B) et sur les mortalités différées ($p = 0,65$) (Figure 31C). Les captures des spécimens du genre *Alluaudomyia* n'ont pas été suffisantes pour être analysées.

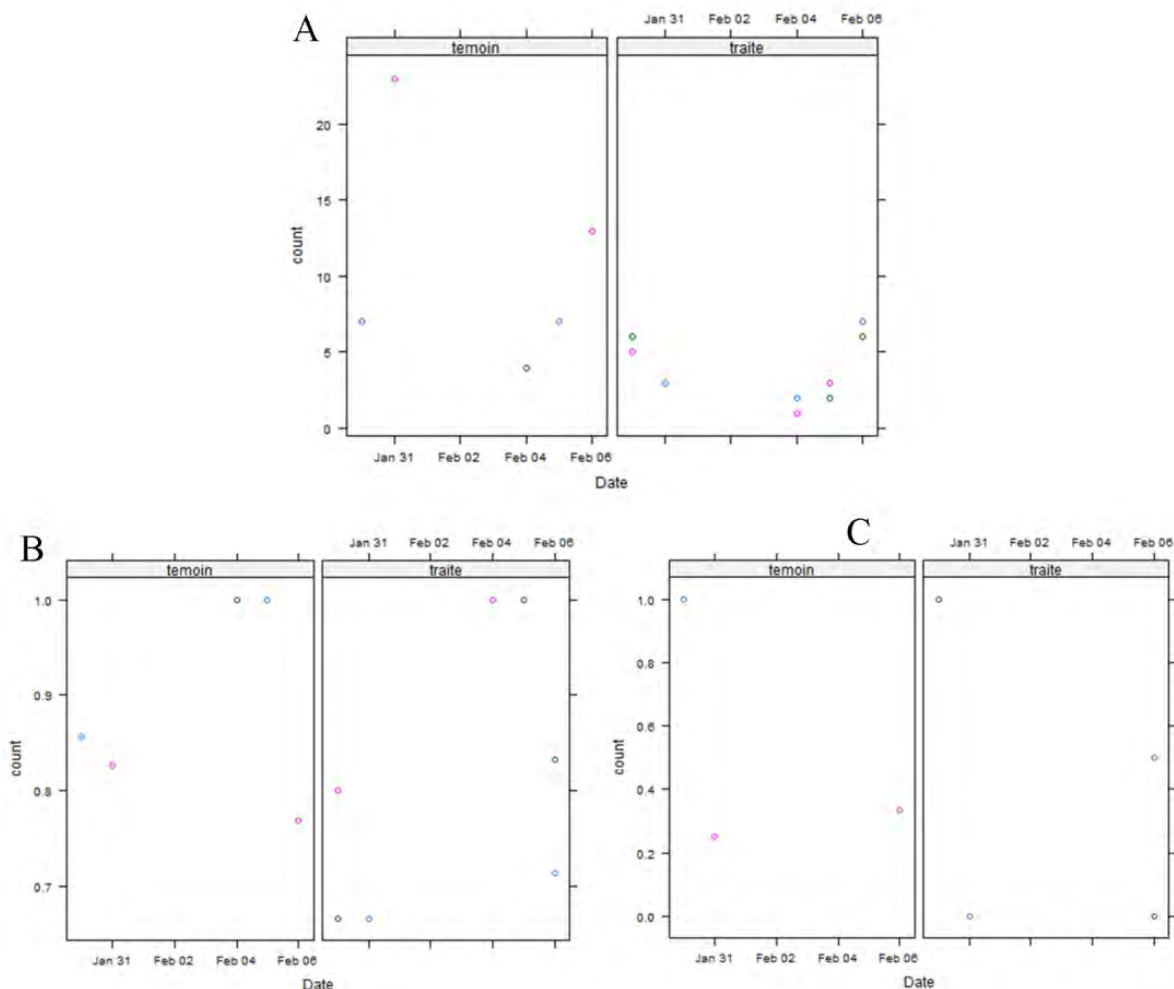


Figure 31 : Effet du traitement sur les captures de *Forcipomyia*. A) Effet du traitement sur les effectifs capturés ; B) Effet du traitement sur les taux de mortalité instantanée ; C) Effet du traitement sur les taux de mortalité différée à 24h. Les trois couleurs correspondent aux trois sites entre lesquels les pièges lumineux ont été tournés.

3.1.3. Évaluation d'un traitement insecticide *Pour-on* contre les *Culicoides* : le Cyperclor®

Cette étude s'est déroulée dans le site de Hann entre les mois de septembre, octobre et novembre 2013 à l'intérieur du LNERV. Sept genres de diptères hématophages ont été recensés dans les captures. Les captures ont été dominées par les genres *Culex* et *Forcipomyia* (Tableau XVI). Le genre *Culicoides* n'est représenté que par 29 individus dont 19 avec le témoin et 10 pour le traité (Tableau XVI).

Tableau XVI : Diversité et effectifs des Culicidae et Ceratopogonidae capturés sur appât mouton témoin et traité au Cyperclor®.

Genres	Mouton témoin					Mouton traité					Tot gén
	n	Ngo	M	Go (%)	Total	n	Ngo	M	Go (%)	Total	
<i>Culex</i>	8	1 088	0	140 (11,4)	1 240	8	362	0	57 (13,6)	430	1 670
<i>Forcipomyia</i>	8	621	0	1 (0,2)	622	8	453	0	1 (0,2)	454	1 076
<i>Anopheles</i>	8	18	0	53 (74,6)	71	8	5	0	7 (58,3)	12	83
<i>Aedes</i>	8	25	0	12 (33,43)	39	8	13	0	3 (18,8)	16	55
<i>Mansonia</i>	8	21	0	13 (38,2)	34	8	5	0	1 (16,67)	8	42
<i>Culicoides</i>	8	10	6	3 (23,07)	19	8	4	5	1 (20)	10	29
<i>Alluaudomyia</i>	8	1	0	0 (0)	2	8	0	1	0 (-)	1	3

n = nombre de capture ; Go = gorgés ; Ngo = non gorgés ; M = mâle ; % = taux de gorgement ; Tot gén= total général

L'analyse générale des Culicidae (toutes espèces confondues) montre une réduction significative des moustiques capturés sur le mouton traité ($p < 10^{-3}$), mais cet effet diminue avec le temps ($p < 10^{-3}$) et disparaît au-delà de 10 jours après traitement (Figure 32A). Les taux de gorgement ont été également réduits de manière significative par le traitement insecticide ($p = 0,05$), mais cet effet était de très court terme (inférieur à une semaine après traitement) (Figure 32B).

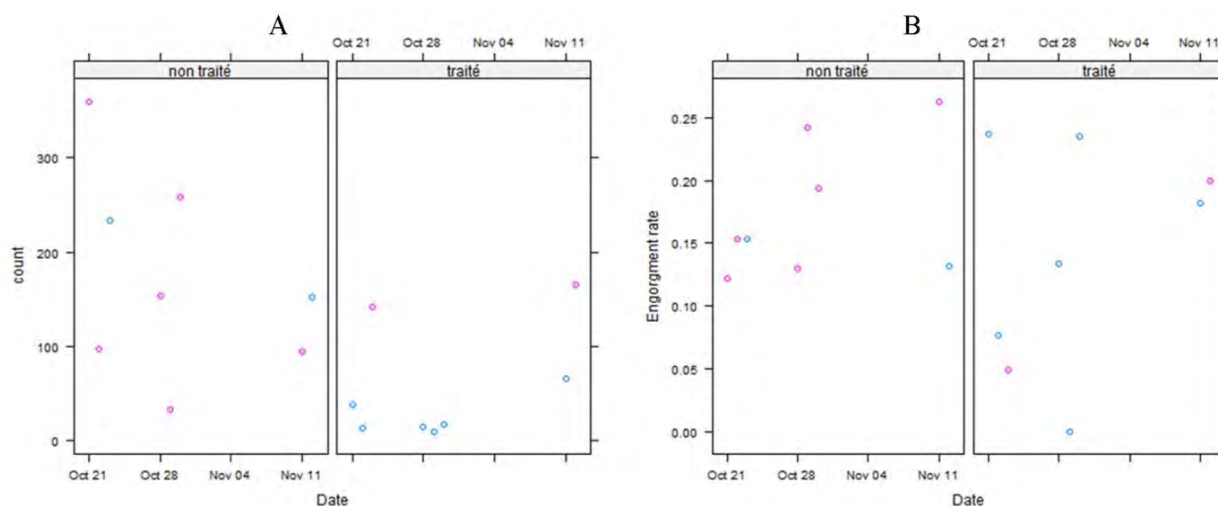


Figure 32 : Impact du traitement Cyperclor® sur les Culicidae (toutes espèces confondues). A) Impact du traitement Cyperclor® sur les effectifs capturés de Culicidae. B) Impact du traitement Cyperclor® sur les taux de gorgement des Culicidae. Les deux couleurs correspondent aux deux sites entre lesquels les moutons ont été tournés.

Les données sur le genre *Culicoides* ne peuvent être traitées en raison des effectifs insuffisants (Tableau XVI). Cette étude devrait être reprise dans une autre localité à une période favorable aux *Culicoides*.

3.2. Discussion

Sensibilité intrinsèque des *Culicoides* à la Deltaméthrine, Perméthrine et au Chlorpyrifos

L'étude de la sensibilité intrinsèque des *Culicoides* aux trois matières actives insecticides a porté sur *C. imicola*, *C. oxystoma* et *C. kingi*. Nous avons ciblé ces trois espèces d'intérêt vétérinaire en raison des résultats des études de bio-écologie que nous avons réalisées localement sur le contact hôte vecteur et les préférences trophiques (cf. partie bio-écologie des *Culicoides* potentiels vecteurs des virus de la PEA et de la FCO au Sénégal) mais aussi de par leur rôle vecteur d'arboviroses animales dans d'autres régions du monde (Mellor *et al.*, 1984; Mellor *et al.*, 2000; Yanase *et al.*, 2005; Venter *et al.*, 2006; Dadawala *et al.*, 2012; Morag *et al.*, 2012).

Les deux pyréthrinoïdes testés (deltaméthrine et perméthrine) ont été plus toxiques que l'organophosphoré (chlorpyrifos). La plus forte toxicité des pyréthrinoïdes par rapport aux organophosphorés est classiquement décrite chez les Culicidae (WHO, 1996, 2013) et a été aussi déjà observée chez les *Culicoides* (Carpenter, Szmargd, *et al.*, 2008; Venail *et al.*, 2015). Au sein des pyréthrinoïdes, la deltaméthrine a été plus efficace sur les *Culicoides* que la perméthrine. Cette toxicité plus importante de la deltaméthrine par rapport à la perméthrine, également connue chez les moustiques (Mosha *et al.*, 2008; Juntarajumnong *et al.*, 2012) et reportée récemment chez les *Culicoides* (Venail *et al.*, 2015), est en rapport avec les propriétés insecticides de la molécule. En effet, les pyréthrinoïdes se divisent en deux groupes : les pyréthrinoïdes du groupe 1 et du groupe 2. Le premier groupe se compose de produits à base d'alcool phenoxybenzyl. Ces pyréthrinoïdes, qui regroupent essentiellement la perméthrine et la bifenthrine, se caractérisent par des toxicités relativement faibles vis-à-vis des mammifères et par une action rapide sur les insectes (effet knock-down = KD). Les chimistes ont par la suite greffé un radical cyano sur la position alpha de l'alcool, donnant ainsi naissance aux pyréthrinoïdes alpha-cyanés, dits de groupe 2. Cette catégorie de produits qui comprend entre autres la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine et l'alpha-cyperméthrine se révèle à la fois plus stable et plus active que les composés du groupe 1.

Peu d'études de sensibilité aux insecticides ont été réalisés sur les espèces de *Culicoides* d'intérêt vétérinaire malgré l'intérêt de mener ces études en préalable à toute évaluation de méthodes de lutte anti-vectorielle, notamment pour vérifier l'absence de résistance.

Ces études sont confrontées chez les *Culicoides* à des difficultés de manipulation (taille réduite, mortalité importante même chez les témoins) et à l'absence ou à la difficulté d'avoir des colonies de *Culicoides* (ce qui limitent les expériences en période d'inactivité des *Culicoides*). Du fait également des difficultés à récolter des larves sur le terrain, d'obtenir des pontes à partir de femelles collectées gorgées ou de gorger des femelles collectées à jeun, et par conséquent d'obtenir en insectarium une première génération d'adultes sur laquelle des tests insecticides pourraient être conduits en conditions standardisées, nous avons réalisé nos tests de sensibilité aux insecticides sur des femelles sauvages collectées sur le terrain.

Ces difficultés sont accentuées par la grande diversité des espèces de *Culicoides* dans les sites de capture. A cela s'ajoute la grande variabilité des captures entre des nuits consécutives pour un même site ou entre sites pour la même nuit aussi bien en quantité de capture qu'en terme d'âge des populations représenté par le ratio de pares et de nullipares. Aussi, la sensibilité aux insecticides dépendant de l'âge, du stade physiologique et du sexe des insectes testés comme cela est clairement démontré chez les *Culicidae* (WHO, 2013), seules les femelles nullipares (à l'abdomen non pigmenté) et non gorgées que nous avons collectées sur le terrain ont été incluses dans nos analyses.

La population locale de *C. imicola* apparaît sensible aux trois matières actives insecticides testées. Les valeurs de référence (DL50, DL90) ne diffèrent pas de celles obtenues avec ces trois matières actives sur une population française (Corse) de la même espèce (Venail *et al.*, 2015). Un essai multicentrique réalisé suivant le même protocole a permis de comparer la sensibilité aux pyréthrinoïdes de plusieurs populations de *C. imicola* issues d'Europe (France, Espagne) et d'Afrique (Sénégal, Afrique du Sud). La population du Sénégal a la même sensibilité à la deltaméthrine que les trois autres populations testées ($p = 0,98$) et à la perméthrine ($p = 0,16$) avec des valeurs de DL50 et de DL90 relativement plus faibles (Venail *et al.*, 2015).

Les populations locales de *C. oxystoma* et plus particulièrement de *C. kingi* apparaissent moins sensibles aux pyréthrinoïdes, notamment à la deltaméthrine. Cette moindre sensibilité pourrait s'expliquer par des différences de milieux de développement larvaire. En effet, les espèces du groupe Schultzei, particulièrement *C. oxystoma* et *C. kingi*, se développent dans la vase aux bords des cours d'eau, des canaux d'évacuation et des flaques d'eau (Cornet, 1969; Ray & Choudhury, 1988; Poddar *et al.*, 1992; Cornet & Brunhes, 1994; Yanase *et al.*, 2013). Nos sites d'échantillonnage sont caractérisés par la présence de périmètres maraichers où sont utilisés des quantités élevées d'insecticides pour lutter contre les ravageurs. Ces insecticides pourraient exercer par lessivage et persistance dans l'environnement une pression de sélection

importante sur les larves de *Culicoides* appartenant à ces deux espèces, d'où une baisse de sensibilité aux pyréthriinoïdes. Cette hypothèse reliée à l'utilisation agricole des insecticides se conçoit dans le contexte des Niayes où l'utilisation vétérinaire des insecticides visant directement les *Culicoides* est relativement limitée.

Des études de sensibilité aux insecticides effectuées sur des populations ouest-africaines d'*An. gambiae*, le moustique vecteur majeur du paludisme en Afrique tropicale, indiquent une résistance croisée au dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT) et aux pyréthriinoïdes dans les zones de culture intensives comme les périmètres cotonniers et maraîchers (Koffi *et al.*, 1999; Diabate *et al.*, 2002; Yadouleton *et al.*, 2009; Faye *et al.*, 2011). La résistance aux pyréthriinoïdes chez *An. gambiae* dans les périmètres agricoles ouest-africains aurait été sélectionné par l'usage de ces insecticides contre les ravageurs de culture avant même la vulgarisation de leur usage médical à travers les méthodes de lutte ciblée contre les vecteurs du paludisme comme les moustiquaires imprégnées (Elissa *et al.*, 1993; Diabate *et al.*, 2002; Yadouleton *et al.*, 2009).

Des enquêtes menées auprès de 450 maraîchers dans la zone des Niayes révèlent que les pesticides utilisés sont essentiellement les organophosphorés avec un taux de 39% d'utilisation, suivis des mélanges divers avec 26% et des organochlorés à 16% (Cissé *et al.*, 2006). D'autres travaux plus récents sur les pratiques d'utilisation des pesticides dans la zone des Niayes ont été réalisés sur quatre sites de cultures maraîchères: Guédiawaye, Thiaroye, Malika et Niague (Diop, 2013). Les enquêtes révèlent que les pesticides appliqués sur les cultures maraîchères appartiennent principalement aux organophosphorés, aux organochlorés, aux carbamates et aux pyréthriinoïdes avec une fréquence d'utilisation de 62,3%, 14%, 13% et 10% respectivement (Diop, 2013). La relative faible sensibilité des populations de *C. kingi* et *C. oxystoma* aux pyréthriinoïdes (deltaméthrine) pourraient donc être liée à l'utilisation massive de pesticides dans les zones maraîchères des Niayes et questionne sur une résistance potentielle aux insecticides de certaines espèces locales de *Culicoides* d'intérêt vétérinaire. La faible sensibilité à la deltaméthrine de la population de *C. kingi* capturée à Niague pourrait être en rapport avec les fortes productions maraîchères (choux et tomate) consommatrices de produits pesticides dans cette localité. Les teneurs en résidus de pesticides y compris de pyréthriinoïdes dans le sol et les légumes dans ce site ont été les plus élevées comme l'ont montré les travaux de Diop (2013).

Des tests de sensibilité additionnels devraient être réalisés sur ces populations de *Culicoides*, avec plusieurs pyréthriinoïdes, sur plusieurs sites (éventuellement identifier des sites „contrôle“ qui seraient le moins pollués possible) et à différentes périodes de l'année (notamment au

moment du ou des pic(s) d'utilisation de ces insecticides dans les périmètres maraichers) afin de confirmer cette résistance. Parallèlement des études biochimiques ou moléculaires pourraient être entreprises pour caractériser le rôle respectif éventuel de mécanismes de détoxification enzymatique de type cytochrome oxydase ou de modification de cible de type *kdr* impliqués chez les insectes dans la résistance aux pyréthrénoïdes (Hemingway, 1995). D'une manière générale, les mécanismes de résistance aux insecticides peuvent être divisés en deux groupes principaux: la résistance métabolique et la résistance par modification du site d'action de l'insecticide (WHO, 2013; Liu, 2015). La résistance métabolique survient en raison de changements dans les systèmes enzymatiques conduisant à une détoxification plus importante et rapide de l'insecticide que la normale, ce qui empêche l'insecticide d'atteindre son site d'action. Dans le cas des moustiques vecteurs du paludisme, trois systèmes enzymatiques sont considérés comme importants : les estérases, les monooxygénases et les glutathion S-transférases (WHO, 2013). La résistance par modification des sites cibles se produit lorsque le récepteur de la protéine insecticide est modifié par une mutation : lorsque cela se produit, l'insecticide ne peut plus se lier au site cible constitué par le récepteur et par conséquent l'insecte est moins touché par l'insecticide. Dans le cas du DDT et des pyréthroïdes, la mutation se produit dans les récepteurs des canaux sodium voltage dépendant cibles de ces insecticides, conférant ce qui est décrit comme la mutation Kdr (*knockdown resistance*). Dans le cas des composés organophosphorés et les carbamates, la mutation a lieu dans l'enzyme acétylcholinestérase (AChE, un neurotransmetteur) cible de ces insecticides, conférant la résistance Ace-1^R (Haubruge & Amichot, 1998; N'Guessan *et al.*, 2003; Djogbénou *et al.*, 2008).

Dans l'étude de l'évaluation de l'efficacité du produit *pour-on* Cyperclor® sur les *Culicoides*, le choix du piège à appât animal s'explique à la fois par les paramètres mesurables (données d'abondances et de taux d'attaque par le ratio des nombres de spécimens collectés gorgés et non-gorgés), mais aussi de simuler les conditions de terrain en conditions contrôlées. Plusieurs autres études ont été menées pour évaluer l'efficacité des applications topiques d'insecticide sur les animaux contre les *Culicoides*. Ces études utilisent le même protocole expérimental. Le produit insecticide est appliqué sur la ligne du dos des animaux et les poils traités sont ensuite coupés, ramenés au laboratoire puis mis directement en contact avec des *Culicoides* ou disposés sur des systèmes de gorgement artificiels à intervalle de temps réguliers (Mullens, 1993; De Raat *et al.*, 2008; Mehlhorn *et al.*, 2008). Une autre approche repose sur le contact direct pendant 3 minutes des femelles de *C. nubeculosus* sur la peau d'animaux témoins ou traités avec une solution *pour-on* de deltaméthrine (Venail *et al.*,

2011). Le choix de l'appât mouton pour notre étude s'explique par l'autorisation d'utilisation du Cyperclor® sur les ovins et non sur les équins, de plus la peste équine africaine et la fièvre catarrhale ovine partagent les mêmes vecteurs : *C. imicola* (Mellor *et al.*, 2000) et probablement *C. oxystoma* dans la région des Niayes au Sénégal comme nous le supposons d'après nos travaux.

La plupart des techniques de contrôle des *Culicoides* impliqués dans la transmission de virus comme la FCO aux ruminants fait appel à des applications d'insecticides sur les animaux. Les produits *pour-on* sont généralement à base de pyréthrinoïdes (deltaméthrine et perméthrine) (Mullens, 1993; De Raat *et al.*, 2008; Mehlhorn *et al.*, 2008; Griffioen *et al.*, 2011; Venail *et al.*, 2011). La rémanence ou persistance d'efficacité de ces produits contre les *Culicoides* varie de 4 à 69 jours suivant les expérimentations (Mullens, 1993; De Raat *et al.*, 2008; Mehlhorn *et al.*, 2008; Schmahl *et al.*, 2008; Schmahl *et al.*, 2009; Griffioen *et al.*, 2011; Venail *et al.*, 2011). Cela montre que les insecticides sont intrinsèquement efficaces, mais se pose le problème de la diffusion et de la rémanence des produits sur le corps de l'animal. Cette hétérogénéité des résultats est aussi le reflet des protocoles différents et démontre ainsi la nécessité de disposer de protocoles simples, robustes et reproductibles. Le problème de diffusion des produits insecticides sur l'hôte a déjà été discuté par Venail *et al.* (2011) et les parties moins poilues comme la tête, le ventre et les pattes sont connues pour être les sites d'attaques des *Culicoides* (Mehlhorn *et al.*, 2008) alors que généralement les produits *pour-on* sont appliqués sur l'échine de l'animal. Les travaux de Mehlhorn *et al.* (2008) ont montré que le traitement avec du Butox 7.5 *pour on* (deltaméthrine) pourrait atteindre les pattes mais pour cela, le produit doit être appliqué directement sur la peau de l'animal. Toutefois, des études sur la quantité d'insecticide présent dans les poils d'un bovin traité avec un *pour-on* de fluméthrine diminuent constamment au fur et à mesure des jours post-application, avec toujours un net gradient entre le dos (plus concentré) et les pattes (moins concentré) (Stendel *et al.*, 1992). Il faut noter que les animaux présentent des différences de pilosité même au sein d'une espèce (comme chez les ovins). Ceci laisse supposer une meilleure diffusion des produits sur les bovins (Carpenter *et al.*, 2007). Chez le mouton, il y aurait nécessité pour être le plus efficace possible de traiter les parties ventrales et ne pas se limiter à la ligne du dos (condition nécessaire pour une diffusion jusqu'au niveau des pattes) et le produit doit en plus entrer directement en contact avec la peau, tout spécialement si la toison est épaisse (Mehlhorn *et al.*, 2008). L'application fréquente d'insecticide sur les animaux pourrait avoir des conséquences sur la santé des animaux mais aussi sur celle des applicateurs ou des consommateurs, ainsi que sur l'environnement et la faune non-cible, si l'on cherchait à

corriger la faible rémanence des produits topiques par le rapprochement des fréquences d'applications. Des études récentes ont montré que l'application de *pour-on* sur les bovins peut contaminer les bouses des animaux impactant négativement sur la survie des bousiers qui les décomposent et l'application locale de produit *pour-on* sur les parties d'attaques (pattes, ventre) permet de réduire significativement la mortalité des bousiers (Vale *et al.*, 2015). En plus des risques sanitaire et environnemental, il y a aussi le coût économique de telles applications répétées. Par ailleurs, différents groupes d'animaux ont été comparés en Australie en fonction du traitement insecticide reçu : boucle auriculaire (diazinon, un organophosphoré), deltaméthrine en *pour-on* (25 g/L à 4 ml/100 kg), fluméthrine en *pour-on* (75 g/L à 10 ml/100 kg) ou application de fenvalerate, un organophosphoré (200 g/L). Les résultats montrent que seul le traitement *pour-on* à la deltaméthrine diminue le risque de transmission du virus de la FCO (Melville *et al.*, 2004).

Outre l'application de produits insecticides sur les animaux, l'utilisation de filets moustiquaires imprégnés d'insecticide, méthode sélective ne représentant pas de risque pour l'animal et l'environnement, a été expérimentée dans le but de réduire les attaques de *Culicoides* contre les animaux.

Peu d'études ont été menées sur l'efficacité de l'utilisation des filets moustiquaires imprégnés contre les *Culicoides*. La moustiquaire non imprégnée d'insecticide constitue à elle seule une barrière physique (Page *et al.*, 2014) pour peu que la taille de la maille soit adaptée à la taille de l'insecte cible. L'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide apporte plus d'avantage qu'une moustiquaire non traitée dans la lutte contre les *Culicoides* du fait de la petite taille de ces insectes et de la nécessité de ne pas trop réduire la taille des mailles afin de maintenir une certaine aération. L'obstruction des ouvertures des boxes de chevaux avec une moustiquaire à mailles fines non traitée peut réduire jusqu'à 14 fois les quantités de capture de *C. bolitinos*, vecteur endophage du virus de la PEA (Meiswinkel *et al.*, 2000). Certaines études démontrent l'efficacité des filets imprégnés de pyréthrianoïdes contre les *Culicoides* (Calvete *et al.*, 2010; Delrio *et al.*, 2014; Page *et al.*, 2014). Page *et al.* (2014) ont utilisé une moustiquaire de 0,3 mm de diamètre de trou contre *C. imicola* en Afrique du Sud. En Europe, les travaux de Delrio *et al.* (2014) montrent notamment l'efficacité de la moustiquaire en polyéthylène commercialisée (Zero Vector® approximativement 24 trous/cm²) traitée à 15% avec la deltaméthrine contre les *Culicoides*. L'inefficacité du Zerofly® sur les populations de *Culicoides* dans nos évaluations menées au Sénégal pourrait s'expliquer par la taille des mailles de la moustiquaire utilisée (1,5x1,5 mm). En effet, le Zerofly est utilisé comme filet imprégné dans la lutte contre les glossines. La taille importante des mailles du filet Zerofly®

ne permet pas aux *Culicoides* lors de son passage à travers la maille d'être suffisamment longtemps en contact avec la moustiquaire et d'absorber une dose efficace d'insecticide. En effet, des essais en laboratoire montrent que l'efficacité d'une moustiquaire imprégnée dépend de la réduction des taux de passage et par conséquent du temps de contact des *Culicoides* avec la moustiquaire (Page *et al.*, 2014). L'efficacité d'un support imprégné dépend de la quantité de matière active disponible, du temps de contact de l'insecte avec le support traité et de la sensibilité de la population d'insecte visée vis-à-vis du produit insecticide utilisé sur le support.

La méthode expérimentale développée ici est celle de Page *et al.* (2014), avec une légère modification. La modification consiste à remplacer le pot de collecte par une cage de collecte afin de quantifier les mortalités instantanées (à la récolte) et différées (24h) des *Culicoides* ayant été en contact avec le filet moustiquaire. Ce protocole nous permettrait de mesurer la protection individuelle (réduction du taux de passage) et collective (taux de mortalité) de la moustiquaire à tester. Par ailleurs, cette méthodologie est très laborieuse et elle est surtout limitée par la forte mortalité des *Culicoides* liée à la densité de collecte mais également à l'action du flux d'air du ventilateur qui tout au long de la nuit aura tendance à dessécher les individus capturés. En outre, les faibles densités de capture observées dans notre expérimentation seraient liées à la période de l'étude. En effet, cette étude s'est déroulée en période sèche froide (janvier et février), caractérisée par de faibles captures de *Culicoides* sur le site. L'effet du Zerofly® sur les *Forcipomyia* est probablement lié à une différence de sensibilité aux insecticides mais aussi à leur taille plus importante et donc un temps de contact avec la moustiquaire traitée relativement plus long permettant à l'insecticide d'agir, en réduisant le taux de passage et en entraînant une mortalité plus élevée chez les spécimens collectés dans le piège traité.

D'une manière générale, l'utilisation de filets moustiquaires contre les *Culicoides* n'est pas sans inconvénients. Le principal obstacle à l'utilisation de moustiquaires contre les *Culicoides* est la petite taille de ces moucheron piqueurs, en particulier *C. imicola*, vecteur du virus de la peste équine. Ceci nécessite l'adoption de moustiquaire à maille très fine pour que les *Culicoides* puissent être bloqués ou suffisamment retenus pour absorber une quantité mortelle d'insecticide. Aussi, l'adoption de telles moustiquaires pourrait constituer un problème en région tropicale pour la protection vis-à-vis de la PEA en raison d'une trop faible aération des boxes à chevaux (favorisant une augmentation de la température) et surtout dans le contexte du Sénégal avec la présence de races exotiques d'origine européenne comme les purs sangs anglais très sensibles à la chaleur. Des études d'utilisation de moustiquaire de lit montrent une

altération du confort par augmentation de la température qui peut atteindre 49°C sous la moustiquaire en période de chaleur alors que la température moyenne dans la nuit à 21 heures se situait entre 26,2 et 33,1°C comme cela a été montré en Gambie (Von Seidlein *et al.*, 2012).

Chapitre IV : DISCUSSION GÉNÉRALE

Différents moyens de lutte peuvent être envisagés contre les *Culicoides*. Nos travaux ont porté essentiellement sur les aspects de lutte chimique. Outre la phase préliminaire qui consiste à déterminer au laboratoire la sensibilité intrinsèque des espèces de *Culicoides* à une matière active insecticide donnée (détermination des doses létales 50 ou 90% (DL50 ou DL90)), l'évaluation de l'efficacité d'un produit ou d'une formulation insecticide passe par 3 phases : la phase I, qui consiste à déterminer en conditions expérimentales au laboratoire l'efficacité du produit sur des paramètres entomologiques tels que le taux de mortalité et l'inhibition du gorgement, la phase II, qui consiste à tester en conditions contrôlées sur le terrain l'efficacité du produit sur des paramètres entomologiques tels que l'effet répulsif à distance, l'effet irritant au contact, le taux de mortalité et l'inhibition du gorgement, et la phase III, qui consiste à évaluer en conditions contrôlées sur le terrain l'efficacité du produit sur la transmission de l'agent pathogène en mesurant chez l'hôte des paramètres parasitologiques ou virologiques et cliniques (incidence, morbidité, mortalité).

De nombreuses méthodes de lutte anti-vectorielle existent, leur application n'est envisageable qu'après une étude approfondie de l'espèce vectrice cible sur le plan taxonomique (identité du vecteur), écologique et biologique (identification et fonctionnement/dynamique des gîtes larvaires, comportement de pique et de repos des adultes). Ainsi, dans le contexte du Sénégal où les dernières études sur les *Culicoides* dataient de plus de deux décennies et n'avaient qu'un caractère taxonomique, la lutte contre ces vecteurs doit passer au préalable par une identification taxonomique précise du ou des vecteurs impliqués et une amélioration des connaissances sur leur biologie et leur écologie.

Il existe plusieurs techniques de collecte des *Culicoides* mais le piège lumineux de type OVI est le plus facile et le plus couramment utilisé. Ce piège permet de maximiser l'abondance et la diversité des *Culicoides* capturés comparativement aux pièges à appât (Viennet *et al.*, 2011; Scheffer *et al.*, 2012) et est plus performant en terme de rendement de capture des *Culicoides* d'intérêt vétérinaire par rapport à quatre autres types de pièges lumineux : RIEB, mini-CDC, Pirbright, BG-sentinelle (Venter, Labuschagne, *et al.*, 2009). Néanmoins, ce piège n'est pas adapté pour étudier le contact hôte-vecteur et estimer les taux de piqûres. Ainsi pour des études épidémiologiques plus fines, le piège à appât animal, plus sélectif, est le mieux indiqué. Le piège à appât fait appel à une aspiration directe sur l'animal avec ou sans tente moustiquaires ou à l'aide d'une couverture collante (El Sinnary *et al.*, 1985; Carpenter,

Szmaragd, *et al.*, 2008; Viennet *et al.*, 2011; Scheffer *et al.*, 2012; Viennet, Garros, Gardes, *et al.*, 2012). L'aspiration directe sur l'animal est principalement limitée par le biais que constitue la présence de l'homme à côté de l'animal, mais aussi par l'utilisation de la lumière pour la collecte des *Culicoides* après le coucher du soleil, par l'agitation de l'animal et par le manque de connaissance sur la durée d'un repas de sang et le site précis de gorgement sur l'animal d'un *Culicoides*. Tous ces facteurs peuvent avoir un impact positif ou négatif sur le rendement des captures. La couverture collante est très laborieuse à mettre en place mais également pour récupérer en bon état les individus collés et renseigne peu sur les taux de gorgement. De plus, elle ne permet pas de couvrir certains sites d'attaque des *Culicoides* comme la tête et les pattes. L'utilisation en parallèle de pièges lumineux de type OVI et de piège à appât est justifiée à la fois par nos faibles connaissances sur la diversité et la bio-écologie des *Culicoides* du Sénégal et des vecteurs potentiels des virus de la PEA et de la FCO. L'avantage de l'utilisation d'un piège à appât est d'être sélectif sur les espèces de *Culicoides* attirées vis à vis de l'espèce hôte utilisé, mais aussi de pouvoir renseigner sur leurs rythmes d'activité, notamment pour les espèces à activité diurne, et sur leurs préférences trophiques. En effet, les pièges lumineux fonctionnent du crépuscule à l'aube du fait du contraste avec la lumière du soleil pendant la journée et fournissent donc des informations sur la seule activité nocturne des *Culicoides*. Les choix des appâts utilisés sont justifiés par les hôtes les plus affectés par la PEA (cheval) et la FCO (mouton). L'utilisation de pièges appâtés avec un rat s'est avérée totalement infructueuse vis-à-vis des *Culicoides* (Auriault, 1977). D'autres études ont montré des différences de captures suivant les hôtes proposés (Koch & Axtell, 1979; Viennet *et al.*, 2011). Ainsi, les rendements d'un piège à appât sont fonction de la spécificité des vecteurs aux hôtes utilisés comme appât.

Le choix d'hôte par les insectes hématophages est un facteur déterminant l'intensité de la transmission des pathogènes associés (Gubbins *et al.*, 2008). Définir la communauté d'hôtes des insectes hématophages est essentiel pour identifier les espèces d'insectes et de vertébrés impliquées dans le cycle de transmission de maladies vectorielles, avec comme conséquences la possibilité d'influencer l'intensité de la transmission en jouant sur l'abondance et la localisation des hôtes (par exemple, éloigner les porcs des habitations, hôtes amplificateurs du virus de l'encéphalite japonaise, transmis à l'homme par *Culex tritaeniorhynchus* (Giles) dans les rizières asiatiques (Viennet, 2011; Lassen *et al.*, 2012)). Chez les arthropodes hématophages, le choix de l'hôte est principalement déterminé par des facteurs écologiques et la disponibilité de l'hôte (Gillies, 1972; Takken & Verhulst, 2013).

Les préférences trophiques des insectes hématophages peuvent être évaluées par deux approches. La première, dite directe, fait appel à une comparaison des abondances récoltées dans différents pièges à appât (Hair & Turner, 1968; Sullivan *et al.*, 1971). La plupart des études comparant l'attractivité de différents hôtes pour les *Culicoides* à l'aide de pièges à appât ont été réalisées aux Etats-Unis (Hair & Turner, 1968; Humphreys & Turner, 1973; Tanner & Turner, 1974; Schmidtman *et al.*, 1980). La méthode de capture sur appât permet, par maîtrise du dispositif expérimental (la méthode de référence est celle du carré latin avec des répétitions de rotation d'hôtes), de mesurer l'attractivité de l'hôte en exposant un nombre connu d'hôtes et en quantifiant la part relative de chaque espèce d'insecte sur chacun des hôtes exposés (Balenghien *et al.*, 2011).

La seconde, qualifiée d'indirecte, repose sur l'identification de l'origine des repas de sang de femelles capturées gorgées (Murray, 1970; Kay *et al.*, 2007). Elle nécessite la collecte importante de femelles gorgées et donc de connaître les lieux et période de repos, ainsi que la dynamique des différentes étapes du cycle gonotrophique de l'espèce incriminée. Aussi, l'analyse des données doit tenir compte de la distribution spatiale des hôtes potentiels dans et autour des sites d'échantillonnage en tenant compte de l'activité de recherche d'hôte des femelles des espèces locales de *Culicoides* : rythme horaire, sites de repos, dispersion (Garros *et al.*, 2011; Viennet, Garros, Gardes, *et al.*, 2012). Cette approche est utilisée pour déterminer l'origine des repas de sang par différentes méthodes dont la méthode PCR (Bartsch *et al.*, 2009), le séquençage puis la comparaison des données par homologie de séquences sous GenBank (Lassen *et al.*, 2011; Ninio *et al.*, 2011). Toutefois, ces méthodes sont imprécises du fait du nombre limité d'espèces d'hôtes disponibles, (Bartsch *et al.*, 2009), du temps nécessaire pour les différentes étapes d'amplification et de séquençage des données et du nombre limité de séquences de références présentes sous GenBank (Lassen *et al.*, 2011; Ninio *et al.*, 2011). Ainsi une autre méthode fait appel à une PCR multiplex. Ces PCR ont été développées pour identifier les origines des repas de sang avec des amorces d'hôtes potentiels de bétail et de faune domestique et sauvage (bovins, chèvres, moutons, cerf, chevreuil, chamois, chien, porc, chat, cheval). Elles ont été conçues et multiplexées avec le gène mitochondrial du cytochrome b (Garros *et al.*, 2011).

L'activité de recherche d'hôtes se déroule à des heures sélectionnées pour maximiser le succès du repas sanguin, c'est-à-dire au moment où les hôtes sont disponibles afin de minimiser la mortalité au moment de ces déplacements (périodes favorables en terme de températures et d'humidité) (Auriault, 1977; Viennet, 2011). Chez les *Culicoides*, le rythme circadien est peu étudié. Les espèces de *Culicoides* sont principalement décrites comme

crépusculaires, pouvant poursuivre leurs activités pendant la nuit. Certaines espèces présentent deux pics d'activité, un juste après le lever du soleil et l'autre autour du coucher de soleil comme chez *C. furens*, *C. barbosa* (Wirth et Blanton) (Kettle, 1969; Lillie *et al.*, 1987), *C. impunctatus* (Blackwell, 1997) *C. sonorensis* (Mullens, 1995), *C. actoni* (Bellis *et al.*, 2004). Alors que d'autres comme *C. peregrinus*, *C. bundyensis* et *C. brevipalpis* sont plutôt nocturnes (Bellis *et al.*, 2004). Cependant, peu d'études ont décrit rigoureusement le rythme circadien sur 24 heures consécutives (D. R. Barnard & Jones, 1980; Lillie *et al.*, 1987; Van der Rijt *et al.*, 2008; Viennet, Garros, Rakotoarivony, *et al.*, 2012).

En dehors de l'Afrique du Sud, très peu d'études ont été réalisées sur la biologie des espèces africaines du genre *Culicoides*. Les seules études approfondies ont été faites au Cameroun (Nicholas, 1953), au Gabon (Auriault, 1977) et au Congo (Vattier-Bernard *et al.*, 1986; Itoua *et al.*, 1987) et concernent essentiellement *C. grahamii*. Cette espèce est fortement anthropophile, responsable de nuisances importantes et décrite comme vectrice de la filariose humaine à *M. perstans* en Afrique de l'Ouest (Sharp, 1927; Hawking, 1977; Simonsen *et al.*, 2010) et son activité trophique est étroitement liée au lever et au coucher du soleil. D'autres études réalisées au Soudan, montrent que *C. kingi* a une activité de vol diurne (El Sinnary *et al.*, 1985).

Les espèces Afro-tropicales *Culicoides kumbaensis* (Callot, Kremer, Mouchet et Bach), *C. fulvithorax*, *C. dubitatus* et *C. trifasciellus*, semblent plutôt zoo-anthropophiles (Itoua *et al.*, 1987). Par ailleurs, les conclusions portant sur *C. austeni* ou *C. schultzei*, ne pouvant être rapportées avec certitude à un taxon précis, sont difficilement interprétables et nécessiteraient de nouvelles captures dans les régions Afro-tropicales où ces espèces sont présentes.

Les différences de captures entre l'étude du rythme circadien de *C. oxystoma* et celle du suivi de la dynamique réalisé dans le même site s'expliquent par les appâts utilisés (mouton et cheval respectivement). Ces divergences sont confirmées par l'étude des préférences trophiques couplée au rythme circadien des potentiels vecteurs des virus de la PEA et de la FCO qui s'est déroulée à Thiès et qui a comparé deux appâts animaux (mouton et cheval). La prédominance d'une espèce dans les captures est fonction de sa préférence trophique et de sa biologie. La présence et la prédominance de *C. oxystoma* est originale dans une région où la peste équine est endémique. *Culicoides oxystoma* est l'espèce dominante dans les sites de Mbao, Parc de Hann et de Thiès. *Culicoides kingi* est une espèce halophile (Cornet & Brunhes, 1994), elle est l'espèce dominante à Niague. Son absence dans les études de préférences trophiques et/ou de rythme circadien s'explique à la fois par le choix des sites d'études (Parc Hann et Thiès) mais aussi par ses préférences trophiques orientées surtout

envers les bovins, justifiant son abondance importante dans les pièges lumineux – non spécifique - par rapport au piège à appât cheval dans le site de Niague, alors que *C. imicola* et *C. oxystoma* ont une préférence marquée pour les chevaux.

Afin de détourner les attaques des *Culicoides* des hôtes sensibles comme les moutons et les chevaux, les bovins peuvent être utilisés comme des leurres/écrans (Du Toit, 1962; Nevill, 1978). L'association de *C. bolitinos* avec les bovidés limite cette approche de lutte contre les *Culicoides* dans le cas de la PEA (Meiswinkel & Paweska, 2003). En effet, associer des chevaux avec des bovins dans un élevage augmente le risque de contact entre *C. bolitinos*, vecteur avéré du virus de la PEA, et les chevaux (Meiswinkel & Paweska, 2003), mais peut détourner les attaques de *C. kingi* des chevaux vers les bovins.

Cette activité de recherche d'un hôte pour un repas de sang s'effectue à des périodes spécifiques. La connaissance de l'activité nycthémérale d'un vecteur est très utile dans le développement de stratégies de lutte contre les *Culicoides*. Ainsi, en Afrique du Sud, rentrer les chevaux dans les écuries pendant la nuit a permis de prévenir l'infection des chevaux par le virus de la peste équine en réduisant le taux de piqûre du vecteur principal *C. imicola* (B. J. H. Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). En effet, *C. imicola* est une espèce nocturne et exophage (Meiswinkel *et al.*, 2000) et ce comportement a également été observé au Sénégal. Les études de préférences trophiques couplées à une étude d'activité circadienne montrent également une activité de recherche d'hôtes nocturne pour *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis*. En revanche, *C. oxystoma* présente une activité de vol bimodale, observée essentiellement au coucher mais aussi au lever du soleil. Cette étude des périodes d'activités des *Culicoides* a permis également de capturer une espèce du genre *Forcipomyia*, du sous-genre *Lasiohelea* (*Lasiohelea spp*) d'activité diurne. L'activité de cette espèce est importante sur le cheval et le mouton. A notre connaissance, aucune étude documentée ne porte sur un rôle vectoriel éventuel de ce sous-genre à l'exception d'une suspicion dans la transmission de parasites du genre *Leishmania* au kangourou rouge Australie (Dougall *et al.*, 2011).

L'activité matinale, observée sous certaines conditions favorables de température et d'hygrométrie de *C. oxystoma*; sa présence dans les rizières comme au Sud du Japon (Yanase *et al.*, 2013), rendraient complexe le schéma de transmission de la PEA au Sénégal si cette espèce s'avère compétente pour ce virus. La fréquentation des zones de pâturage, des mares par les animaux pour s'abreuver et l'utilisation des chevaux dans les activités agricoles augmentent le risque de contact des chevaux et/ou des moutons avec *C. oxystoma* qui a une activité matinale selon les saisons et des gîtes larvaires localisés dans les bordures des cours

d'eau et des flaques d'eau. L'activité crépusculaire de *C. oxystoma* et journalière de *Lasiohela* sp, montre aussi l'intérêt de l'utilisation du piège à appât dans une étude épidémiologique et l'importance d'orienter aussi la lutte contre les espèces pouvant piquer la journée.

Très peu d'études ont été menées sur la sensibilité des *Culicoides* aux insecticides avec un protocole standard. La relative faible sensibilité des populations de *C. oxystoma* et de *C. kingi* aux pyréthrinoides et au chlorpyrifos pourrait contribuer à l'absence d'efficacité du produit *pour-on* Cyperclor® et de l'écran imprégné Zerofly® et questionne sur la résistance des *Culicoides*. Cette sensibilité moindre de ces espèces locales méritent d'être confirmée par des études complémentaires, notamment des bioessais, et si cela se confirme de caractériser les mécanismes impliqués.

La lutte contre les *Culicoides* d'intérêt vétérinaire est encore limitée par le manque de méthodes efficaces en conditions de terrain en raison d'une absence de protocoles standard pour évaluer l'efficacité d'un produit contre ces moucherons.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude des *Culicoides* est particulièrement limitée par la grande diversité des espèces du genre, leur petite taille et surtout par le flou taxonomique autour de ce genre. Cette dernière difficulté est liée aux données fragmentaires illustrées par des clés locales ou régionales souvent très anciennes et présentant de nombreuses synonymies ou n'intégrant pas des espèces nouvellement décrites.

L'inventaire faunistique réalisé dans une partie relativement restreinte au sud de la zone des Niayes a permis d'actualiser la liste des *Culicoides* pour le Sénégal qui passe de 34 à 53 espèces. Cet inventaire a permis d'identifier, pour la première fois, la présence de *C. oxystoma* en région Afro-tropicale et au Sénégal en particulier. Cette étude a permis également de mettre en évidence la présence de *C. bolitinos*, espèce en seconde position des vecteurs de la peste équine africaine en région Afro-tropicale derrière *C. imicola* (Venter *et al.*, 2000; Meiswinkel & Paweska, 2003) et d'identifier le mâle jusque-là inconnu de *C. yankari*. Au Sénégal, au moins 4 espèces composent le groupe *Schultzei* : *C. enderleini*, *C. kingi*, *C. nevillei*, et *C. oxystoma*. D'autres espèces appartenant au groupe *Imicola* comme *C. bolitinos* et *C. miombo* et au groupe *Milnei* comme *C. austeni*, *C. hortensis*, *C. milnei*, *C. quinquelineatus* et *C. wansonii* ont été aussi identifiées pour la première fois au Sénégal. Nos études ont permis de mettre en évidence trois espèces potentiellement impliquées dans la transmission de la peste équine dans la région des Niayes au Sénégal (*C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. kingi*) représentant plus de 98% des captures globales sur appât cheval, avec plus de 94% pour *C. oxystoma* à elle seule. Les *Culicoides* présentent une large variété d'hôtes. Les études comportementales des potentiels vecteurs des virus de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine montrent que le cheval constitue l'hôte préféré de *C. imicola* et *C. oxystoma*. En revanche, *C. kingi* est plutôt attiré par les bovins. Ces travaux présentent par ailleurs les premières données sur l'activité circadienne de *C. oxystoma*, présentant une activité bimodale au lever et au coucher du soleil, comme décrit pour d'autres espèces de *Culicoides*. Cette activité de vol est principalement nocturne chez *C. imicola*, *C. bolitinos* et *C. pseudopallidipennis*.

L'étude de la sensibilité intrinsèque des potentiels vecteurs de la peste équine au Sénégal aux insecticides, montre une sensibilité décroissante aux 3 matières actives testées pour *C. imicola*, *C. oxystoma* et *C. kingi*. La deltaméthrine a été le principe actif le plus toxique suivi de la perméthrine et du chlorpyrifos qui apparaît comme le moins toxique. La comparaison de la sensibilité des espèces du Sénégal avec *C. nubeculosus*, espèce de la région

Paléarctique entretenue en élevage, par défaut de populations sensibles de références, indique que *C. imicola*, *C. oxystoma* et *C. kingi* sont sensibles aux 3 matières actives testées avec toutefois une sensibilité réduite de *C. kingi* à la deltaméthrine. L'étude de l'efficacité d'un produit insecticide en formulation *pour-on*, le Cyperclor, contre les *Culicoides* n'a pas été concluante en raison d'insuffisance des données. L'utilisation des insecticides en formulation *pour-on* est la méthode la plus couramment utilisée dans la lutte contre les *Culicoides* chez les ruminants en Europe en cas de risque de FCO, du fait notamment de la recommandation actuelle de ces produits contre les tiques et les mouches de ferme. Cependant, leur impact limité sur l'abondance des captures de *Culicoides* et leur faible biodisponibilité et rémanence semblent indiquer qu'ils ne sont pas adaptés comme outil de lutte opérationnel contre ces moucherons. L'inefficacité du zerofly dans nos expériences serait consécutive à la grande maille de la moustiquaire testée. L'utilisation de filets imprégnés avec une taille de maille adaptée pourrait être envisagée mais poserait un problème d'adoption en zone tropicale.

PERSPECTIVES

Suite à ces travaux, il serait intéressant d'évaluer au laboratoire les compétences vectorielles des espèces locales identifiées comme potentiellement vectrices vis-à-vis des sérotypes des virus de la PEA et de la FCO présents au Sénégal. Il serait également intéressant d'étendre les études de diversité et de bio-écologie des *Culicoides* dans les autres écosystèmes du Sénégal et sur différents hôtes. En effet, la zone des Niayes constitue un écosystème particulier et travailler uniquement dans des centres équestres a pu biaiser les études sur les préférences trophiques des *Culicoides*. Néanmoins, ces travaux constituent une base certaine dans l'étude de la peste équine africaine tant sur les vecteurs que sur les hôtes dans d'autres zones du Sénégal.

L'identification à l'espèce des *Culicoides* repose sur la morphologie et la morphométrie. L'identification morphologique des espèces est limitée par le manque d'accès à l'information taxonomique et par le manque d'experts dans le domaine (Agosti, 2006). Ces difficultés d'identification sont renforcées par l'existence d'espèces proches d'un point de vue morphologique rendant leur identification très difficile. Cet ensemble d'espèces morphologiquement proches mais génétiquement et phénotypiquement différentes de par leurs bio-écologies respectives est appelé complexe d'espèces. Chez les *Culicoides*, l'hypopygium et les organes reproducteurs mâles sont souvent assez caractéristiques d'une espèce alors que les femelles sont très proches morphologiquement mais les mâles sont souvent rares dans les pièges lumineux (méthode standard de collecte des *Culicoides*). Cette rareté des mâles dans les pièges lumineux ou dans les pièges à appât s'explique par leur régime alimentaire floricole. Ces difficultés taxonomiques sont particulièrement accentuées en région Afro-tropicale en rapport au manque de supports visuels (images) de référence tels que les motifs de taches alaires (premier caractère pour l'identification des *Culicoides*), les variations morphologiques et les clés datées. L'utilisation des outils moléculaires de diagnostic devrait permettre de surmonter ces obstacles.

Le développement de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) multiplex adaptée à l'identification spécifique chez les insectes permet une reconnaissance beaucoup plus rapide, plus fiable et surtout moins fastidieuse que l'identification morphologique, mais elle est plus onéreuse. Plus récemment, le projet code-barres de la vie, *barcode of life*, proposé par Hebert et al. (2003) vise à séquencer la région cytochrome C oxydase I (COI) de l'ADN mitochondrial (ADNmt) de l'ensemble des organismes vivants pour les identifier. Cette

approche nous a permis de préciser les différents taxons du groupe *Schultzei* présents au Sénégal. Des problèmes similaires ont été notés dans les groupes *Milnei*, *Imicola* et *Orientalis* (groupes d'importance vétérinaire) qui se trouvent dans un imbroglio avec des clés d'identifications partielles et datées parfois inexistantes, de nombreuses variations phénotypiques, méritent d'être précisés. L'approche moléculaire n'est pas sans limite. En effet, le manque de données moléculaires de référence constitue le principal obstacle chez les *Culicoides* et nécessite des données sur les espèces types. L'identification de *C. oxystoma* au Sénégal, appelle à investiguer sur la distribution de cette espèce en Afrique par des enquêtes dans les régions et pays avoisinants.

La suite de nos premières études sur les méthodes de contrôle des *Culicoides* serait d'évaluer de manière plus approfondie la sensibilité aux insecticides de référence, notamment les pyréthrénoïdes, des espèces suspectées ou impliquées dans la transmission de la PEA. En effet, l'efficacité d'une méthode de lutte chimique contre les insectes vecteurs dépend de la sensibilité des espèces cibles aux insecticides utilisés. Les études préliminaires d'efficacité de produits insecticides (pour-on, moustiquaires imprégnées) que nous avons réalisées sur le terrain n'ont pas été très concluantes et soulignent la nécessité de poursuivre ces investigations dans le futur. Il serait aussi intéressant de déterminer pour les espèces d'intérêt les gîtes de repos et de ponte, encore mal définis, afin d'envisager des méthodes et stratégies de lutte sélective et efficace. Dans le contexte du Sénégal, la capture et destruction des *Culicoides* à jeun à la recherche de l'hôte à l'aide de piège lumineux de type OVI mais aussi l'obstruction des ouvertures avec une moustiquaire et la pulvérisation d'insecticide des surfaces internes des box pourraient être envisagées. Elles permettraient de proposer aux propriétaires des centres équestres et des fermes laitières, qui importent des animaux de races améliorées, des méthodes de lutte et de prévention contre les *Culicoides* d'intérêts vétérinaires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abbott, W. S. (1925) A Method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology*, **18**, 265-267.
2. Abdel-Malek, A. A. & Abdel Aal, M. A. (1966) Study of the dispersion and flight range of *Anopheles sergenti* Theo. in Siwa Oasis using radioactive isotopes as markers. *Bulletin of the World Health Organization*, **35**, 968-973.
3. Agbolade, O., Akinboye, D. O., Olateju, T., Ayanbiyi, O. A., Kuloyo, O. O. & Fenuga, O. O. (2006) Biting of anthropophilic *Culicoides fulvithorax* (Diptera: Ceratopogonidae), a vector of *Mansonella perstans* in Nigeria. *Korean Journal of Parasitology*, **44**, 67-72.
4. Agosti, D. (2006) Biodiversity data are out of local taxonomists' reach. *Nature*, **439**, 392.
5. Agresti, A. (1990) Categorical data analysis. Wiley.
6. Akakpo, A. J., Wombou Toukam, C. M., Mankor, A. & Ly, C. (2011) Impact économique de l'épizootie de peste équine de 2007 au Sénégal. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, **59**, 1 - 16.
7. Akogbeto, M. (1995) Etude entomologique sur la transmission du paludisme côtier lagunaire : cas d'un village construit sur un lac d'eau saumâtre. *Annales de La Societe Belge de Medecine Tropicale*, **75**, 219-227.
8. Al Busaidy, S. M. & Mellor, P. S. (1991) Isolation and identification of arboviruses from the Sultanate of Oman. *Epidemiology and Infection*, **106**, 403-413.
9. Alexander, K. A., Kat, P. W., Maison, J., Maison, C., O'Brien, S. J., Laurenson, M. K., et al. (1995) La peste équine et carnivores africains. *Veterinary Microbiology*, **47**, 133-140.
10. Anderson, G. S., Belton, P. & Kleider, N. (1991) *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a causal agent of *Culicoides* hypersensitivity (sweet itch) in British Columbia. *Journal of Medical Entomology*, **28** 685-693.
11. Auriault, M. (1977) Contribution à l'étude biologique et écologique de *Culicoides grahamii* (Austen), 1909, (Diptera: Ceratopogonidae) I. Rythme d'activité des femelles. *Cahiers ORSTOM, Serie Entomologie Médicale et Parasitologie*, **15**, 171-176.
12. Auriault, M. (1979) Contribution à l'étude biologique et écologique de *Culicoides grahamii* (Austen) 1909, (Diptera: Ceratopogonidae) V-Rythme d'activité en forêt dense. *Cahiers ORSTOM, Serie Entomologie Médicale et Parasitologie*, **17**, 77-79.
13. Azevedo, R. S., Nunes, M. R., Chiang, J. O., Bensabath, G., Vasconcelos, H. B., Pinto, A. Y., et al. (2007) Reemergence of Oropouch fever, northern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, **13**, 912-915.
14. Baldet, T., Mathieu, B., Delécolle, J. C., Gerbier, G. & Roger, F. (2005) Emergence de la fièvre catarrhale ovine dans le Bassin méditerranéen et surveillance entomologique en France. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, **58**, 125-132.
15. Balenghien, T. & Delécolle, J. C. (2009) Les *Culicoides* mouchérons vecteurs du virus de la fièvre catarrhale ovine. *Insectes*, **154**, 25-30.
16. Balenghien, T., Delécolle, J. C., Setier-Rio, M. L., Rakotoarivony, I., Allène, X., Venail, R., et al. (2010) Fièvre catarrhale ovine : bilan de la surveillance entomologique en 2010 en France. *Bulletin Epidémiologique*, **46**, 26-31.
17. Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P. & Bicout, D. J. (2011) Theoretical formulation for mosquito host-feeding patterns: application to a West Nile virus focus of Southern France. *Journal of Medical Entomology*, **48**, 1076-1090.
18. Barnard, B. J. H. (1997) Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **64**, 227-233.

19. Barnard, D. R. & Jones, R. H. (1980) Diel and seasonal patterns of flight activity of Ceratopogonidae in Northeastern Colorado: *Culicoides*. *Environmental Entomology*, **9**, 446-451.
20. Bartsch, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clausen, P. H. & Steuber, S. (2009) Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, **105**, 373-380.
21. Bellis, G. A., Melville, L. F., N.T., H. & Hearnden, M. N. (2004) Temporal activity of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle near Darwin, Northern Territory, Australia. *Epidemiology and Vectors*, **40**, 324-328.
22. Benzécri, J. P. (1983) Analyse de l'inertie intra-classe par l'analyse d'un tableau de correspondances. *Cahiers de l'Analyse des Données*, **8**, 351-358.
23. Binopal, V. S., Wariru, B. N., Davies, F. G., Soi, R. & Olubayo, R. (1992) Une tentative de définir la gamme d'hôtes du virus de la peste équine (Orbivirus, Reoviridae) en Afrique de l'Est, par une enquête sérologique dans certains équidés, camélidés, Loxodontidae et carnivores. *Veterinary Microbiology*, **31**, 19-23.
24. Bishop, A. L., McKenzie, J., Sporh, L. J. & Barchia, I. M. (1994) *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in different farm habitats. *Australian Journal of Zoology*, **42**, 372-384.
25. Blackwell, A. (1997) Diel flight periodicity of the biting midge *Culicoides impunctatus* and the effects of meteorological conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**, 361-367.
26. Blackwell, A., Mordue, A. J. & Mordue, W. (1994) Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medical and Veterinary Entomology*, **8**, 20-24.
27. Bobeva, A., Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Dimitrov, D., Mathis, A. & Bensch, S. (2015) Host preferences of ornithophilic biting midges of the genus *Culicoides* in the Eastern Balkans. *Medical and Veterinary Entomology*.
28. Boorman, J. (1979) *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian Peninsula with Notes on their medical and veterinary importance. *Fauna of Saudi Arabia*, **10**, 160-224.
29. Boorman, J. (1989) *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna of Saudi Arabia*, **10**, 160-224.
30. Boorman, J. (1991) A review of *Culicoides* subgenus *Avaritia* species (Insecta, Diptera, Ceratopogonidae), vectors of viruses of sheep, cattle and horses, with particular reference to *Culicoides imicola* in Europe and the Mediterranean region. Report prepared for The Overseas Development Administration, 1-54 pp.
31. Boorman, J. & Dipeolu, O. O. (1979) A taxonomic study of adult Nigerian *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species. *Occasional Publications of the Entomological Society of Nigeria*, **22**, 1-121.
32. Boorman, J., Mellor, P. S., Penn, M. & Jennings, M. (1975) The growth of African horse sickness virus in embryonated hen eggs and the transmission of virus by *Culicoides variipennis* Coquillett (Diptera: Ceratopogonidae). *Archives of Virology*, **47**, 343-349.
33. Borkent, A. (2014) World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). RBC Museum. British Colombia, Canada 238 pp.
34. Bourdin, P. & Laurent, A. (1974) Note sur l'écologie de la peste équine africaine. *Revue d'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, **27**, 163-168.
35. Bouyer, F., Seck, M. T., Dicko, A. H., Sall, B., Lo, M., Vreysen, M. J. B., et al. (2014) Ex-ante Benefit-Cost Analysis of the Elimination of a *Glossina palpalis gambiensis* Population in the Niayes of Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**, e3112.

36. Braverman, Y. (1988) Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Veterinary Journal* **20**, 426-429.
37. Braverman, Y., Chizov-Ginzburg, A., Pener, H. & Wilamowski, A. (2004) Susceptibility and repellency of *Culicoides imicola* and *Culex pipiens* to lambda-cyhalothrin. *Veterinaria Italiana*, **40**, 336-339.
38. Bricq, N. (2008) La gestion de l'épizootie de fièvre catarrhale ovine (FCO): tirer des enseignements pour l'avenir. SÉNAT, Session extraordinaire de 2007-2008, no. 460, 1-71 pp.
39. Bruce-Chwatt, L. J. & Hayward, J. (1956) Uptake of radioactive phosphorus by larvae and adults of mosquitoes. *Nature*, **177** 661-662.
40. Bugher, J. C. & Taylor, M. (1949) Radiophosphore et radiostrontium chez les moustiques. Rapport préliminaire. *Science*, **110**, 146-147.
41. Buitrago, R., Depickère, S., Bosseno, M. F., Patzi, E. S., Waleckx, E., Salas, R., *et al.* (2012) Combination of cytochrome b heteroduplex-assay and sequencing for identification of triatomine blood meals. *Infection Genetics and Evolution*, **12**, 21-27.
42. Burnham, K. P. & Anderson, D. R. (2002) Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. In *2nd edn Springer-Verlag, New York, NY*.
43. Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M. A., Delrio, R., Borrás, D., Beldron, F. J., *et al.* (2010) Protection of livestock against bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 169-175.
44. Campano Lopez, A. & Sanchez Botija, C. (1958) L'épizootie de fièvre catarrhale ovine en Espagne (Blue Tongue). *Bulletin de L'Office International des Epizooties*, **50**, 65-93.
45. Campbell, M. M. & Kettle, D. S. (1975) Sugar feeding and longevity in *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in the laboratory. *Journal of the Australian Entomological Society*, **14**, 333-337.
46. Campbell, M. M. & Kettle, D. S. (1979) Swarming of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with reference to markers, swarm size, proximity of cattle, and weather. *Australian Journal of Zoology*, **27**, 17-30.
47. Capela, R., Purse, B. V., Pena, I., Wittman, E. J., Margarita, Y., Capela, M., *et al.* (2003) La distribution spatiale des espèces de *Culicoides* au Portugal en ce qui concerne la transmission de la peste équine et les virus de la fièvre catarrhale. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 165-177.
48. Carpenter, S., Eyres, K., McEndrick, I., Smith, L., Turner, J., Mordue, W., *et al.* (2005) Repellent efficiency of BayRepel® against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, **95**, 427-429.
49. Carpenter, S., Mellor, P. & Torr, S. (2007) Bluetongue and midge control. *Veterinary Record*, **161**, 633.
50. Carpenter, S., Mellor, P. S. & Torr, S. J. (2008) Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 175-187.
51. Carpenter, S., Szmaragd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S. & Mellor, P. (2008) An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology*, **45**, 1237-1245.
52. Casana, M. (2012) Brésil : des moustiques génétiquement modifiés pour contrer la dengue http://www.maxisciences.com/moustique/bresil-des-moustiques-genetiquement-modifies-pour-contrer-la-dengue_art25661.html, Copyright © Gentside Découverte, (Visité le 10/01/15).

53. Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delécolle, J. C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., *et al.* (2004) Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research*, **35**, 325-337.
54. Chaker, E. (1981) Contribution à l'étude des *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) de Tunisie. Systématique-Chorologie-Ecologie. Mémoire DERBH, 196 pp.
55. Chaker, E. (1983) Contribution à l'étude de la morphologie et de la diagnose des larves de *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). (Diplôme d'Etat), U.L.P., Thèse de Doctorat es Sciences Pharmaceutiques, 229 pp.
56. Chow, E., Wirtz, R. A. & Scott, T. W. (1993) Identification of bloodmeals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of the American Mosquito Control Association* **9**, 196-205.
57. Cissé, I., Fall, S. T., Badiane, M., Diop, Y. & Diouf, A. (2006) Horticulture et usage des pesticides dans la zone des Niayes au Sénégal. ISRA/LNERV, EISMV, LACT / Faculté de Médecine Pharmacie / UCAD, document de travail Ecocité, no. 8, 1-14 pp.
58. Coetzer, J. A. W. & Guthrie, A. J. (2004) African horse sickness. In *Infectious diseases of livestock*, 2nd (ed. by J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin), pp. 1231-1246. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town.
59. Cornet, M. (1969) Les *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) de l'Ouest Africain (1ère note). *Cahiers ORSTOM, Serie Entomologie Médicale et Parasitologie*, **7**, 341-364.
60. Cornet, M. (1974) Caracteres morphologiques utilises pour l'identification des *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Cahiers ORSTOM Serie Entomologie medicale et Parasitologie*, **12**, 221-229.
61. Cornet, M. & Brunhes, J. (1994) Révision des espèces de *Culicoides* apparentées à *C. shultzei* (Enderleini, 1908) dans la région afro-tropicale (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, **92**, 149-164.
62. Cornet, M. & Chateau, R. (1970) Les *Culicoides* de l'Ouest africain (2° note) Espèces apparentées à *C. similis* Carter, Ingrain et Macfie, 1920 (Diptera: Ceratopogonidae). *Cahiers ORSTOM Serie Entomologie Medicale et Parasitologie*, **8**, 141-173.
63. Cornet, M., Nevill, E. M. & Walker, A. R. (1974) Notes sur les *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), du groupe de *C. milnei* Auten, 1909, en Afrique orientale et australe. *Cahiers ORSTOM Serie Entomologie Medicale et Parasitologie*, **12**, 231-243.
64. Costantini, C., Li, S. G., Della Torre, A., Sagnon, N., Coluzzi, M. & Taylor, C. E. (1996) Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. *Medical and Veterinary Entomology*, **10**, 203-219.
65. Curasson, G. (1925) Introduction de la bluetongue en Afrique Occidentale Française. *Bulletins de la Société de pathologie exotique et de sa filiale de l'Ouest africain*, **18**, 235-238.
66. Dadawala, A. I., Biswas, S. K., Rehman, W., Chand, K., De, A., Mathapati, B. S., *et al.* (2012) Isolation of bluetongue virus serotype 1 from *Culicoides* vector captured in livestock farms and sequence analysis of the viral genome segment-2. *Transboundary and Emerging Diseases*, **59**, 361-368.
67. Davies, F. G. & Walker, A. R. (1974) The isolation of ephemeral fever virus from cattle and *Culicoides* midges in Kenya. *Veterinary Research* **95**, 63-64.
68. De Clercq, K., Vandenbussche, F., Vanbinst, T., Vandemeulebroucke, E., Goris, N. & Zientara, S. (2009) Fièvre catarrhale ovine : diagnostic de laboratoire In *Fièvre catarrhale ovine en Europe du nord* (ed. by C. Saegerman, F. Reviriego-Gordejo & P. P. Pastoret), pp. 1-82. Publié par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), Paris et l'Unité d'Epidémiologie et d'Analyse de risques appliquées aux Sciences Vétérinaires,

Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège.

69. De Raat, I. J., Van den Boom, R., Van Poppel, M. & Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. (2008) The effect of a topical insecticide containing permethrin on the number of *Culicoides* midges caught near horses with and without insect bite hypersensitivity in the Netherlands. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, **133**, 838-842.
70. De Vos, C. J., Hoek, C. A. & Nodelijk, G. (2012) Risk of introducing African horse sickness virus into the Netherlands by international equine movements. *Preventive Veterinary Medicine*, **106**, 108- 122.
71. Dekker, T., Takken, W. & Carde, R. T. (2001) Structure of host-odour plumes influences catch of *Anopheles gambiae* s.s. and *Aedes aegypti* in a dualchoice olfactometer. *Physiological Entomology*, **26**, 124-134.
72. Delrio, R., Barcelo, C., Paredes-Esquivel, C., Lucientes, J. & Miranda, M. A. (2014) Susceptibility of *Culicoides* species biting midges to deltamethrin-treated nets as determined under laboratory and field conditions in the Balearic Islands, Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 1-7.
73. Desvars, A., Grimaud, Y., Guis, H., Esnault, O., Allène, X., Gardès, L., *et al.* (2015) First overview of the *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) livestock associated species of Reunion Island, Indian Ocean. *Acta Tropica*, **142**, 5-19.
74. Dia, I., Konaté, L., Samb, B., Sarr, J. B., Diop, A., Rogerie, F., *et al.* (2008) Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. *Acta Tropica*, **105**, 145-153.
75. Dia, I., Lochouarn, L., Diatta, M., Sokhna, C. S. & Fontenille, D. (2001) Préférences trophiques des femelles endophiles d'*Anopheles funestus* au Sénégal. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*, **94**, 210-213.
76. Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akogbeto, M., Guiguemde, T. R., Darriet, F., *et al.* (2002) The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* sl in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**, 617-622.
77. Diop, A. (2013) Diagnostic des pratiques d'utilisation et quantification des pesticides dans la zone des Niayes de Dakar (Sénégal). Université du Littoral Côte d'Opale, <NNT : 2013DUNK0341>. <tel-00959895>, 241 pp.
78. Diouf, N. D., Etter, E., Lo, M. M., Lo, M. & Akakpo, A. J. (2013) Outbreaks of African horse sickness in Senegal and methods of control of the 2007 epidemic. *Veterinary Record*, **172**, 152.
79. Djogbénou, L., Dabire, R., Diabate, A., Kengne, P., Akogbeto, M., Hougard, J. M., *et al.* (2008) Identification and Geographic Distribution of the Ace-1R Mutation in the Malaria Vector *Anopheles gambiae* in South-Western Burkina Faso, West Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **78**, 298-302.
80. Dolédec, S. & Chessel, D. (1987) Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique I- Description d'un plan d'observations complet par projection de variables. *Acta Oecologica, Oecologia Generalis*, **8**, 403-426.
81. Dougall, A. M., Alexander, B., Holt, D. C., Harris, T., Sultan, A. H., Bates, P. A., *et al.* (2011) Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*, **41**, 571-579.
82. Dow, R. P., Reeves, W. C. & Bellamy, R. E. (1957) Field tests of avian host preference of *Culex tarsalis* Coq. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **6**, 294-303.
83. Downes, J. A. (1969) The swarming and mating flight of diptera. *Annual Review of Entomology*, **14**, 271-298.

84. Du Toit, R. M. (1944) The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of veterinary Science and animal Industry*, **19**, 7-16.
85. Du Toit, R. M. (1962) The role played by bovines in the transmission of bluetongue in sheep. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **33**, 483-490.
86. Dulac, G. C., Dubuc, C., Myers, D. J., Afshar, A. & Taylor, E. A. (1989) Incursion of bluetongue virus type 11 and epizootic haemorrhagic disease of deer type 2 for two consecutive years in the Okanagan Valley. *Canadian Veterinary Journal*, **30**, 351.
87. Duval, J. (1978) La localisation de *Culicoides belkini* dans les archipels de la Société, des Tuamotu et dans les îles Cook. *Cahiers ORSTOM Serie Entomologie Medicale et Parasitologie*, **16**, 279-288.
88. Duval, J., Rivière, F. & Pichon, G. (1978) Quelques aspects bio-écologiques de *Culicoides belkini* (Wirth et Arnaud, 1969) (Diptera: Ceratopogonidae). *Cahiers ORSTOM Serie Entomologie Medicale et Parasitologie*, **16**, 273-277.
89. Dyce, A. L. (1969) The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Journal of the Australian Entomological Society*, **8**, 11-15.
90. Edman, J. D., Webber, L. A. & Schmid, A. A. (1974) Effect of host defences on the feeding pattern of *Culex nigripalpus* when offered a choice of blood sources. *Journal of Parasitology*, **60**, 874-883.
91. EL Sinnary, K. A. & Hussein, H. S. (1980) *Culicoides kingi*, Austen: a vector of *Onchocerca gutturosa* (Neumann, 1910) in the Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **74**, 655-656.
92. El Sinnary, K. A., Muller, R., Atta El Mannan, A. & Hussein, S. H. (1985) The diurnal activity of *Culicoides kingi* in northern Sudan. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **38**, 270-275.
93. Elissa, N., Mouchet, J., Rivière, F., Meunier, J. Y. & Yao, K. (1993) Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Annales de La Societe Belge de Medecine Tropicale*, **73**, 291-294.
94. Fall, A. G., Diaite, A., Lancelot, R., Tran, A., Soti, V., Etter, E., *et al.* (2011) Feeding behaviour of potential vectors of West Nile virus in Senegal. *Parasites and Vectors*, **99**, 1-7.
95. Fall, A. G., Diaite, A., Seck, M. T., Bouyer, J., Lefrançois, T., Vachieri, N., *et al.* (2013) West Nile virus transmission in sentinel chickens and potential mosquito vectors, Senegal river delta, 2008-2009. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **10**, 4718-4727.
96. Fall, S. T. & Badiane, A. N. (2001) Interactions horticulture-élevage: potentiel du système et contraintes. CRDI, CITÉS HORTICOLES EN SURSIS ? L'agriculture urbaine dans les grandes Niayes au Sénégal, 132 pp.
97. Fall, S. T., Fall, A. S., Cissé, I., Badiane, A., Fall, C. A. & Diao, M. B. (2000) Intégration horticulture - élevage dans les systèmes agricoles urbains de la zone des Niayes (Sénégal). *Bulletin de l'APAD*, **19**, 1-15.
98. Fall, S. T., Traoré, E., Cissé, M., Koréa, A., Sèye, B. M., Fall, A., *et al.* (1994) Systèmes d'alimentation pour la production intensive de viande au Sénégal ; Essais de pré vulgarisation de rations d'embouche. Rapport Technique ISRA LNERV Réf W 30. Res Alim Décembre, 1-24 pp.
99. Faye, O., Gaye, O., Fontenille, D., Hébrard, G., Konate, L., Sy, N., *et al.* (1995) La sécheresse et la baisse du paludisme dans les Niayes du Sénégal. *Cahiers Santé*, **5**, 299-305.
100. Faye, O., Konaté, L. & Diop, A. (2011) Profil entomologique du paludisme au Sénégal. *Document PNLP/OMS*, 43 pp.

101. Finney, D. (1947) Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. *Oxford, England: Macmillan*.
102. Foster, N. M., Breckon, R. D., Luedke, A. J., Jones, R. H. & Metcalf, H. E. (1977) Transmission of two strains of epizootic haemorrhagic disease virus in deer by *Culicoides variipennis*. *Journal of Wildlife Diseases*, **13**, 9-16.
103. Garros, C., Gardès, L., Allène, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., *et al.* (2011) Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infection Genetics and Evolution*, **11**, 1103-1110.
104. Gerry, A. C., Monteys, V. S. I., Vidal, J. O. M., Francino, O. & Mullens, B. A. (2009) Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. *Journal of Medical Entomology*, **46**, 615-624.
105. Gibbs, E. P. J. & Greiner, E. C. (1994) The epidemiology of the bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **17**, 207-220.
106. Gillies, M. T. (1972) Some aspects of mosquito behavior in relation to the transmission of parasites. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **51**, 69-81.
107. Glick, J. I. (1990) *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *Journal of Medical Entomology*, **27**, 85-195.
108. Goetghebuer, M. (1952) Le genre *Culicoides* (Diptères, Cératopogonidés) et ses représentants en Belgique. *Biologisch Jaarboek*, **19**, 185-191.
109. Goffredo, M. & Meiswinkel, R. (2004) Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria italiana*, **40**, 260-265.
110. Gokool, S., Curtis, C. F. & Smith, D. F. (1993) Analysis of mosquito bloodmeals by DNA profiling. *Medical and Veterinary Entomology*, **7**, 208-215.
111. Golvan, Y. (1983) *Elément de parasitologie médicale*. Paris, 571 pp.
112. Gomes, L. A., Duarte, R., Lima, D. C., Diniz, B. S., Serrão, M. L. & Labarthe, N. (2001) Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**, 693-695.
113. Gomulski, L. M., Meiswinkel, R., Delécolle, J. C., Goffredo, M. & Gasperi, G. (2006) Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 229-238.
114. Griffioen, K., Van Gemst, D. B., Pieterse, M. C., Jacobs, F. & Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. (2011) *Culicoides* species associated with sheep in the Netherlands and the effect of a permethrin insecticide. *Veterinary Journal*, **190**, 230-235.
115. Gubbins, S., Carpenter, S., Baylis, M., Wood, J. L. N. & Mellor, P. S. (2008) Assessing the risk of bluetongue to UK livestock: uncertainty and sensitivity analyses of a temperature-dependent model for the basic reproduction number. *Journal of the Royal Society Interface*, **5**, 363-371.
116. Gumm, I. D., Taylor, W. P., Roach, C. J., Alexander, F. C. M., Greiner, E. C. & Gibbs, E. P. (1984) Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. *Journal of Veterinary Research*, **114**, 635-638.
117. Gunn, H. M. (1993) African horse sickness. *Irish Veterinary Journal*, **46**, 29-31.
118. Guthrie, A. J. (2006) African Horse Sickness In *Equine infectious diseases* (ed. by D. C. Sellon & M. T. Long), pp. 164-171. Saunders Elsevier, St Louis.

119. Hair, J. A. & Turner, E. C. (1968) Preliminary host preference studies on Virginia *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Mosquito News*, **28**, 103-107.
120. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
121. Hardy, W. T. & Price, D. A. (1952) Soremuzzle of sheep. *J A V M A*, **120**, 23-25.
122. Hase, A. (1934) Ueber heftige, blasige Hautreaktionen nach *Culicoides* stichen. In: Wirth, W. W. & Hubert, A. A. (1989) The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, **44**, 1-509. *Ztschr Parasitenk*, **6**, 119-128.
123. Haubruge, E. & Amichot, M. (1998) Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et acariens. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, **2**, 161-174.
124. Hawking, F. (1977) The distribution of filariasis throughout the World. Part III. Africa. *Tropical Diseases Bulletin*, **74**, 649-679.
125. Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & De Waard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Entomological Society*, **270**, 313-321.
126. Hemingway, J. (1995) Efficacy of etofenprox against insecticide susceptible and resistant mosquito strains containing characterized resistance mechanisms *Medical and Veterinary Entomology*, **9**, 423-426.
127. Herniman, K. A., Boorman, J. P. & Taylor, W. P. (1983) Bluetongue virus in a Nigerian dairy cattle herd. 1. Serological studies and correlation of virus activity to vector population. *Journal of Hygiene* **90**, 177-193.
128. Hill, M. A. (1947) The life cycle and habits of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer and *Culicoides obsoletus* Meigen, together with some observations on the life cycle of *Culicoides odibilis* Austen, *Culicoides pallidicornis* Kieffer, *Culicoides cubitalis* Edwards and *Culicoides chiopterus* Meigena. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **41**, 55-115.
129. Hoff, G. L. & Trainer, D. O. (1978) Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses: their relationship to wildlife species. *Advances In Veterinary Science and Comparative Medicine*, **22**, 111-132.
130. Hoffmann, B., Scheuch, M., Höper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., et al. (2012) Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerging Infectious Diseases*.
131. Hofmann, M. A., Renzullo, S., Mader, M., Chaignat, V., Worwa, G. & Thuer, B. (2008) Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, **14**, 1855-1861.
132. Holmes, P. R. & Birley, M. H. (1987) An improved method for survival rate analysis from time series of haematophagous dipteran populations. *Journal of Animal Ecology*, **56**, 427-440.
133. Howell, P. G. (1962) The isolation and identification of further antigenic types of African horse sickness virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **29**, 139-149.
134. Humphreys, J. G. & Turner, J. E. C. (1973) Blood-feeding activity of female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **10**, 79-83.
135. Hunter, F. F. & Bayly, R. (1991) ELISA for identification of bloodmeal source in black flies (Diptera Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, **28**, 527-532.
136. Hurvich, C. M. & Tsai, C. L. (1995) Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics*, **51**, 1077-1084.
137. Itoua, A., Cornet, M., Vattier-Bernard, G. & Trouillet, J. (1987) The *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of Central Africa. *Cahiers ORSTOM, serie Entomologie médicale et Parasitologie*, **25**, 127-134.

138. Jamnback, H. A. (1965) The *Culicoides* of New York state (Diptera: Ceratopogonidae). *New York State Museum and Science Service Bulletin*, **399**, 1-154.
139. Juntarajumnong, W., Pimnon, S., Bangs, M. J., Thanispong, K. & Chareonviriyaphap, T. (2012) Discriminating lethal concentrations and efficacy of six pyrethroids for control of *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association* **28**, 30-37.
140. Kay, B. H., Boyd, A. M., Ryan, P. A. & Hall, R. A. (2007) Mosquito feeding patterns and natural infection of vertebrates with Ross River and Barmah Forest viruses in Brisbane, Australia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**, 417-423.
141. Kent, R. J. & Norris, D. E. (2005) Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 336-342.
142. Kettle, D. S. (1969) The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbosai* Wirth & Blanton. I. The 24-h cycle, with a note on differences between collectors. *Bulletin of Entomological Research* **59**, 21-31.
143. Kettle, D. S. (1977) Biology and bionomics of bloodsucking Ceratopogonids. *Annual Review of Entomology*, **22**, 33-51.
144. Kettle, D. S. (1984) Ceratopogonidae (Biting Midges). *Medical and Veterinary Entomology*, 137-158.
145. Kettle, D. S. (1996) The Scottish midge, *Culicoides impunctatus* Goetghebuer (Diptera: Ceratopogonidae), an early attempt (1945 - 1958) to control this intractable pest. *Memoirs of the Entomological Society of Washington* **18** 134-139.
146. Kettle, D. S. & Linley, J. R. (1968) The biting habits of some Jamaican *Culicoides*. II *C. furens* (Poey). *Bulletin of Entomological Research*, **59**, 1-20.
147. Khamala, C. P. M. & Kettle, D. S. (1971) The *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae) of East Africa. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, **123**, 1-95.
148. Kleider, N. & Lees, M. J. (1984) *Culicoides* hypersensitivity in the horse: 15 cases in southwestern British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*, **25**, 26-32.
149. Kluiters, G., Swales, H. & Baylis, M. (2015) Local dispersal of palaeartic *Culicoides* biting midges estimated by mark-release-recapture. *Parasites and Vectors*, **8**, 86.
150. Koch, H. G. & Axtell, R. C. (1979) Attraction of *Culicoides furens* and *C. hollensis* (Diptera: Ceratopogonidae) to animal hosts in a salt marsh habitat. *Journal of Medical Entomology* **15**, 494-499.
151. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., et al. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 6196-6200.
152. Koffi, A. A., Darriet, F., N'Guessan, R., J.M.C., D. & Carnevale, P. (1999) Laboratory evaluation of alpha-cypermethrin insecticide efficacy on *Anopheles gambiae* populations of Côte d'Ivoire resistant to permethrin and deltamethrin. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*, **92**, 62-66.
153. Kremer, M., Rebholtz-Hirtzel, C. & Delécolle, J. C. (1975) Description d'une espèce nouvelle *C. dubitatus* n. sp. (Diptera: Ceratopogonidae) de la région éthiopienne. *Cahiers ORSTOM, Serie Entomologie Médicale et Parasitologie*, **13** 233-236.
154. Kremer, M., Waller, J. & Delécolle, J. C. (1987) Systématique des *Culicoides* (Diptères, Cératopogonidés). Critères actuels. *Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie*, **5**, 123-132.

155. Kurogi, H., Akiba, K., Inaba, Y. & Matumoto, M. (1987) Isolation of Akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Veterinary Microbiology*, **15**, 243-248.
156. Lardeux, F., Loayza, P. & Bouchité, B. C. (2007) Host choice and human blood index of *Anopheles pseudopunctipennis* in a village of the Andean valleys of Bolivia. *Malaria Journal*, **6**, 14.
157. Lassen, S. B., Nielsen, S. A. & Kristensen, M. (2012) Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasites and Vectors*, **5**, 143.
158. Lassen, S. B., Nielsen, S. A., Skovgard, H. & Kristensen, M. (2011) Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitology Research* **108**, 823-829.
159. Lawless, J. F. (1987) Negative binomial and mixed Poisson regression. *Canadian Journal of Statistics* **15**, 209-225.
160. Lefevre, P. C. & Desoutter, D. (1988) La fièvre catarrhale du mouton (bluetongue). 117 pp.
161. Lefevre, P. C. & Taylor, W. P. (1983) Situation épidémiologique de la fièvre catarrhale du mouton (bluetongue) au Sénégal. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **36**, 241-245.
162. Leforban, Y., Mabratu, G. Y., Vigier, M. & Fikre, Y. (1983) Etude épidémiologique de la Peste Equine Africaine en Ethiopie de 1977 à 1981. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, **36**, 117-129.
163. Lillie, T. H., Kline, D. L. & Hall, D. W. (1985) The dispersal of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in a salt marsh near Yankeetown, Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **1**, 465-468.
164. Lillie, T. H., Kline, D. L. & Hall, D. W. (1987) Diel and seasonal activity of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Near Yankeetown, Florida, Monitored with a vehicle-mounted insect trap. *Journal of Medical Entomology*, **24**, 503-511.
165. Lillie, T. H., Marquard, W. C. & Jones, R. H. (1981) The flight range of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Canadian Entomologist*, **133**, 419-426.
166. Linhares, A. X. & Anderson, J. R. (1990) The influence of temperature and moonlight on flight activity of *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera, Ceratopogonidae) in Northern California. *Pan-Pacific Entomologist*, **66**, 199-207.
167. Linley, J. R. (1985) Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *Journal of Medical Entomology*, **22**, 589-599.
168. Linley, J. R. & Davies, J. B. (1971) Sandflies and tourism in Florida and the Bahamas and Caribbean area. *Journal of Economic Entomology*, **64**, 264-278.
169. Liu, N. (2015) Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*, **60**, 537-559.
170. Lopez, A. C. & Botija, C. S. (1958) Epizootie de la fièvre catarrhale ovine en Espagne (bluetongue). *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, **50**, 65-93.
171. Losos, G. J. (1986) Bluetongue (409-439). In *Infectious tropical Diseases of domestic animals* (ed. by H. Burnt Mill), pp. 938. Longman, GBR.
172. Lubroth, J. (1992) The complete epidemiologic cycle of African horse sickness: our incomplete knowledge. In *Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Grbiviruses* (ed. by T. E. Walton & B. I. Osburn), pp. 197-204. CRC Press, Boca Raton, FL.
173. Maan, S., Maan, N. S., Nomikou, K., Veronesi, E., Bachanek-Bankowska, K., Belaganahalli, M. N., et al. (2011) Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from kuwait. *PLoS One*, **6**.

174. Martinelle, L., Dal Pozzo, F., Kirschvink, N., De La Grandière, M. A., Thiry, E. & Saegerman, C. (2012) Le virus Schmallerberg ou l'émergence du premier *Orthobunyavirus* du séro groupe Simbu en Europe. *Annales de Medecine Veterinaire*, **156**, 7-24.
175. Mathieu, B. (2011) Les espèces de *Culicoides* du sous-genre *Avaritia* (Diptera: Ceratopogonidae) dans le monde: Révision systématique et taxonomique des espèces d'intérêt dans la transmission d'*Orbivirus*. Thèse de doctorat des Sciences du Vivant, Université de Strasbourg.
176. Maurice, Y. & Provost, A. (1967) La peste équine à type 9 en Afrique centrale. Enquête sérologique. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, **20**, 21-25.
177. McIntosh, B. M. (1958) Immunological types of horsesickness virus and their significance in immunization. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **27**, 465-538.
178. McLachlan, N. J. (1994) The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **17**, 197-206.
179. Megahed, M. M. (1956) Anatomy and histology of the alimentary tract of a female biting midge, *Culicoides nubeculosus* Mg. *Parasitology*, **46**, 22-47.
180. Mehlhorn, H., Schmahl, G., D'Haese, J. & Schumacher, B. (2008) Butox 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, **102**, 515-518.
181. Meiswinkel, R. (1989) Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (Avaritia) bolitinos* sp. Nov. reared from the dung of the african buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **56**, 23-39.
182. Meiswinkel, R. (1991) Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) miombo* sp. nov., a widespread species closely allied to *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **58**, 155-170.
183. Meiswinkel, R., Baylis, M. & Labuschagne, K. (2000) Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bulletin of Entomological Research*, **90**, 509-515.
184. Meiswinkel, R. & Dyce, A. L. (1989) Afrotropical *Culicoides*: *Synhelea* Kieffer, 1925, resurrected as subgenus to embrace 10 species (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **56**, 147-163.
185. Meiswinkel, R., Gomulski, L. M., Delécolle, J. C., Goffredo, M. & Gasperi, G. (2004) The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. *Veterinaria Italiana*, **40**, 151-159.
186. Meiswinkel, R. & Paweska, J. T. (2003) Evidence for a new field *Culicoides* vector of African horse sickness in South Africa. *Preventive Veterinary Medicine*, **60**, 243-253.
187. Mellor, P. S. (2000) Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *J comp Path Ther*, **123**, 231-247.
188. Mellor, P. S. & Boorman, J. (1995) The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89**, 1-1.
189. Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M. (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307- 340.
190. Mellor, P. S., Boorman, J. & Jennings, M. (1975) The multiplication of African horse sickness virus in two species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Archives of Virology*, **47**, 351-356.

191. Mellor, P. S., Carpenter, S., Harrup, L., Baylis, M. & Mertens, P. P. C. (2008) Bluetongue in Europe and the Mediterranean basin: history of occurrence prior to 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 4-20.
192. Mellor, P. S. & Hamblin, C. (2004) African horse sickness. *Veterinary Research*, **35**, 445-466.
193. Mellor, P. S. & McCaig, J. (1974) The probable cause of sweet itch in England. *Veterinary Record*, **95**, 411-415.
194. Mellor, P. S., Osborne, R. & Jennings, D. M. (1984) Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan. *Journal of Hygiene*, **93**, 621-628.
195. Melville, L. F., Hunt, N. T., Bellis, G. & Pinch, D. (2004) An assessment of insecticides to minimize the transmission of arboviruses in cattle. *Arbovirus Research in Australia*, **8**, 249-255.
196. Midega, J. T., Mbogo, C. M., Mwambi, H., Wilson, M. D., Ojwang, G., Mwangangi, J. M., *et al.* (2007) Estimating Dispersal and Survival of *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* Along the Kenyan Coast by Using Mark–Release–Recapture Methods. *Journal of Medical Entomology* **44**, 923-929.
197. Molaei, G. & Andreadis, T. G. (2006) Identification of avian- and mammalian-derived bloodmeals in *Aedes vexans* and *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and its implication for West Nile virus transmission in Connecticut, U.S.A. *Journal of Medical Entomology* **43**, 1088-1093.
198. Morag, N., Saroya, Y., Bravermann, Y., Klement, E. & Gottlieb, Y. (2012) Molecular identification, phylogenetic status and geographic distribution of *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *PLoS ONE*, **7**, e33610.
199. Mosha, F. W., Lyimo, I. N., Oxborough, R. M., Matowo, J., Malima, R., Feston, E., *et al.* (2008) Comparative efficacies of permethrin-, deltamethrin- and alpha-cypermethrin-treated nets, against *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in northern Tanzania. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **102**, 367-376.
200. Mullens, B. A. (1993) In vitro assay for permethrin persistence and interference with bloodfeeding of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) on animals. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **9**, 256-259.
201. Mullens, B. A. (1995) Flight activity and response to carbon-dioxide of *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in southern California. *Journal of Medical Entomology*, **32**, 310-315.
202. Mullens, B. A., Owen, J. P., Heft, D. E. & Sobeck, R. V. (2005) *Culicoides* and other biting flies on the Palos Verdes Peninsula of southern California, and their possible relationship to equine dermatitis. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 90-95.
203. Murray, M. D. (1970) The identification of blood meals in biting midges (*Culicoides*: Ceratopogonidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **64**, 115-122.
204. N'Guessan, R., Darriet, F., Guillet, P., Carnevale, P., Traore-lamizana, M., Corbel, V., *et al.* (2003) Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 1-7.
205. Nelson, R. L. (1965) Carbon dioxide as an attractant for *Culicoides*. *Journal of Economic Entomology*, **2**, 56-57.
206. Nelson, R. L. & Bellamy, R. E. (1971) Patterns of flight activity of *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **8**, 283-291.
207. Nevill, E. M. (1971) Cattle and *Culicoides* biting midges as possible overwintering hosts of bluetongue virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **38**, 65-72.

208. Nevill, E. M. (1978) The use of cattle to protect sheep from bluetongue infection. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **49**, 129-130.
209. Nevill, E. M. & Anderson, D. (1972) Host preferences of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in South Africa as determined by precipitin tests and light trap catches. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **39**, 147-152.
210. Nevill, E. M., Venter, G. J. & Edwardes, M. (1992) Potential *Culicoides* vectors of livestock orbiviruses. In *Bluetongue, African horse sickness, and related orbiviruses: Proceedings of the 2nd International Symposium* (ed. by T. E. Walton & B. I. Osburn), pp. 306-313. CRC Press Boca Raton, Florida.
211. Nevill, E. M., Venter, G. J., Edwardes, M., Pajor, I. T. P., Meiswinkel, R. & J.H., V. G. (1988) *Culicoides* species associated with livestock in the Stellenbosch area of the Western Cape Province, Republic of South Africa (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **55**, 101-106.
212. Ngo, K. A. & Kramer, L. D. (2003) Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with orderspecific primers. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 215-222.
213. Nicholas, W. M. (1953) The bionomics of *Culicoides austeni*, vector of *Acanthocheilonema perstans* in the rain-forest of the British Cameroons, together with notes on *C. grahamii* and other species which may be vectors in the same area. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **47**, 187-206.
214. Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J. C., Dufour, B. & Depaquit, J. (2011) Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitology Research*, **108**, 657-663.
215. OIE. (2008) Peste équine. Section 2.5: Equidae, Chapitre 2.5.1, 901-916 pp.
216. OIE. (2009) African horse sickness. 1-5 pp.
217. OIE. (2013) Le virus de Schmollenberg. Fiche technique de l'OIE, 1-7 pp.
218. Omori, T., Inaba, Y., Morimoto, T., Tanaka, Y., Ishitani, R., Kurogi, H., *et al.* (1969) Ibaraki virus, an agent of epizootic disease of cattle resembling bluetongue. I. Epidemiologic, clinical and pathologic observations and experimental transmission to calves. *Japanese Journal of Microbiology*, **13**, 139-157.
219. OMS. (1992) Résistance des vecteurs aux pesticides. 15ème rapport du comité des experts de la biologie et de la lutte contre les vecteurs de l'Organisation mondiale de la Santé. Série de rapports techniques, 68 pp.
220. Ortega, M. D., Mellor, P. S., Rawlings, P. & Pro, M. J. (1998) The seasonal and geographical distribution of *Culicoides imicola*, *C. pulicaris* group and *C. obsoletus* group biting midges in central and southern Spain. *Archives of Virology*, 85-91.
221. Oshaghi, M. A., Chavshin, A. R., Vatandoost, H., Yaaghoobi, F., Mohtarami, F. & Noorjah, N. (2005) Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Experimental Parasitology*, **112**, 232-236.
222. Page, P. C., Labuschagne, K., Venter, G. J., Schoeman, J. P. & Guthrie, A. J. (2014) Field and in vitro insecticidal efficacy of alphacypermethrin-treated high density polyethylene mesh against *Culicoides* biting midges in South Africa. *Veterinary Parasitology*, **203**, 184-188.
223. Perrin, E. (2011) Des moustiques génétiquement modifiés lâchés dans la nature en Malaisie. http://www.maxisciences.com/moustique/des-moustiques-genetiquement-modifies-laches-dans-la-nature-en-malaisie_art12202.html Copyright © Gentside Découverte (Visité le 07 Janvier 2015).
224. Piercy, S. E. (1951) Some observations on african horse sickness including an account of an out-break. amongst dogs. *East African Agricultural and Forestry Journal*, **17**, 62-64.

225. Pioz, M., Guis, H., Crespin, L., Gay, E., Calavas, D., Durand, B., *et al.* (2012) Why Did Bluetongue Spread the Way It Did? Environmental Factors Influencing the Velocity of Bluetongue Virus Serotype 8 Epizootic Wave in France. *PLoS ONE*, **7**, 1-14.
226. Poddar, T. K., Ray, S. & Choudhury, A. (1992) Ecology of larval *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Hoogly Estuary, Sagar Island, India. *Annals of the Entomological Society of America*, **10**, 19-25.
227. POUR_ORGANISATION DES NATIONS UNIES. (2007) Caractérisation des systèmes de production agricole au Sénégal.
228. Purse, B. V., Mellor, P. S., Rogers, D. J., Samuel, A. R., Mertens, P. P. C. & Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Microbiology*, **3**, 171- 181.
229. R_Core_Team. (2014) R version 3.1.1: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ULR: <http://www.R-project.org/>.
230. Rawlings, P., Pro, M. J., Pena, I. & Ortega, M. D. C. (1997) Spatial and seasonal distribution of *Culicoides imicola* in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**, 49-57.
231. Rawlings, P., Snow, W. F., Boorman, J., Denisone, E., Hamblin, C. & Mellor, P. S. (1998) *Culicoides* in relation to transmission of African Horse Sickness virus in The Gambia. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 155-159.
232. Ray, S. & Choudhury, A. (1988) Vertical Distribution of a Biting Midge, *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) During Different Seasons in the Hooghly Estuary, Sagar Island, India. *Insect Science and Its Application*, **9**, 329-333.
233. Reye, E. J. & Lee, D. J. (1963) The influence of the tide cycle on certain species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, **87**, 377-387.
234. Rieb, J. P. (1982) Contribution à la connaissance de l'écologie et de la biologie des Cératopogonidés (Diptera, Nematocera). Thèse de Doctorat es Sciences Naturelles (Diplôme d'Etat) U.E.R. Vie et Terre, Strasbourg, 395 pp.
235. Robert, V. & Carnevale, P. (1984) Les vecteurs du paludisme en Afrique Subsaharienne. *Etudes Médicales*, **2**, 79-90.
236. Rodhain, F. & Perez, C. (1985) Précis d'entomologie médicale et vétérinaire-Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. Paris 458 pp.
237. Saegerman, C., Berkvens, D., Mellor, P. S., Dal Pozzo, F., Porter, S. & Zientara, S. (2008) Epidémiologie de la fièvre catarrhale ovine en Europe : situation actuelle et perspectives. *Rencontre recherches ruminants*, **15**, 17-24.
238. Sagna, P. (2000) Le climat. In *Atlas du Sénégal* (ed. by J. A. Paris), pp. 16-19.
239. Sanders, C. J. & Carpenter, S. (2014) Assessment of an immunomarking technique for the study of dispersal of *Culicoides* biting midges. *Infection Genetics and Evolution*.
240. Sarr, J., Diop, M. & Cissokho, S. (1988) La peste équine africaine au Sénégal: état de l'immunité naturelle et/ou acquise des chevaux autour de foyers récents. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, **41**, 243-246.
241. Sarr, J., Diop, M. & Cissoko, S. (1987) La peste equine africaine au senegal :un nouveau foyer a type 9 dans la commune de Thies. *ISRA VIROLOGIE*, no. 034, 1-6 pp.
242. Scheffer, E. G., Venter, G. J., Labuschagne, K., Page, P. C., Mullens, B. A., MacLachlan, N. J., *et al.* (2012) Comparison of two trapping methods for *Culicoides* biting midges and determination of African horse sickness virus prevalence in midge populations at Onderstepoort, South Africa. *Veterinary Parasitology*, **185**, 265-273.
243. Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Al-Quraishy, S., Schumacher, B., Jatzlau, A., *et al.* (2009) Pilot study on deltamethrin treatment (Butox 7.5, Versatrine) of cattle and

- sheep against midges (*Culicoides* species, Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, **104**, 809-813.
244. Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Schumacher, B., Jatzlau, A., Al-Quraishy, S., *et al.* (2008) Effects of permethrin (Flypor) and fenvalerate (Acadrex60, Arkofly) on *Culicoides* species-the vector of Bluetongue virus. *Parasitology Research*, **104**, 815-208.
 245. Schmidtman, E. T., Jonea, C. J. & Gollands, B. (1980) Comparative host-seeking activity of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) attracted to pastured livestock in central New York State, USA. *Journal of Medical Entomology*, **17**, 221-231.
 246. Schwenkenbecher, J. M., Mordue, A. J. & Piertney, S. B. (2008) Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bulletin of Entomological Research*, 1-5.
 247. Sellers, R. F. (1984) Bluetongue in Africa, the mediterranean region and Near East-disease, virus and vectors. *Preventive Veterinary Medicine*, **2**, 371-378.
 248. Sellers, R. F., Gibbs, E. P. J., Herniman, K. A. J. & al., e. (1979) Possible origin of the bluetongue epidemic in Cyprus, August 1977. *Journal of Hygiene* **83**, 547-555.
 249. Sellers, R. F. & Mellor, P. S. (1993) Temperature and the persistence of virus in *Culicoides* spp. during adverse conditions. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, **12**, 733-755.
 250. Sellers, R. F., Pedgley, D. E. & Tucker, M. R. (1977) Possible spread of African horse sickness on the wind. *Journal of Hygiene* **79**, 279-298.
 251. Sellers, R. F., Pedgley, D. E. & Tucker, M. R. (1978) Possible windborne spread of bluetongue to Portugal, June-July 1956. *Journal of Hygiene* **81**, 189-196.
 252. Service, M. W. (1969) Studies on the biting habits of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, *C. obsoletus* (Meigen) and *C. punctatus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) in Southern England. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*, **44**, 1-10.
 253. Sharp, N. A. D. (1927) Development of *Microfilaria perstans* in *Culicoides grahmi*; a preliminary note. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **27**, 70.
 254. Simonsen, P. E., Onapab, A. W. & Asioc, S. M. (2010) *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Tropica*, 1-12.
 255. Sivakoff, F. S., Rosenheim, J. A., Dutilleul, P. & Carrière, Y. (2013) Influence of the surrounding landscape on crop colonization by a polyphagous insect pest. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **149**, 11-21.
 256. Sohn, R. & Yuill, T. M. (1991) Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wild ruminants. *Bulletin of the Society of Vector Ecology*, **16**, 17-24.
 257. Staak, C., Allmang, U. K. & Mehltitz, D. (1981) The complement fixation test for the species identification of bloodmeals from tsetse flies. *Tropenmedizin und Parasitologie*, **32**, 97-98.
 258. Stendel, W., Hamel, H. D., Sieveking, H. U. & Brtihne, D. (1992) Analytical determination of the distribution of flumethrin on the body surface of cattle following topical pour-on application. *Veterinary Parasitology*, **42**, 137-143.
 259. Sullivan, M. F., Gould, D. J. & Maneechai, S. (1971) Observations on the host range and feeding preferences of *Aedes albopictus* (Skuse). *Journal of Medical Entomology*, **8**, 713-716.
 260. Tabachnick, W. J. (1996) *Culicoides variipennis* and bluetongue- virus epidemiology in the United States. *Annual Review of Entomology*, **41**, 23- 43.
 261. Tabachnick, W. J. (2004) *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Veterinaria Italiana* **40**, 145-150.

262. Takken, W. & Verhulst, N. O. (2013) Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, **58**, 433-453.
263. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher Glen, N. M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
264. Tanner, G. D. & Turner, J. E. C. (1974) Vertical activities and host preferences of several *Culicoides* species in a southwestern Virginia Forest. *Mosquito News*, **34**, 66-70.
265. Theiler, A. (1910) The susceptibility of the dog to african horse sickness. *Journal of Comparative Pathology*, **23**, 315-325.
266. Theodoridis, A., Giesecke, W. H. & Du Toit, I. J. (1973) Effect of ephemeral fever on milk production and reproduction of dairy cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **40**, 83-91.
267. Vale, G. A., Hargrove, J. W., Chamisa, A., Grant, I. F. & Torr, S. J. (2015) Pyrethroid treatment of cattle for tsetse control: Reducing its impact on dung fauna. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **9**, e0003560.
268. Van Ark, H. & Meiswinkel, R. (1992) Subsampling of large light trap catches of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **59**, 183-189.
269. Van der Rijt, R., Van den Boom, R., Jongema, Y. & Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. (2008) *Culicoides* species attracted to horses with and without insect hypersensitivity. *Veterinary Journal*, **178**, 91-97.
270. Van Sittert, S. J., Drew, T. M., Kotze, J. L., Strydom, T., Weyer, C. T. & Guthrie, A. J. (2013) Occurrence of African horse sickness in a domestic dog without apparent ingestion of horse meat. *Journal of the South African Veterinary Association* **84**, 948-952.
271. Vattier-Bernard, G., Itoua, A., Trouillet, J. & Lallemand, M. (1986) Les Ceratopogonidae (Diptera) du Mayombé Congolais. 1. Rythme d'activité journalier des femelles de *Culicoides grahamii* Austen, 1909. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **61**, 367-377.
272. Velthuis, A., Saatkamp, H. W., Mourits, M. C. M., Koeijer, A. A. & Elbers, A. R. W. (2010) Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, **93**.
273. Venail, R., Lhoir, J., Fall, M., Del Río, R., Talavera, S., Labuschagne, K., *et al.* (2015) Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasites and Vectors*.
274. Venail, R., Mathieu, B., Setier-Rio, M. L., Borba, C., Alexandre, M., Viudes, G., *et al.* (2011) Laboratory and Field-Based Tests of Deltamethrin Insecticides Against Adult *Culicoides* Biting Midges. *Journal of Medical Entomology*, **48**, 351-357.
275. Venter, G. J., Graham, S. D. & Hamblin, C. (2000) African horse sickness epidemiology: vector competence of south african *Culicoides* species for virus serotypes 3, 5 and 8. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 245-250.
276. Venter, G. J., Labuschagne, K., Hermanides, K. G., Boikanyo, S. N. B., Majatladi, D. M. & Morey, L. (2009) Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Veterinary Parasitology*, **166**, 299-307.
277. Venter, G. J., Majatladi, D. M., Labuschagne, K., Boikanyo, S. N. B. & Morey, L. (2012) The attraction range of the Onderstepoort 220 V light trap for *Culicoides* biting midges as determined under South African field conditions. *Veterinary Parasitology*, **190**, 222-229.

278. Venter, G. J., Meiswinkel, R., Nevill, E. M. & Edwards, M. (1996) *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) associated with livestock in the Onderstepoort area, Gauteng, South Africa as determined by light trap collections. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **63**, 315-325.
279. Venter, G. J., Mellor, P. S. & Paweska, J. T. (2006) Oral susceptibility of South African stock-associated *Culicoides* species to bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 329–334.
280. Venter, G. J. & Paweska, J. T. (2007) Virus recovery rates for wild-type and live-attenuated vaccine strains of African horse sickness virus serotype 7 in orally infected South African *Culicoides* species. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 377-383.
281. Venter, G. J., Paweska, J. T., Van Dijk, A. A., Mellor, P. S. & Tabachnick, W. J. (1998) Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 378-385.
282. Venter, G. J., Wright, I. M., Van der Linde, T. C. & Paweska, J. T. (2009) The oral susceptibility of South African field populations of *Culicoides* to African horse sickness virus. *Medical and Veterinary Entomology*, **23**, 367-378.
283. Viennet, E. (2011) Insectes et maladies émergentes : Contacts hôte/*Culicoides* en région paléarctique et leurs implications dans la transmission de la fièvre catarrhale ovine. Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Microbiologie/Parasitologie, 160 pp.
284. Viennet, E., Garros, C., Gardes, L., Rakotoarivony, I., Allene, X., Lancelot, R., *et al.* (2012) Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges: implications for transmission of orbiviruses. *Medical and Veterinary Entomology*, **1-12**.
285. Viennet, E., Garros, C., Lancelot, R., Allene, X., Gardes, L., Rakotoarivony, I., *et al.* (2011) Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of *Orbiviruses*. *Parasites and Vectors*, **4**, 119.
286. Viennet, E., Garros, C., Rakotoarivony, I., Allène, X., Gardès, L., Lhoir, J., *et al.* (2012) Host-Seeking Activity of Bluetongue Virus Vectors: Endo/Exophagy and Circadian Rhythm of *Culicoides* in Western Europe. *PLoS ONE*, **7**, e48120.
287. Von Seidlein, L., Konstantin, I., Bruun, R., Jawara, M., Pinder, M., Knols, B. G. J., *et al.* (2012) Airflow attenuation and bed net utilization: observations from Africa and Asia. *Malaria Journal*, **11**, 200.
288. WHO. (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: mimeographed document (WHO/VBC/81.810). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
289. WHO. (1996) Evaluation and testing of insecticides. World Health Organization, Geneva; Report of the WHO Informal Consultation WHO/HQ, Geneva, 7-11 October 1996, (document CTD/WHOPES/IC/96.1). , Geneva.
290. WHO. (2013) Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
291. Wilson, A. & Mellor, P. (2008) Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitology Research*, **103**, 69-77.
292. Wirth, W. W. & Dyce, A. L. (1985) The taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses. In *Barber TL, Jochim MM (eds) Bluetongue and related orbiviruses* (ed. by N. Y. Alan R. Liss), pp. 151-164.
293. Wirth, W. W. & Hubert, A. A. (1989) The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, **44**, 1-509.

294. Wirth, W. W. & Marston, N. (1968) A method for mounting small insects on microscope slides in canada balsam. *Annals of the Entomological Society of America*, **61**, 783-784.
295. Wongsathuaythong, S., Fuangtong, R. & Ketavan, C. (1977) Insect and arachnid allergy in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **60**, 274-278.
296. Xia, X. & Xie, Z. (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, **92**, 371-373.
297. Yadouleton, A. W., Asidi, A., Djouaka, R. F., Braïma, J., Agossou, C. D. & Akogbeto, M. C. (2009) Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malaria Journal* **14**, 103.
298. Yanase, T., Kato, T., Kubo, T., Yoshida, K., Ohashi, S., Yamakawa, M., *et al.* (2005) Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985-2002. *Journal of Medical Entomology*, **42**, 63-67.
299. Yanase, T., Matsumoto, Y., Matsumori, Y., Aizawa, M., hirata, M., Kato, T., *et al.* (2013) Molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the southern part of Japan. *Journal of Medical Entomology*, **50**, 1105-1110.
300. Zanella, G., Chartier, C. & Biteau-Coroller, F. (2010) Signes cliniques de la FCO dus au sérotype 8 en France. *Bulletin épidémiologique* **35**, 1-12.
301. Zientara, S. (2003) La peste équine (687-705). In *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes* (ed. by P. C. Lefevre, J. Blancou & R. Chermette), pp. 1762. Tec & Doc Lavoisier, Paris
302. Zientara, S. (2005) Peste équine. *Maisons Alfort*, 27-31.
303. Zientara, S., Ponçon, N., Martinez-López, B. & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012) La peste équine : de l'expérience espagnole au risque pour la France. In *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no /Spécial Équidés*, pp. 26-29.
304. Zimmer, J. Y. (2007) Contribution à l'étude écologique des larves du genre *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae), comprenant les espèces vectrices de la fièvre catarrhale ovine (Bluetongue). Travail de fin d'études (option Nature, Eaux et Forêts), Gembloux, 75 pp.
305. Zimmer, J. Y., Losson, B. & Haubruge, E. (2008) Biologie et écologie des *Culicoides* (Diptera), vecteurs de la fièvre catarrhale ovine. *Entomologie Faunistique*, **61**, 53-57.

Annexes

Articles publiés

Annexe 1

OPEN ACCESS Freely available online



First Record of *Culicoides oxystoma* Kieffer and Diversity of Species within the Schultzei Group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) Biting Midges in Senegal

Mame T. Bakhoun^{1*}, Moussa Fall¹, Assane G. Fall¹, Glenn A. Bellis², Yuval Gottlieb³, Karien Labuschagne^{4,5}, Gert J. Venter^{4,6}, Mariame Diop¹, Iba Mall¹, Momar T. Seck¹, Xavier Allène⁷, Maryam Diarra¹, Laëtitia Gardès⁷, Jérémy Bouyer^{1,7}, Jean-Claude Delécolle⁸, Thomas Balenghien⁷, Claire Garros^{7*}

1 Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Dakar, Sénégal, **2** Department of Agriculture, Winnellie, Australia, **3** Koret School of Veterinary Medicine, Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food, and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel, **4** Parasites, Vectors and Vector-borne Diseases, Agricultural Research Council-Onderstepoort Veterinary Institute, Onderstepoort, South Africa, **5** Department of Zoology & Entomology, University of Pretoria, Hatfield, Pretoria, South Africa, **6** Department of Veterinary Tropical Diseases, University of Pretoria, Onderstepoort, South Africa, **7** Cirad, UMR15 Contrôle des Maladies; INRA, UMR1309 Contrôle des Maladies, Montpellier, France, **8** Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France

Abstract

The Schultzei group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) is distributed throughout Africa to northern Asia and Australasia and includes several potential vector species of livestock pathogens. The taxonomy of the species belonging to this species group is confounded by the wide geographical distribution and morphological variation exhibited by many species. In this work, morphological and molecular approaches were combined to assess the taxonomic validity of the species and morphological variants of the Schultzei group found in Senegal by comparing their genetic diversity with that of specimens from other geographical regions. The species list for Senegal was updated with four species: *Culicoides kingi*, *C. oxystoma*, *C. enderleini* and *C. nevillei* being recorded. This is the first record of *C. oxystoma* from Africa south of Sahara, and its genetic relationship with samples from Israel, Japan and Australia is presented. This work provides a basis for ecological studies of the seasonal and spatial dynamics of species of this species group that will contribute to better understanding of the epidemiology of the viruses they transmit.

Citation: Bakhoun MT, Fall M, Fall AG, Bellis GA, Gottlieb Y, 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(12): e84316. doi:10.1371/journal.pone.0084316

Editor: Patrick O'Grady, University of California, Berkeley, United States of America

Received: October 9, 2013; **Accepted:** November 21, 2013; **Published:** December 30, 2013

Copyright: © 2013 Bakhoun et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded partly by the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad), and by the EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. This paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext177 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish or the preparation of the manuscript.

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

* E-mail: thierbakhoun2@yahoo.fr (MTB); claire.garros@cirad.fr (CG)

Introduction

The recent introduction and expansion of bluetongue virus (BTV) [1,2] and emergence of Schmallenberg virus [3] in Europe has emphasized the importance of accurate species identification and taxonomy of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) responsible for transmitting these viruses. Currently approximately 1,400 species placed into 29 formal subgenera and 39 informal species groups are recognized worldwide [4,5]. In the Afrotropical region, some 156 species have been described but many more await description [6] and most of the literature on the taxonomy of Afrotropical species are in the need for revision [7–10].

The Afrotropical region is endemic for most of the known *Culicoides*-borne economical important diseases of livestock, like bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus

(EHDV) [11]. While many local breeds of livestock appear to have achieved some level of tolerance to some of these diseases [12], others, for example African horse sickness virus (AHSV), still cause serious outbreaks in many parts of Africa [13] as recently illustrated with the epidemic recorded in Senegal in 2007 [14,15].

In the Afrotropical region, *Culicoides imicola* Kieffer, subgenus *Avaritia* Fox, is regarded as the most important and proven orbivirus vector species of livestock diseases and this was recently reinforced when this species became an apparent invasive species throughout the Mediterranean basin [16,17]. Other groupings of *Culicoides* which have been implicated in the transmission of some of these viruses is the Schultzei species group. Species belonging to this group have been associated with BTV [18,19], AHSV [20] and EHDV [21,22]. In especially the Australian and Oriental subregions, *C. oxystoma* Kieffer is a well-known vector of bovine

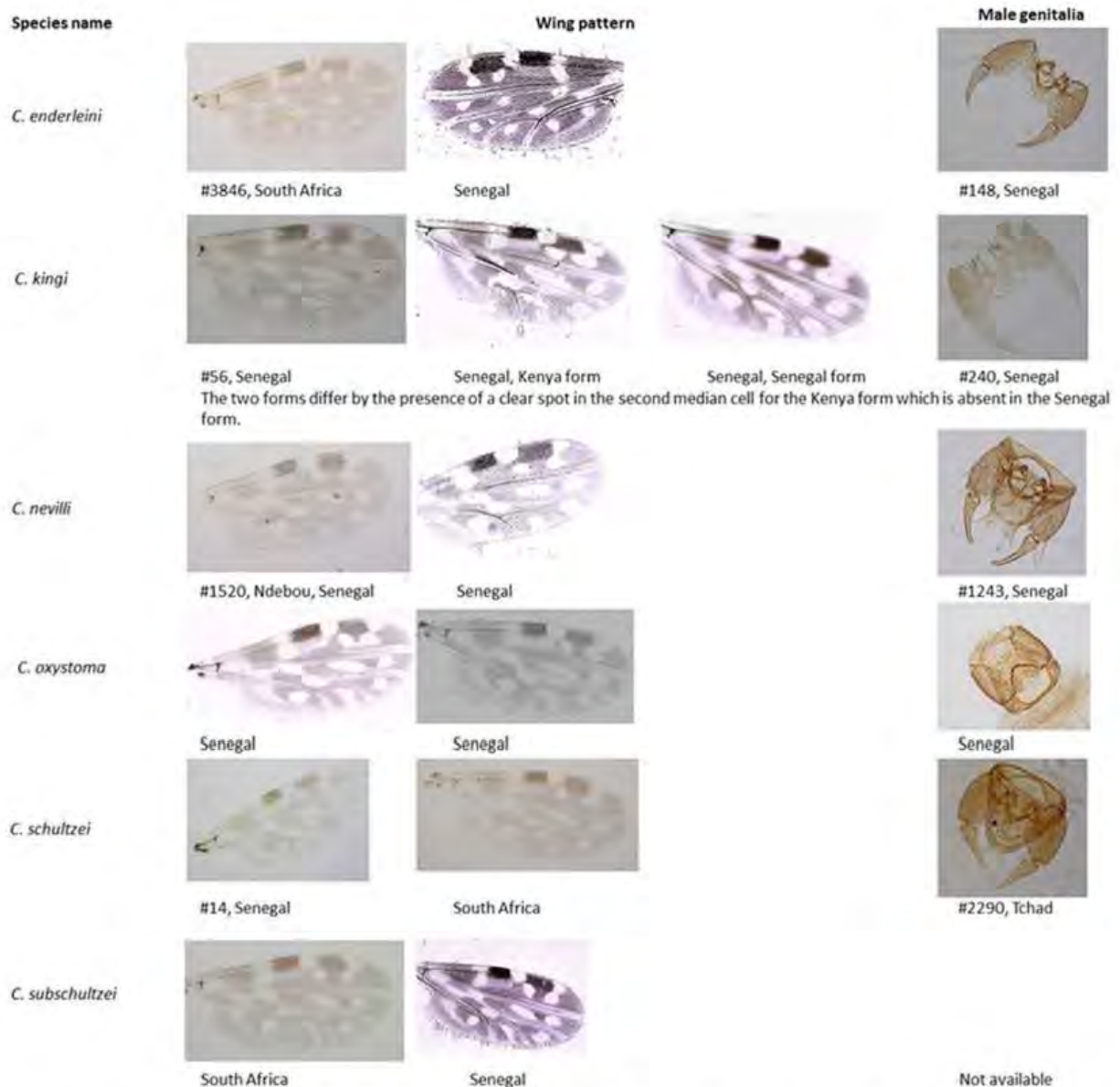


Figure 1. Female wing pattern and male genitalia of the Schultzei species group collected in Senegal (samples from the study and Cornet's collection) and South Africa. The slide reference number refers to the Cornet collection reference numbers [8].
doi:10.1371/journal.pone.0084316.g001

arboviruses such as Akabane virus [23,24] and is suspected of being vector of EHDV in Israel [25].

The status of the Schultzei group and its subgeneric affiliation has been disputed. Several authors placed this species group within *C. subg. Remmia* Glukhova [4,6,26] with regarding this group as a valid subgenus, while others maintain that *C. subg. Remmia* is a junior synonym of *C. subg. Oecacta* (Poey) [8,27] or leave the group as unplaced to subgenus [28]. The status of the species within this group is equally contentious with widespread use of the name *C. schultzei* for members of the group [29]. The revision of Afrotropical species by Cornet & Brunhes [8] resolved most of the issues associated with the African fauna and Borkent [4] currently places eight species in *C. subg. Remmia* (= Schultzei

group): *C. schultzei* (Enderlein), *C. oxystoma*, *C. kingi* Austen, *C. rhizophorensis* Khamala and Kettle, *C. neoschultzei* Boorman and Meiswinkel, *C. subschultzei* Cornet and Brunhes, *C. enderleini* Cornet and Brunhes and *C. nevillei* Cornet and Brunhes.

Culicoides oxystoma is known from the Oriental and Australasian regions [28], whereas all the other species within the Schultzei group are confined to the afrotropical region with some species extending north to the Mediterranean and Middle East [8,18,25,28,30–34]. The identity of the most widespread species, currently referred to as *C. oxystoma*, is unclear as many of the records listed by Wirth & Hubert [28] are based on misidentifications of *C. schultzei* and no taxonomic revisions of the Schultzei group have included this species. One barrier to the inclusion of *C.*

Table 1. Female samples used for the molecular analysis, localization and Genbank accession numbers for the COI sequences.

Species	Geographical origin	Genbank accession numbers
<i>C. enderleini</i>	Reunion Island, France, collected in 2005	KF682426–KF682428
<i>C. enderleini</i>	Onderstepoort, South Africa, collected in 2009	KF682478–KF682479
<i>C. enderleini</i>	Madagascar, from Augot et al (2013)	KF186429–KF186431
<i>C. enderleini</i>	Senegal, collected in 2011	KF682471–KF682477
<i>C. kingi</i>	Senegal, collected in 2011	KF682482–KF682495
<i>C. nevillei</i>	Senegal, collected in 2011	KF682496–KF682497
<i>C. nevillei</i>	Madagascar, from Augot et al (2013)	KF186428
<i>C. oxystoma</i>	Senegal, collected in 2011	KF682498–KF682522
<i>C. oxystoma</i>	Australia	KF682529–KF682533
<i>C. oxystoma</i>	Israel, from Morag et al (2012)	JN545045–JN545049, JN545052, JN545054
Schultzei Group	Israel, from Morag et al (2012)	JN545050–JN545051, JN545053
<i>C. oxystoma</i>	Japan, from Matsumoto et al (2009)	AB360978, AB360980–AB360985
<i>C. subschultzei</i>	Skukuza Kinger national park, South Africa, collected in 2008	KF682523–KF682525
<i>C. imicola</i>	Reunion Island, France, collected in 2005	KF642480–KF682481

doi:10.1371/journal.pone.0084316.t001

oxystoma in a revision is that the original description by Kieffer is very brief [35] and the type specimen of *C. oxystoma* from Kolkata (= Calcutta) in India, has been lost [28].

Cornet & Brunhes [8] listed three species belonging to the Schultzei group from Senegal: *C. enderleini*, *C. nevillei* and two morphological forms of *C. kingi* termed a Kenya form and a Senegal form. They separated these latter two forms by the degree of posterior expansion of the basal pale spot basally in cell m_1 of the wing with this spot crossing vein M_2 in the Kenya form but not crossing the vein in the Senegal form (Figure 1). This morphological difference appeared to be associated with a difference in breeding habitat but whether these two forms constitute a single species or not remains unclear. Similarly, the morphological similarity between Oriental *C. oxystoma* and the Afrotropical *C. subschultzei* makes differentiation of these species problematic [36]. *Culicoides schultzei* (= *C. imicola*) is recorded in southern, eastern and central Africa [8], although it has not been recorded in western Africa [9].

Using molecular analysis of the Cytochrome Oxidase I (COI) gene, Morag et al. [25] recently established that two distinct lineages of the Schultzei group are present in Israel. Not only does this suggest the presence of two species in Israel, one of which is synonymous with the species in Japan, it also suggests that analysis of the COI gene may be useful in addressing some of the taxonomic problems associated with this group, for example the status of the Kenya and Senegal forms of *C. kingi* and that of *C. oxystoma* and *C. subschultzei*. In this work, we combined morphological and molecular analyses to assess the diversity of the species of the Schultzei group present in Senegal in relation to that found in other regions. The specific status of morphological variants of *C. kingi* and *C. oxystoma* present in Senegal was established and an updated species list of Senegal for this group is provided.

Materials and Methods

Specimen Collection

Adult midges were collected using black light/suction traps placed near horses within stud farms at five sites in Senegal (Figure 2) between September and October 2011 (3 nightly trappings/site/month). The owners of stud farms gave permission

to conduct the study on their sites. Field workers did not have any contact with the horses. Specimens were preserved in 70% ethanol and identified and sexed under a binocular microscope using the identification keys of Glick [7], Cornet & Brunhes [8] and Boorman [37]. For each species, specimens representing all available morphological variants were included in the analysis. Wings from females and male genitalia were dissected prior to processing and slide-mounted to record these morphological variations. Samples from La Reunion Island (*C. enderleini*), South Africa (*C. enderleini*, *C. subschultzei*, *C. schultzei*), and Australia (*C. oxystoma*) were used to represent the geographic variation of these species. COI sequences submitted by Morag et al [25], Matsumoto et al [38] and Augot et al [39] were added to the dataset (Table 1).

Extraction of Genomic DNA

Genomic DNA was individually extracted following an extraction protocol with Chelex resin in 5% (Resin Chelex100®, Chelating Ion Exchange Resin, Bio-Rad, France) as described in Viennet et al [40] and Solano et al [41]. A volume of 500 µl of Chelex solution was dispensed into each tube of 1.5 ml. Each individual was removed from ethanol and dried on blotting paper. The individual was retrieved and transferred to a tube with Chelex solution and ground using a piston. The tubes were incubated at 56°C for 60 minutes and then at 95°C for 30 minutes (for thermal lysis). Immediately after heating, the tubes were centrifuged at 13,000 revs/min for 1 minute to pellet the Chelex resin with inhibitor ions and cellular debris.

Polymerase Chain Reaction Amplification and Sequencing of COI

Cytochrome Oxidase I (COI) amplification of the gene was carried out using primers C1J1718 (Forward) 5'-GGA-GGA-TTT-GGA-AAT-TGA-ATT-GT-3' and C1N2191 (Reverse) 5'-CAG-GTA-TTA-AAA-AAA-AAA-TAT-CTT-CTG-G-3' to obtain an approximately 600 bp product as described previously [42]. Amplification reactions by Polymerase Chain Reaction (PCR) were performed in 25 µl of reaction volume with 5 µl of buffer 5X, 0.5 µl of dNTP (10 mM), 2 µl of MgCl₂ (25 mM), 0.5 ml of each primer; 0.5 µl of Taq polymerase (5 U/µl), 15 µl of

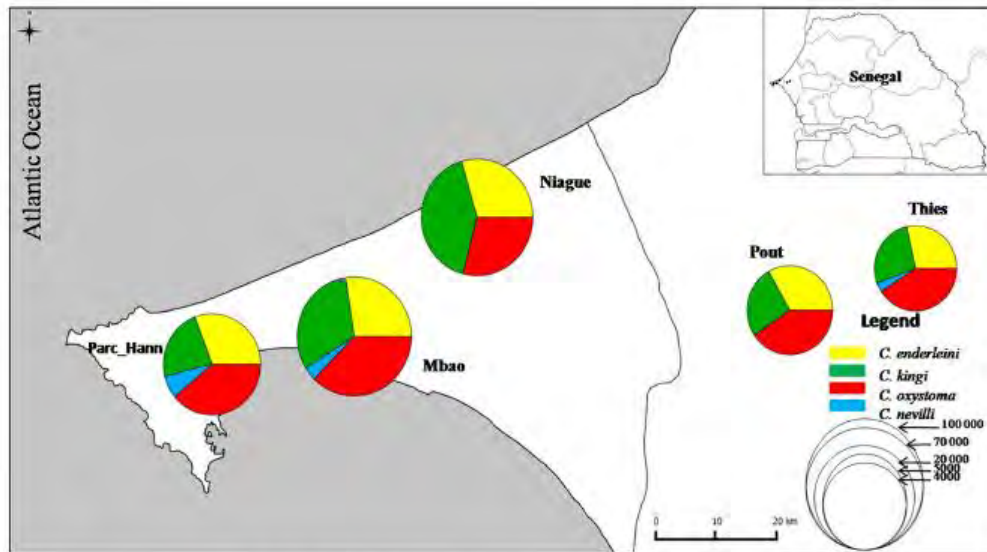


Figure 2. Location of the study sites in Senegal and abundance of species from the Schultzei group.
doi:10.1371/journal.pone.0084316.g002

sterile water and 1 µl of DNA. Touch-up PCR amplification was used to reduce non-specific amplifications and optimize the quality of amplification for better sequencing. The cycling profile of the COI gene consisted of an initial denaturation stage of 1 minute at 94°C, followed by 5 cycles of 40 seconds at 94°C, 40 seconds at 45°C and 1 minute at 72°C, then 35 cycles of 40 seconds at 94°C, 40 seconds at 51°C, 1 minute at 72°C and a final elongation of 5 minutes at 72°C. The PCR products were visualized on 1% agarose gel with a Gel Red staining after migration of 90 minutes at 100 volts by electrophoresis, before being sent to Cogenics (Grenoble, France) for sequencing.

Sequence Alignment, Phylogenetic and Genetic Distance Analyses

Multiple alignments of the sequences were generated using the CLUSTALW algorithm in BioEdit [43]. Molecular evolutionary analyses were conducted using DAMBE [44] and MEGA version 5 [45]. The phylogenetic reconstructions were performed by Maximum Likelihood (ML) and Bayesian analyses (BA). The ML analyses were carried out with MEGA v5 [45], incorporating best fit models of sequence evolution determined using the Akaike Information Criterion (AIC) and employing 1,000 bootstrap replications to determine node reliabilities. The AIC implemented within jModelTest was used to determine the most suitable evolutionary model(s) for the Bayesian and ML analyses [46]. The AIC model selected for the COI was T92+G, followed by

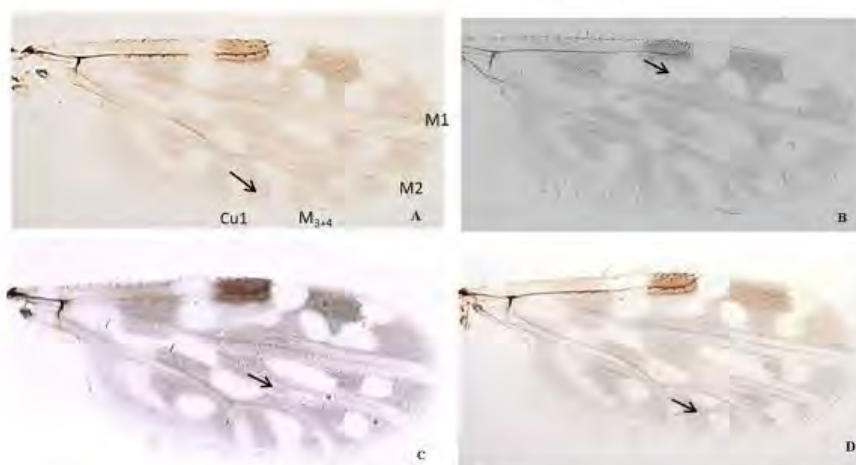


Figure 3. Variation in the wing patterns of *C. subschultzei* and *C. oxystoma* found in Senegal: *Culicoides subschultzei* typical form (A), *Culicoides oxystoma* typical form (B) and morphological variants: absence of pale spots in the second median cell (C) and presence of two pale spots in cubital cell (D).

doi:10.1371/journal.pone.0084316.g003

Table 2. Estimates of evolutionary divergence of sequence pairs between and within populations and species.

	Within species/group mean distance	<i>C. enderleini</i>	<i>C. kingi</i>	<i>C. nevillei</i>	<i>C. oxystoma</i> Australia	<i>C. oxystoma</i> Israel	<i>C. oxystoma</i> Japan	<i>C. oxystoma</i> Senegal
<i>C. enderleini</i>	0.022	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. kingi</i>	0.015	0.0132	–	–	–	–	–	–
<i>C. nevillei</i>	0.028	0.12	0.106	–	–	–	–	–
<i>C. oxystoma</i> Australia	0.000	0.125	0.102	0.07	–	–	–	–
<i>C. oxystoma</i> Israel	0.015	0.131	0.103	0.079	0.019	–	–	–
<i>C. oxystoma</i> Japan	0.005	0.124	0.101	0.073	0.015	0.021	–	–
<i>C. oxystoma</i> Senegal	0.009	0.131	0.098	0.09	0.041	0.046	0.043	–
<i>C. subschultzei</i>	0.011	0.119	0.112	0.054	0.082	0.092	0.091	0.1

Analyses were conducted using the Jukes-Cantor model. The analysis involved 82 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 472 positions in the final dataset.
doi:10.1371/journal.pone.0084316.t002

T92+G+I and HKY+G. The best fit model (T92+G) was used for both ML and BA analysis. Summary sequence statistics were generated using MEGA v5. Bayesian analyses was performed using MrBayes [47] with the following settings: the ML model employed two substitution types ("nst = 2"), with rate variation across sites modeled using a gamma distribution (rate-s = "gamma"); Markov Chain Monte Carlo searches were done with four chains for 500,000 generations, with trees sampled every 100 generations (the first 1,000 trees were discarded as "burn in"). The appropriate burn-in fraction and convergence of the Markov Chain Monte Carlo chains were graphically assessed by evaluating the stationary phase of the chains using Tracer v1.5 [48]. Convergence metrics provided by MrBayes were checked to ensure that the maximum standard deviation of split frequencies of any of the runs was under 0.05 and that the potential scale reduction factor for all parameters approached 1.0. *Culicoides imicola* was used as an out-group. Estimates of average evolutionary divergence over sequence pairs within and between groups were made using the Maximum Composite Likelihood model for the COI sequences. The average genetic distances between the clades inferred by phylogenetic analyses were computed by Tamura-3 parameter or Jukes-Cantor model with the program Mega v5. The two models gave the same genetic distance matrix (data shown for JC model).

Results

Morphological Identification

Morphological examination of 82,506 individuals from the 5 study sites revealed the presence of four species belonging to the Schultzei group (Figure 2). These species were referable to *C. kingi* (both the Kenya and Senegal forms sensu Cornet & Bruhnes), *C. oxystoma* (showing large phenotypic variation) (Figure 3), *C. enderleini* and *C. nevillei*. Although *C. nevillei* was present at three sites, the other species were abundant and equally present on the five sampled sites.

Phylogenetic Analysis

A total of 63 COI sequences were obtained referable to six species including *C. imicola* used as out-group (Table 1). Twenty COI sequences were added to the dataset from the literature (Table 1). Sequencing of COI sequences of *C. schultzei* was not successful. Four individuals of each *C. kingi* form were obtained (Kenya form: KF682484–KF682485, KF682491–KF682492);

Senegal form: KF682487, KF682489–KF682490, KF682494). The ML and BA trees depicted the same topology. Six distinct and well-supported phylogenetic lineages were clearly differentiated (Figure 4). One clade grouped the individuals identified as *C. kingi*, including both the Senegal and Kenya forms, and the three unidentified sequences from Israel (JN545050–51, JN545053). Another included all specimens of *C. enderleini* from all different location sites. Specimens of *C. oxystoma* formed two separate clades, one including all specimens from the Palaearctic and Australasian regions (Japan, Israel, and Australia) and the other including all individuals from Senegal. The mean genetic distance between these two clades was two times higher than the mean variation within a clade. The specimens from Senegal identified as *C. oxystoma* and representing all of the morphological variations illustrated in Figure 2 were clustered in the same clade. The maximum variation within a clade was 2.8% within the *C. nevillei* clade, and the minimum distance between clades being 1.5% between *C. oxystoma* from Australia and Japan (Table 2).

Discussion

At least four species belonging to the Schultzei group are now known from Senegal: *C. enderleini*, *C. kingi*, *C. nevillei*, and *C. oxystoma*. Our phylogenetic analyses have identified the three unidentified individuals (JN545050–51, JN545053) from Morag et al. (2012) as *C. kingi* which confirms the presence of this species in Israel. Our study confirmed that the Kenya and Senegal forms of this species, described by Cornet & Bruhnes (1994) partially based on differing larval ecology, do not appear to be distinct species.

The relatively high genetic diversity observed within *C. nevillei* and *C. enderleini* probably reflects historically independent populations of these species on Madagascar and on mainland Africa as recently observed within Australian populations of *C. imicola* [49]. Overall, the *Culicoides* fauna of Madagascar has been understudied [39,50] and remains to be investigated.

The genetic similarity between Oriental and Australian specimens of *C. oxystoma* and those from Senegal confirms the identity of this species and is the first record of *C. oxystoma* in Africa south of Sahara. There has been a great deal of confusion in the literature between this species, *C. schultzei* and *C. subschultzei* [8,25,37]. Boorman (1989) suggested that most of the records of *C. schultzei* or the Schultzei group from north of the Sahara and eastwards through India refer to *C. oxystoma* and its presence in Senegal indicates that it is also present south of the Sahara. Taken

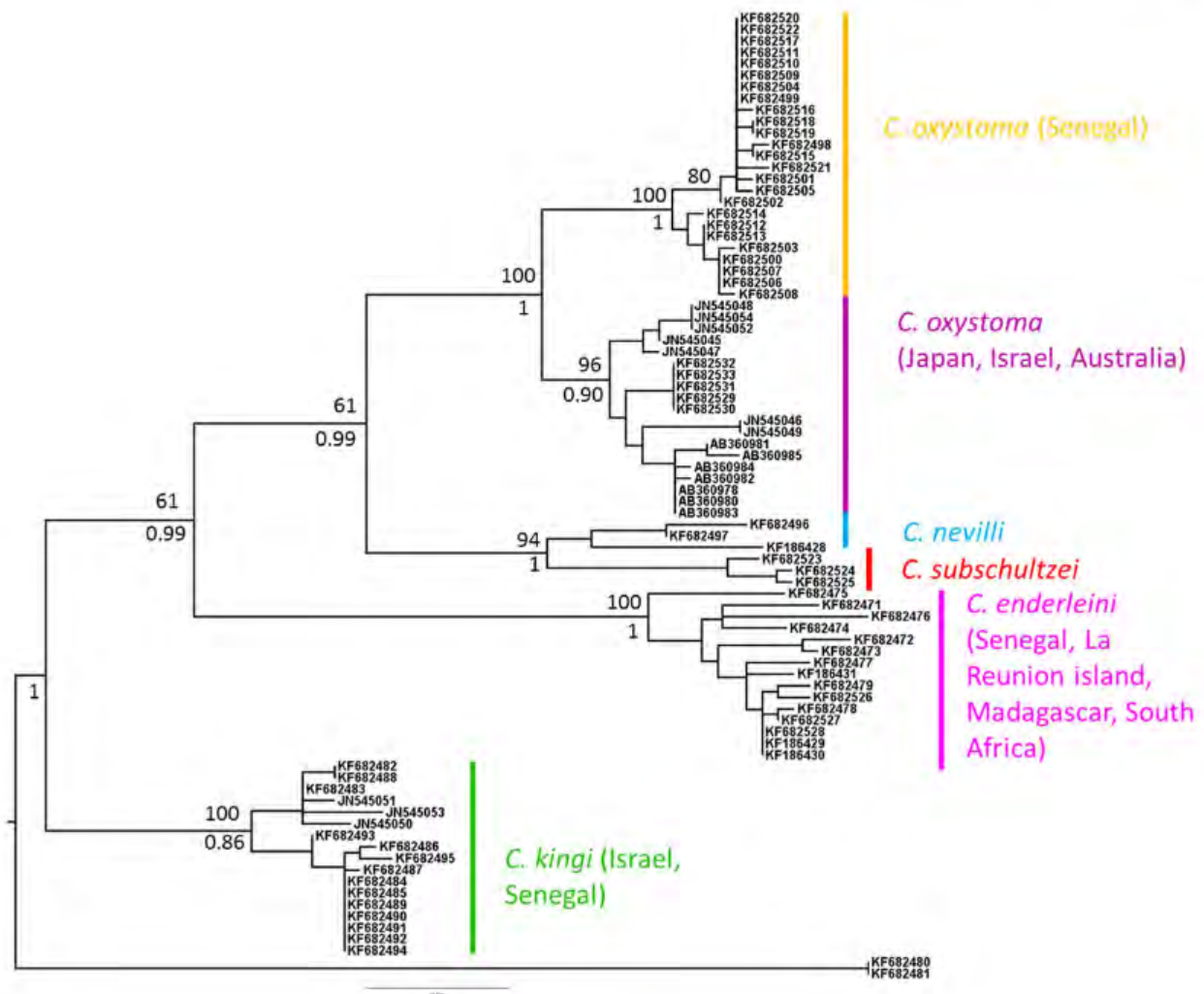


Figure 4. Phylogenetic analysis of species of the Schultzei group using COI sequence data. The topology shows Bayesian inference tree using program MrBayes. *Culicoides imicola* was designated as an outgroup taxon. Numbers indicate bootstrap values from ML (bottom) analyses, and posterior probabilities from Bayesian analysis (top). Only bootstrap values >60% and Bayesian posterior probabilities >0.5 are shown. Branch lengths represent nucleotide substitutions per site. doi:10.1371/journal.pone.0084316.g004

together, Boorman et al (1989) and our results showed that multiple species of the Schultzei group are sympatric in the Middle East (for instance at least *C. kingi* and *C. oxystoma* in Israel), and we recommend use of the most updated keys (Boorman 1989; Cornet and Brunhes 1994) when identifying material collecting from this area.

Culicoides oxystoma is a widespread species with a wide phenotypic variation that warrants further exploration. Specimens exhibiting the full range of morphological variation observed in Senegal (Figure 3) were shown to be conspecific but also showed strong support for two lineages within *C. oxystoma* indicating some level of reproductive isolation within this species. This might confirm what Boorman suspected as a differentiation within *C. oxystoma*, creating an Afrotropical lineage and a Palearctic and oriental lineage [36]. Despite the morphological similarity between *C. oxystoma* and *C. subschultzei* [36], COI analysis indicates that these two species are distinct with *C. subschultzei* being more closely related to *C. nevilli* than to *C. oxystoma*. Further investigations need to be implemented

including *C. schultzei*. Unfortunately, attempts to amplify DNA from the *C. schultzei* samples from South Africa were unsuccessful, probably because they were too old (collected in 1996). Further works will also need to include other known members of the group, *C. rhizophorensis* and *C. neoschultzei*, and probably look at other species showing morphological similarity [51].

Up to date no phylogenetic study has ever successfully validated the subgeneric classification of the genus *Culicoides* [4,5] and the validity of the Schultzei group, *C. subg. Rammia*, *C. subg. Oecacia*, and many other subgeneric groupings of *Culicoides*, remains doubtful. Augot et al. (2013) recently analysed the COI gene to test the monophyly of the Schultzei group and *C. subg. Oecacia* but their analysis were confounded by homoplasy of this gene and no conclusions could be drawn. They suggested the use of alternative genes to explore these relationships and it is likely that an integrated approach using a combination of morphological and molecular analyses might clarify this situation.

The wide distribution and economic importance of species of the Schultzei group highlight the need to re-evaluate the status of these species and a molecular approach might be an appropriate means of achieving that goal. Based on the numbers collected and wide distribution of the suspected vector species based on previous virus studies, these species can indeed play an important role in the epidemiology of AHSV in Senegal. In particular, future studies should focus on the differences between African and Oriental populations of *C. oxystoma* and establish the morphological and genetic limits of this species. Inclusion of material from the type locality of *C. oxystoma* in India would help to confirm the identity of specimens currently referred to this species.

References

- Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PPC, et al. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3: 171–181.
- Carpenter S, Wilson AJ, Mellor PS (2009) *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol* 17: 172–178.
- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, et al. (2011) Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerging Infect Dis* 18: 469–472.
- Borkent A (2012) Catalog of the Ceratopogonids. Available: <http://www.inhs.illinois.edu/research/flytree/borkent/>. Accessed 2013 Sept 1.
- Borkent A (2012) The subgeneric classification of species of *Culicoides* - thoughts and a warning <http://www.inhs.illinois.edu/research/flytree/borkent/2012> February 1.
- Meiswinkel R, Venter GJ, Nevill EM (2004) Vectors: *Culicoides* spp.; Coetzer JAW, Tustin RC, editors. Cape Town: Oxford University Press, Infectious diseases of livestock.
- Glick JJ (1990) *Culicoides* biting midges (Diptera : Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol* 27: 85–195.
- 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.
- Rawlings P, Snow WF, Boorman J, Denison E, Hamblin C, et al. (1998) *Culicoides* in relation to transmission of African Horse Sickness virus in The Gambia. *Med Vet Entomol* 12: 155–159.
- Khamala CPM, Kettle DS (1971) The *Culicoides* Latreille (Diptera : Ceratopogonidae) of East Africa. *Transaction of the Royal Entomological Society, London* 123: 1–95.
- Mellor PS, Baylis M, Mertens PPC (2009) Bluetongue; Pastoret PP, editor. London: Elsevier. 483 p.
- Gerdes GH (2004) A South African overview of the virus, vectors, surveillance and unique features of bluetongue. *Vet Ital* 40: 39–42.
- Mellor PS (1993) African horse sickness: transmission and epidemiology. *Vet Res* 24: 199–212.
- Diouf ND, Etter E, Lo MM, Lo M, Akakpo AJ (2013) Outbreaks of African horse sickness in Senegal, and methods of control of the 2007 epidemic. *Vet Rec* 172: 152.
- Akakpo AJ, Wombou Toukam CM, Mankor A, Ly C (2011) Economic impact of African horse sickness outbreak in Senegal in 2007. *Bull Animal Health Prod Africa* 59: 1–16.
- Venail R, Balenghien T, Guis H, Tran A, Setier-Rio ML, et al. (2012) Assessing diversity and abundance of vector populations at a national scale: example of *Culicoides* surveillance in France after bluetongue virus emergence. In: Mehlhorn H, editor. *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases*. Springer Berlin Heidelberg. 77–102.
- Mardulyn P, Goffredo M, Conte A, Hendrickx G, Meiswinkel R, et al. (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.
- Standfast HA, Dyce AL, Muller MJ (1985) Vectors of bluetongue virus in Australia. *Prog Clinical Biol Res* 178.
- Venter GJ, Mellor PS, Wright I, Paweska JT (2007) Replication of live attenuated vaccine strains of bluetongue virus in orally infected South African *Culicoides* species *Med Vet Entomol* 21: 239–247.
- Venter GJ, Wright IM, van der Linde TC, Paweska JT (2009) The oral susceptibility of South African field populations of *Culicoides* to African horse sickness virus. *Med Vet Entomol* 23: 367–378.
- Barnard BJ, Gerdes GH, Meiswinkel R (1998) Some epidemiological and economic aspects of a bluetongue-like disease in cattle in South Africa-1995/96 and 1997. *Onderstepoort J Vet Res* 65.
- Mellor PS, Osborne R, Jennings DM (1984) Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan. *J Hyg* 93.
- Oem JK, Chung JY, Kwon MS, Kim TK, Lee TU, et al. (2013) Abundance of biting midge species (Diptera : Ceratopogonidae, *Culicoides* spp.) on cattle farms in Korea. *J Vet Science* 14: 91–94.
- Yanase T, Kato T, Kubo T, Yoshida K, Ohashi S, et al. (2005) Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera : Ceratopogonidae) in southern Japan : 1985–2002. *J Med Entomol* 42: 63–67.
- Morag N, Saroya Y, Braverman Y, Klement E, Gottlieb Y (2012) Molecular identification, phylogenetic status and geographic distribution of *Culicoides oxystoma* (Diptera : Ceratopogonidae) in Israel. *PLoS ONE* 7: e33610.
- Dyce AL, Bellis GA, Muller MJ (2007) Pictorial atlas of Australasian *Culicoides* wings (Diptera: Ceratopogonidae); Australian Biological Resources Study, editor. Canberra. 88 p.
- Yu YX, Liu JH, Liu GP, Liu ZJ, Hao BS, et al. (2005) Ceratopogonidae of China, Insecta, Diptera; Military Medical Science Press, editor. Beijing. 1699 p.
- Wirth WW, Hubert AA (1989) The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera : Ceratopogonidae). *Mem Am Entomol Inst* 44: 1–509.
- Wirth WW, Dyce AL (1985) The current taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses. *Prog Clinical Biol Res* 178: 151–164.
- Hilali M, Abu-Elzein ET, Al-Afaleq A, Mellor PS, Boorman J, et al. (2003) *Culicoides* midges in some localities of Saudi Arabia and their veterinary significance. *Veterinarski Arhiv* 73: 285–294.
- Dik B, Yagci S, Linton YM (2006) A review of species diversity and distribution of *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey. *J Nat Hist* 40: 1947–1967.
- Alahmed AM, Kheir SM, Al Khareij MA (2010) Distribution of *Culicoides* Latreille (Diptera : Ceratopogonidae) in Saudi Arabia. *J Entomol* 7: 221–234.
- Tsutsui T, Hayama Y, Yamakawa M, Shirafuji H, Yanase T (2011) Flight behavior of adult *Culicoides oxystoma* and *Culicoides maculatus* under different temperatures in the laboratory. *Parasitol Res* 108: 1575–1578.
- Labuschagne K, Gerber LJ, Espie I, Carpenter S (2007) *Culicoides* biting midges at the National Zoological Gardens of South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 74: 343–347.
- Sen P, Das Gupta SK (1959) Studies on Indian *Culicoides* (Ceratopogonidae : Diptera). *Ann Entomol Soc America* 52: 617–630.
- The Pirbright Institute (2010) *Culicoides*.net. Available: http://www.culicoides.net/species_data/oxystoma. Accessed 2013 July 1.
- Boorman J (1989) *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) of the Arabian peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna Saudi Arabia* 10: 160–224.
- Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T, Noda H (2009) Characterization of internal transcribed spacer (ITS1–ITS2) region of ribosomal RNA gene from 25 species of *Culicoides* biting midges (Diptera : Ceratopogonidae) in Japan. *J Med Entomol* 46: 1099–1108.
- Augot D, Randrianambinintsoa FJ, Gasser A, Depaquit J (2013) Record of two species of *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) new for Madagascar and molecular study showing the parphyly of the subgenus *Oxecta* and the Schultzei group. *Bull Soc Pathol Exotique*.
- Viennet E, Garros C, Lancelot R, Allene X, Gardès L, et al. (2011) Assessment of vector/host contact : comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera : Ceratopogonidae), vectors of orbiviruses. *Parasites and Vectors* 4.
- Solano P, Duvallat G, Dumas V, Cuisance D, Cuny G (1997) Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera : Glossinidae). *Acta Trop* 65: 175–180.
- Simon C, Frati A, Beckenbach B, Crespi H, Liu H, et al. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic unity of mitochondrial gene sequence sand a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc America* 87: 651–701.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Acknowledgments

The authors are particularly grateful to all the people who gave assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds) in Senegal. The authors would like to thank Amélie Desvars (Cirad, CRVOI, La Réunion) and Thierry Baldet (Cirad, Montpellier, France) for the *Culicoides* samples collected in La Réunion Island, France. The authors would like to thank also Hélène Guis (Cirad) for helping with the map.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MTB MF AGF MTS JB CG. Performed the experiments: MTB MF MB IM XA MD LG. Analyzed the data: MTB MF GAB YG KL GJV JCD CG. Contributed reagents/materials/analysis tools: GAB KL GJV JCD. Wrote the paper: MTB MF AGF GAB YG KL GJV MTS JB JCD TB CG.

44. Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J Heredity* 92: 371–373.
45. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
46. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2 : more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9: 772.
47. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, et al. (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61: 539–542.
48. Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4 Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed 2013 Jan 1.
49. Bellis GA, Dyce AL, Gopurenko D, Mitchell A (2013) Revision of the Immaculatus group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from the Australasian biogeographic region with description of two new species. *Zootaxa* 3680: 15–37.
50. De Meillon B (1961) The Madagascan Ceratopogonidae. *Rev Entomol Mocambaie* 4: 34–64.
51. The Pirbright Institute (2010) Culicoides.net. Available: http://www.culicoides.net/taxonomy/species/species_groups/schultzei-grp 2013 Accessed 2013 Sept 1.

RESEARCH

Open Access

Seasonal dynamics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges, potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in the Niayes area of Senegal

Maryam Diarra^{1,2*}, Moussa Fall^{1,5†}, Assane G Fall¹, Aliou Diop², Momar Talla Seck¹, Claire Garros^{3,4}, Thomas Balenghien^{3,4}, Xavier Allène^{3,4}, Ignace Rakotoarivony^{3,4}, Renaud Lancelot^{3,4}, Iba Mall¹, Mame Thierno Bakhom¹, Ange Michel Dosum¹, Massouka Ndao¹, Jérémy Bouyer^{1,3,4} and Hélène Guis^{3,4}

Abstract

Background: The African horse sickness epizootic in Senegal in 2007 caused considerable mortality in the equine population and hence major economic losses. The vectors involved in the transmission of this arbovirus have never been studied specifically in Senegal. This first study of the spatial and temporal dynamics of the *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) species, potential vectors of African horse sickness in Senegal, was conducted at five sites (Mbao, Parc Hann, Niague, Pout and Thies) in the Niayes area, which was affected by the outbreak.

Methods: Two Onderstepoort light traps were used at each site for three nights of consecutive collection per month over one year to measure the apparent abundance of the *Culicoides* midges.

Results: In total, 224,665 specimens belonging to at least 24 different species (distributed among 11 groups of species) of the *Culicoides* genus were captured in 354 individual collections. *Culicoides oxystoma*, *Culicoides kingi*, *Culicoides imicola*, *Culicoides enderleini* and *Culicoides nivosus* were the most abundant and most frequent species at the collection sites. Peaks of abundance coincide with the rainy season in September and October.

Conclusions: In addition to *C. imicola*, considered a major vector for the African horse sickness virus, *C. oxystoma* may also be involved in the transmission of this virus in Senegal given its abundance in the vicinity of horses and its suspected competence for other arboviruses including bluetongue virus. This study depicted a site-dependent spatial variability in the dynamics of the populations of the five major species in relation to the eco-climatic conditions at each site.

Keywords: Vector-borne disease, Insect vectors, Spatial and temporal dynamics, Light traps, *Culicoides oxystoma*, *Culicoides imicola*, Africa, Arbovirus, Orbivirus, Equids

Background

Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) are small midges (1 to 3 mm) presenting a huge diversity with more than 1,300 species described worldwide [1,2] of which some 96% are hematophagous. The females of some species of *Culicoides* are the vectors of pathogens of humans and

animals. However, the geographical distribution and pathogenicity of the disease agents transmitted to humans are limited, so the epidemiological relevance of *Culicoides* is primarily for animal health [3,4]. In addition to the African horse sickness virus (AHSV), *Culicoides* may also transmit bluetongue virus (BTV), epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV), equine encephalitis virus (EEV), Akabane virus, bovine ephemeral fever virus and viruses in the Palyam group [5]. However, the two diseases with the greatest veterinary impact among these are undoubtedly bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS). BT

* Correspondence: myriem85@yahoo.fr

†Equal contributors

¹Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires, Dakar, Sénégal

²Université Gaston Berger, Laboratoire d'Études et de Recherches en Statistiques et Développement, Saint-Louis, Sénégal

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Diarra et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

and AHS are caused by orbiviruses mainly affecting ruminants and equids respectively. The significance of these two arboviruses derives from their very broad geographical distribution, their potential for spreading rapidly and their major economic impact, all of which justify them being listed as notifiable diseases by the World Animal Health Organisation [6]. Since 1998, Europe has suffered a series of epizootic outbreaks of BTV with disastrous consequences on animal health [7-9].

BTV has been known in South Africa since at least the beginning of the 20th century [10]. Towards 1925, BTV was introduced into Senegal through infected sheep that were imported from South Africa. The disease continued its progression in the sheep sent to Richard-Toll (in Senegal) as the area was infested with the vectors [10]. Research on the epidemiological status of this disease in Senegal is limited to two studies conducted in the 1980s stating that seroprevalence varies between 30 and 59% among sheep and goats [11,12].

The mortality rate due to AHS can reach 90% in susceptible horses [13]. This disease has been recognised for several centuries and probably originates from Africa [14]. It is thought to have been described for the first time in Senegal at the end of the 19th century [15]. The latest epizootic of AHS in Senegal occurred in 2007. It caused considerable economic losses, estimated to 0.9 billion FCEA (1.4 million euros) [16]. On a national scale, this epizootic led to an estimated mortality rate of 0.2% and morbidity rate of 0.3% in traditional horse breeding farms, and a 5.4% mortality rate in modern stud farms [16,17].

More than 30 species of *Culicoides* have been recorded in Senegal [18-20]. However, most entomological studies go back a long time, are limited in scope and did not specifically target the species in the vicinity of the animals whose health could potentially be impacted. Thus, it appeared necessary to update the list of the *Culicoides* species present in Senegal prior to assessing their epidemiological relevance. The present study aimed to describe the seasonal dynamics of the main species present in the vicinity of horses, which may be potentially involved in the transmission of AHSV in the Niayes region of Senegal.

Methods

Survey sites

The survey was conducted at five horse stables in the Niayes region in the vicinity of Dakar and Thies. The Niayes region of Senegal is a 25- to 30-km wide coastal band stretching over 180 km from Dakar to the southern tip of the Senegal River Delta. The climate is oceanic, typically warm and humid with strong, relatively constant winds. Vegetation is diversified and mainly composed of steppe and shrub savanna. Vegetation cover is generally less than 50%, except in the tree plantations (mangoes, citrus), abundant in this area. The sites surveyed and numbers of livestock recorded are shown in Table 1. Distance between sites ranged from 10 to 53 kilometres.

Two main seasons are found in Senegal: the rainy season (July to October) and the dry season, sub-divided into the cold dry season (November to February) and the hot dry season (March to June). In the Niayes region, the average monthly temperature in July/August fluctuates around 27.5°C in Dakar. From November to February, the maximum temperature is below 28°C while the minimum temperature is 18°C along almost the whole coast. Moderate Harmattan wind can increase temperatures up to 31°C in May and June. Rainfall in the Niayes rarely exceeds 350 mm/year. Occult condensation (such as the condensation of mist and fog on foliage), referred to as "heug" or mango rain, not measured by standard rain gauges, often occurs during the dry season (particularly from December to February). The closeness of the ocean drives the high relative hygrometry that prevails in this region, varying from 15% to 90% depending on the season and distance from the sea. This region is characterized by shallow groundwater creating temporary ponds and the presence of particular vegetation usually found in much more humid regions classified as belonging to the Guinean eco-climatic area.

This area presents an important potential for agricultural development in general and animal production (large and small ruminants, equids, pigs and poultry) in particular. Dairy production, for instance, is particularly developed in this area. As the area is densely populated, wildlife is very scarce; in particular there are no wild antelopes or wild equids.

Table 1 Geographic coordinates of study sites and the numbers of animals identified

Site	Latitude	Longitude	Animals within 1 km of the trap*
Mbao	14.7467	-17.3327	32 horses, 2 poultry, 3 goats
Parc Hann**	14.7283	-17.4298	50 horses, 30 ponies, 11 lions, 1 tiger, 3 hyena, 5 jackal, 6 antelopes, 21 crocodiles, 9 turtles, 7 pitons
Niague	14.8234	-17.2499	4 cattle, 3 sheep, 30 horses, 1 donkey, 109 poultry, 1 dog
Pout	14.7665	-17.0357	12 horses, 8 donkeys, 1,700 sheep, 1,580 cattle, 240 goats, 25 buffalos, 11,000 poultry and 150 ostriches
Thies	14.794	-16.95	2 sheep, 24 horses (including 19 temporarily there to be mated), 50 poultry, 13 rabbits, 1 dog

*All traps were placed in the immediate vicinity of the horses.

**Parc Hann includes a riding center and a zoo.

Trapping methods

Culicoides midge apparent abundance was monitored by collecting insects at five sites for three consecutive nights monthly over a year. At four sites, Mbao, Parc Hann, Pout and Thies, collections were done from July 2011 to June 2012. At the fifth site, Niague, collections were done from November 2011 to October 2012. At each of the five sites, two Onderstepoort light traps were placed at least 10 m apart. Traps were operated from before dusk to after dawn. Traps were positioned close to the horses (hung on a post or a tree in the vicinity of the animals) at a height of 1.5 to 2 m from the ground.

The NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) data for daily rainfall were extracted for each of the 5 sites, (http://iridl.ldeo.columbia.edu/expert/SOURCES/NOAA/NCEP/CPC/FEWS/Africa/DAILY/ARC2/daily/est_precp/). Total monthly rainfall was calculated for each site. The MODIS (Moderate-resolution Imaging Spectroradiometer) 8-day temperature data, LSTday (Land Surface Temperature day) and LSTnight (Land Surface Temperature night), were retrieved for each site for the whole period of capture. At each site, we calculated the LST_mean between LSTday and LSTnight for the 8 days covering the days of capture.

Identification of *Culicoides*

All the samples were first sorted to discard other insects than *Culicoides*. When the volume of the catch exceeded 6 ml, sub-samples of 3 ml of sedimented *Culicoides* were taken out of the overall sample in accordance with a modified Van Ark & Meiswinkel [21] procedure. All the specimens were morphologically identified under a dissecting microscope. As no key encompassing the whole West African *Culicoides* species diversity exists, several dichotomous keys or species descriptions [20,22-26] were used to identify the specimens collected. Gender was also recorded.

Statistical analyses

The maximum abundance of both traps for three nights of collecting per month and per site was used for performing analyses, statistical tests and for plotting the graphs. Maximum numbers collected were preferred to mean numbers collected because the number of specimens collected in a trap can drop very quickly when local weather conditions are sub-optimal. Hence, the maximum of several consecutive light trap collections was considered as the best measure for abundance over a short time period [27].

A $\log_{10}(n + 1)$ transformation was applied to abundance data of night catches. We then compared the transformed maxima between sites by performing a Kruskal-Wallis test [28]. All the statistical analyses were conducted using the

R version 2.15.2 [29]. Site mapping was performed with the Quantum GIS software (2.0.1).

Results

In the results below, we focus on the proven and potential vectors of BTV and/or AHSV because those were the most abundant at the trapping sites.

In total, 224,665 specimens of the *Culicoides* genus (181,464 females and 43,201 males) belonging to at least 24 different species (Table 2) were caught during the 354 separate light trap collections at 4 sites (Mbao, Pout, Thies and Parc Hann) from July 2011 to June 2012 and at Niague from November 2011 to October 2012. The most abundant species were *C. oxystoma*, *C. kingi*, *C. imicola*, *C. enderleini* and *C. nivosus* which accounted for respectively 43.3% (97,351), 34.6% (77,826), 12.5% (28,123), 4.2% (9,379) and 1.4% (3,047) of the total number of specimens collected. These 5 species accounted for 90% of the total capture (Table 2).

Total monthly abundance of *Culicoides* was computed as the sum of all species collected during the night of maximum catch for all sites. The peak was recorded in September and October (Figure 1). The apparent abundance peaks differ between the 5 abundant species. Peak of abundance for *C. oxystoma* was observed in September and October, in July for *C. kingi*, February for *C. imicola*, October for *C. enderleini* and August for *C. nivosus*. *Culicoides* apparent abundance differs significantly ($p = 0.012$) between months.

Overall, *C. kingi* was the most abundant species in terms of annual mean of maximum monthly abundance (695.0), followed by *C. oxystoma* (637.3), *C. imicola* (180.9), *C. enderleini* (68.6), *C. nivosus* (25.5); the mean of maximum monthly catches for the other species was less than 20 (Table 3). The species for which the mean of maximum monthly catches was highest at all sites was *C. oxystoma* with the exception of Niague, where it was superseded by *C. kingi*.

Throughout the study, the most abundant species at the trapping sites were also the most frequently collected. Taking all catches together, *C. imicola* was the most frequent species (98.4%), followed by *C. oxystoma* (95.6%), *C. nivosus* (89.0%), *C. enderleini* (82.4%), and *C. kingi* (76.9%). However, these occurrences varied according to the site: the occurrence of *C. imicola* was 100% at Mbao, Niague and Thies while the occurrence of *C. oxystoma* was 100% at Niague, Parc Hann and Pout (Table 2).

The rainy season began in July and ended in October with maximum rainfall in August 2011 and August 2012. The spatial and temporal variations for the 5 predominant species (Figure 2) showed that abundance peaks for *Culicoides* varied according to site and species. The maximum abundance was highly significantly different

Table 2 Numbers of *Culicoides* trapped in the Niayes area of Senegal

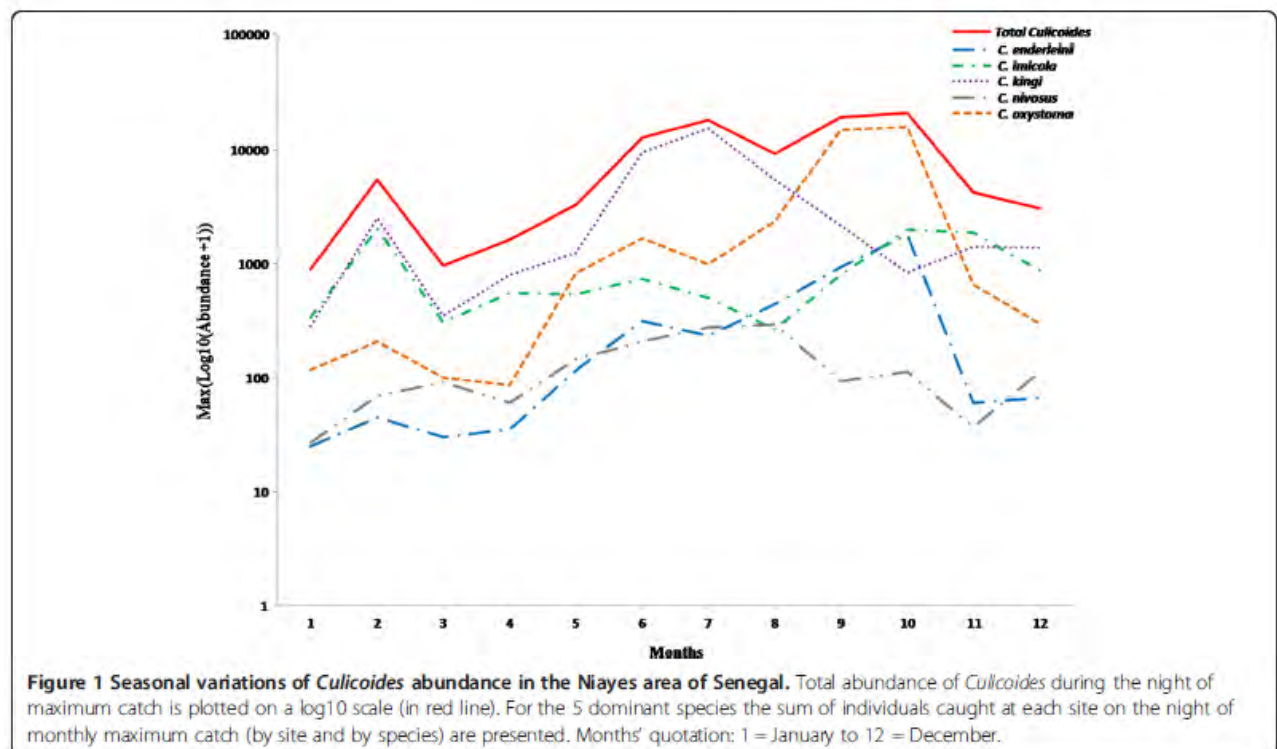
Sites	Mbao			Niague			Parc Hann			Pout			Thies			Total (% of total catch) (n = 354)
	(n = 70)			(n = 70)			(n = 70)			(n = 72)			(n = 72)			
<i>Culicoides</i> species	F	M	freq	F	M	freq	F	M	freq	F	M	freq	F	M	freq	
<i>C. oxystoma</i> *	60579	13603	94.3	1530	707	85.7	10589	3280	100	3087	887	100	2284	805	94.4	97351 (43.33)
<i>C. kingi</i> *	9062	3593	94.3	51803	12672	100	239	41	60.0	209	6	55.5	186	15	55.5	77826 (34.64)
<i>C. imicola</i> *	11328	2769	100	9446	643	100	459	93	94.3	1301	256	97.2	1642	186	100	28123 (12.52)
<i>C. enderleini</i> *	3617	204	88.6	2079	465	100	1812	24	77.1	802	104	77.7	252	20	55.5	9379 (4.17)
<i>C. nivosus</i> *	490	385	88.6	399	103	97.1	808	182	97.1	407	96	80.5	97	80	75.0	3047 (1.36)
<i>C. austeni</i>	2	-	5.7	1062	2	68.6	664	2	68.8	-	-	-	11	-	11.1	1743
<i>C. similis</i>	191	256	60.0	399	138	85.7	145	165	85.7	143	15	61.1	76	39	77.7	1567
<i>C. moreli</i>	222	148	82.85	440	39	68.6	5	6	11.4	43	18	27.7	14	8	27.7	943
<i>C. gambiae</i>	23	47	54.3	650	179	94.3	1	1	5.7	2	1	8.3	7	2	13.8	913
<i>C. bolitinos</i>	66	28	65.7	204	15	80.0	7	-	11.4	26	6	25.0	307	15	69.4	674
<i>C. distinctipennis</i>	126	71	65.7	142	69	80.0	101	61	82.8	12	1	19.4	2	-	-	585
<i>C. milnei</i>	6	-	8.6	20	-	22.8	463	5	45.7	-	-	-	-	-	5.5	494
<i>C. murphyi</i>	34	25	48.6	160	68	91.4	64	54	71.4	1	-	2.7	3	2	13.8	411
<i>Culicoides</i> sp.	68	24	48.6	166	42	34.3	7	1	8.6	10	3	19.4	40	37	61.1	398
<i>C. leucostictus</i>	124	86	85.7	12	27	42.8	16	13	40.0	56	21	44.4	23	16	50.0	394
<i>C. loxodontis</i>	4	7	8.6	25	2	22.8	6	2	14.3	12	3	11.1	140	21	38.8	222
<i>C. pseudopallidipennis</i>	6	28	22.8	14	7	28.6	-	-	-	1	6	13.8	52	28	52.7	142
<i>C. miombo</i>	38	3	17.1	18	2	11.4	-	-	-	4	1	8.3	21	-	16.6	87
<i>C. accraensis</i>	1	-	2.8	1	-	2.8	2	-	2.8	-	-	-	41	34	30.5	79
<i>C. pycnostictus</i>	15	11	31.4	9	2	22.8	5	1	8.6	13	1	25.0	8	5	19.4	70
<i>C. hortensis</i>	-	-	-	33	-	11.4	33	-	20.0	-	-	-	-	-	-	66
<i>C. pretoriensis</i>	1	16	5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	19	22.2	54
<i>C. azerbaijdzhanicus</i>	-	-	-	25	4	42.8	-	2	5.7	3	-	8.3	7	1	16.6	42
<i>C. translucens</i>	-	-	-	2	-	5.7	-	-	-	-	-	-	16	12	13.8	30
<i>C. dekeyseri</i>	-	-	-	17	8	28.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Total	86003	21304		68656	15194		15426	3933		6132	1425		5247	1345		224665

Numbers of *Culicoides* captured during the whole trapping period (all nights, n = number of trap-nights) are presented by species and location (F = female, M = male, freq = frequency, n = number of trap-nights). *5 dominant species.

($p < 10^{-3}$) between sites. The differences in maximum abundance between species were also very significant ($p < 10^{-3}$). Spatial variations in maximum abundance within each season (rainy season, hot dry season and cold dry season) for the 5 predominant species are shown in Figure 3. The differences in maximum abundance between seasons were statistically significant ($p < 10^{-3}$). At four of the five locations (Mbao, Parc Hann, Pout and Thies), the highest maximum abundance for *C. oxystoma*, *C. kingi* and *C. enderleini* were obtained during the rainy season when the LSTmean temperatures were the highest (25 to 30°C) (Figure 2). In contrast, during the cold dry season when LST_mean temperatures were the lowest (< 25°C), a decrease in *C. oxystoma*, *C. kingi* and *C. enderleini* abundance was observed at Mbao, Parc Hann, Pout and Thies (Figure 2). At Niague, a seasonal decline in the numbers

of these species collected was not observed. At this location, largest numbers were collected during the hot dry season (March to June) for *C. oxystoma* (namely, in June - see Figure 2 for more details) and *C. nivosus*; during the cold dry season (November to February) for *C. imicola* (namely, February - see Figure 2). At Pout, the abundance of *C. imicola* remained relatively stable, varying from 10 to 100 specimens per night all year round. It exhibited two small peaks of abundance: a peak during the rainy season and another in January. *C. nivosus* was highly abundant during the hot dry season (i.e., June - see Figure 3) at Mbao and Niague.

The Mondrian matrix (term and figure proposed by Meiswinkel et al. [30]) shows the results of all the 3 nights of collecting for the 12 months in (Figure 4). It also shows a spatial and temporal heterogeneity of the 5 dominant



species in the Niayes region. In this region, the activity of *C. oxystoma*, *C. imicola* and *C. nivosus* often persists all year round, with a few exceptions. *C. oxystoma* was absent for three consecutive nights of collecting in January at Niague, and likewise *C. nivosus* was absent for three consecutive nights of collecting in December at Thies. *C. kingi* and *C. enderleini* have longer periods of "apparent inactivity". *Culicoides kingi* was absent in 8 of 9 consecutive nights of collecting from February to April at Pout and Thies, in 11 of 15 consecutive nights of collecting from February to June at Mbao. *Culicoides enderleini* was absent in 11 of 12 consecutive nights of collecting from January to April at Thies and 3 consecutive nights of collecting in June at Mbao (Figure 4).

Discussion

Though the present study was conducted in a relatively small area of Senegal, we were able to confirm the presence of a number of *Culicoides* species recorded in previous surveys. Species not recorded in previous surveys in Senegal include: *Culicoides austeni*, *Culicoides azerbaijdzhanicus*, *Culicoides bolitinos*, *Culicoides hortensis*, *Culicoides leucostictus*, *Culicoides loxodontis*, *Culicoides milnei*, *Culicoides miombo*, *Culicoides murphyi*, *Culicoides pretoriensis* and *Culicoides translucens*. Of 14 species of *Culicoides* collected in The Gambia by Rawlings et al. [31] with Pirbright incandescent light traps, 9 were also found in the Niayes region: *Culicoides distinctipennis*, *C. enderleini*, *C. imicola*, *C. leucostictus*,

C. milnei, *C. miombo*, *C. nivosus*, *Culicoides pycnostictus* and *Culicoides similis*. The major species shared by The Gambia and Senegal was *C. enderleini* and *C. imicola*. For these two species, the lowest abundances were observed in December and in March/April both in The Gambia [31] and the Niayes region of Senegal (our work). The largest numbers of *C. kingi*, one of the 5 most abundant species in the Niayes, were collected in July. This species was also described in Sudan with abundance peaking in February and July [32].

In the past, several cases of AHS were reported in the Niayes region. In particular, the index case of the 2007 epizootic [17] was observed here. Indeed, horse numbers have increased significantly over the last years, with the settlement of private horse farms, in addition to already established horse-breeding farms. Furthermore, many seasonal horse cart drivers leave this area to join inner Senegal before the beginning of the rainy season, for agricultural works (ploughing, transportation). These seasonal migrations might have contributed to the spread of the AHS epizootic in 2007 [17]. Moreover, Parc Hann site includes a zoo and a riding centre situated within Dakar. Numbers of *Culicoides* collected at this site suggest that transmission could occur even in urbanized areas.

This study shows that 4 of the 5 dominant species recorded in the Niayes region are proven or suspected biological vectors of arboviruses: *C. oxystoma*, *C. kingi*, *C. enderleini* and *C. imicola*.

Table 3 Annual mean of maximum monthly catch in the Niayes area of Senegal

Sites	Mbao	Niague	Parc Hann	Pout	Thies	Annual mean of maximum catch
<i>Culicoides</i> species	(M ± SD)(n = 70)	(M ± SD)(n = 70)	(M ± SD)(n = 70)	(M ± SD)(n = 72)	(M ± SD)(n = 72)	
<i>C. kingi</i> *	371.8 ± 402.5	3070.3 ± 4382.0	12.0 ± 16.9	13.3 ± 29.7	7.6 ± 13.5	695.0
<i>C. oxystoma</i> *	2221.5 ± 4384.1	106.3 ± 148.3	602.8 ± 1528.5	134.1 ± 187.3	121.9 ± 185.6	637.3
<i>C. imicola</i> *	332.6 ± 433.5	431.4 ± 436.9	26.8 ± 50.7	49.2 ± 35.3	64.8 ± 81.1	181.0
<i>C. enderleini</i> *	109.8 ± 159.5	106.6 ± 146.8	86.3 ± 241.5	27.1 ± 40.2	13.2 ± 31.4	68.6
<i>C. nivosus</i> *	28.0 ± 34.0	22.1 ± 21.2	45.9 ± 41.9	24.8 ± 25.2	6.8 ± 9.5	25.5
<i>C. austeni</i>	0.2 ± 0.4	46.9 ± 72.7	25.9 ± 40.8	-	0.7 ± 1.4	18.4
<i>C. similis</i>	17.2 ± 21.1	20.7 ± 20.9	12.3 ± 14.1	7.7 ± 10.2	4.3 ± 2.7	12.4
<i>C. gambiae</i>	3.0 ± 3.7	39.2 ± 53.0	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.4	0.5 ± 1.1	8.6
<i>C. milnei</i>	0.3 ± 0.6	1.4 ± 2.5	18.2 ± 37.5	-	-	6.6
<i>C. moreli</i>	10.7 ± 11.7	17.3 ± 30.0	0.3 ± 0.8	2.3 ± 4.3	0.9 ± 1.4	6.3
<i>C. distinctipennis</i>	7.5 ± 6.5	9.1 ± 6.5	6.5 ± 6.4	0.8 ± 1.0	0.2 ± 0.4	4.8
<i>C. murphyi</i>	2.7 ± 2.7	9.4 ± 7.6	5.3 ± 4.1	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.5	3.6
<i>C. bolitinos</i>	1.9 ± 1.8	5.5 ± 7.8	0.2 ± 0.6	1.2 ± 3.1	7.4 ± 13.8	3.2
<i>C. leucostictus</i>	6.3 ± 6.7	1.9 ± 1.8	1.3 ± 1.3	4.5 ± 7.2	1.8 ± 1.7	3.2
<i>C. hortensis</i>	-	2.7 ± 6.5	2.3 ± 4.9	-	-	2.5
<i>C. pseudopallidipennis</i>	2.5 ± 4.0	1.6 ± 2.1	-	0.5 ± 0.6	4.3 ± 4.6	2.2
<i>C. loxodontis</i>	0.9 ± 2.2	1.7 ± 2.1	0.4 ± 0.6	0.8 ± 1.8	7.1 ± 14.3	2.2
<i>C. dekeyseri</i>	-	1.7 ± 2.4	-	-	-	1.7
<i>C. pretoriensis</i>	0.8 ± 2.2	-	-	-	1.6 ± 3.6	1.2
<i>C. translucens</i>	-	0.2 ± 0.4	-	-	2.1 ± 4.7	1.1
<i>C. miombo</i>	1.7 ± 3.4	1.1 ± 2.8	-	0.3 ± 0.8	1.2 ± 2.5	1.1
<i>C. accraensis</i>	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.6	-	3.2 ± 5.5	0.9
<i>C. pycnostictus</i>	1.6 ± 3.6	0.7 ± 0.8	0.4 ± 0.8	0.7 ± 0.9	0.9 ± 1.3	0.9
<i>C. azerbaijani</i>	-	1.4 ± 1.2	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.6 ± 0.8	0.6
Mean of max catches	115.7	134.7	36.9	13.5	8.4	64.7

The annual mean of monthly maximum abundance (M) ± standard deviation (SD) for each species during the whole trapping period are presented by location (n = number of trap-nights). The annual mean of maximum monthly abundance was the mean of the 12 maximum collections made at each site. *5 dominant species.

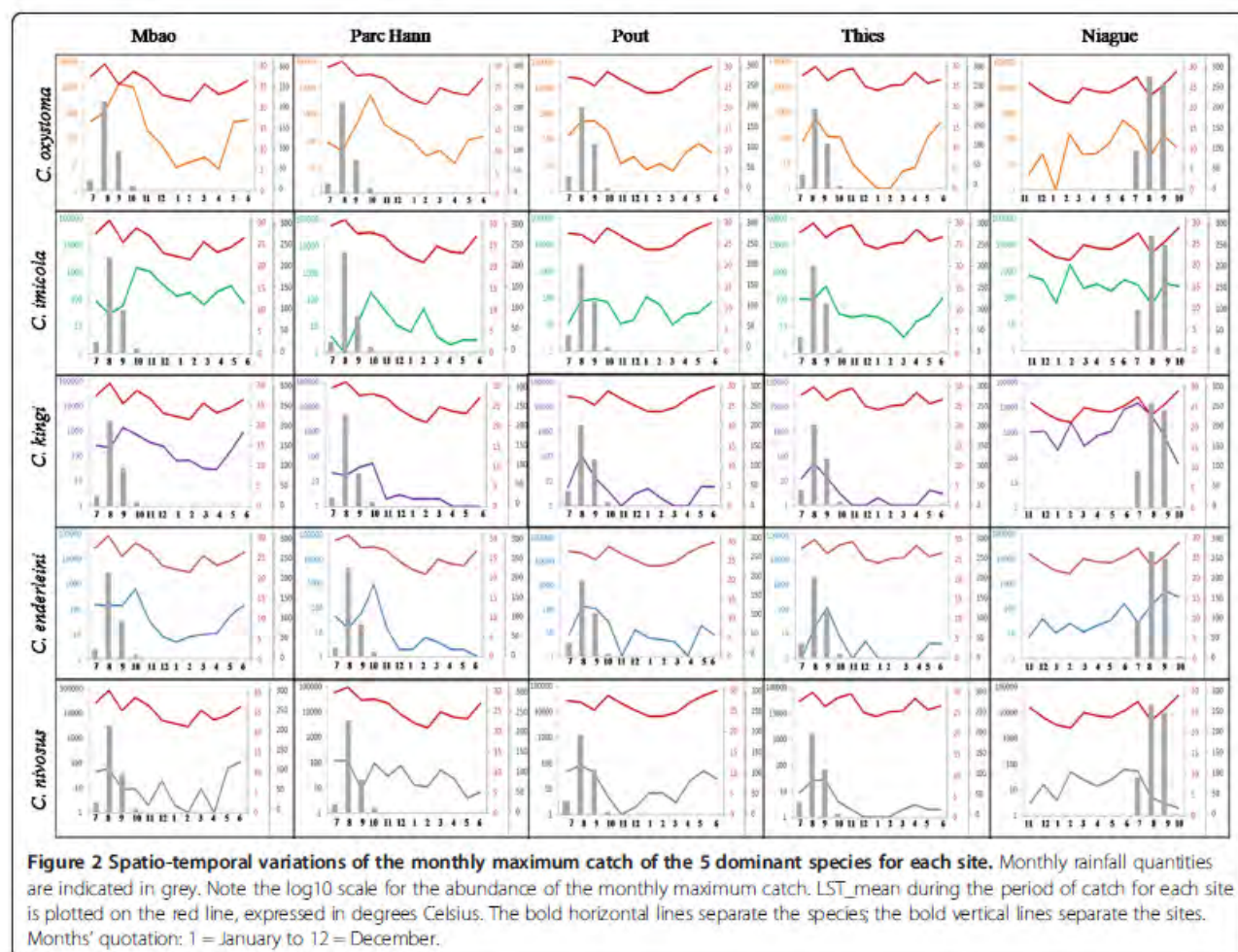
The first three of these species belong to the Schultzei group [18]. *Culicoides oxystoma* is suspected of being a BTV vector in Asia and Australasia [33], and was found infected by bovine arboviruses in Japan (Akabane, Aino, Chuzan, and D'Aguilar) [34]. Non-engorged *C. kingi* and *C. enderleini* were found infected respectively by EHDV in Sudan [35], and BTV in South Africa [36]. Although viral isolation from field-caught specimens does not prove vector competence, it shows that the species will feed on infected hosts in field conditions. Indeed, in addition to feeding on infected hosts, two other conditions are required to define a species as a vector: allowing replication and transmission of the pathogen.

At least four species of the Imicola group were found at our five sites: *C. miombo*, *C. bolitinos*, *C. loxodontis*, and *Culicoides pseudopallidipennis*. *Culicoides imicola* is a proven vector of BTV [13,37,38] and AHSV [13,14,39], and suspected vector of EEV [40,41] and EHDV [42].

Culicoides bolitinos is a suspected vector of BTV [13,37,38], AHSV [14,39,43], EEV [40] and EHDV [42]. Lee [44] has shown that *C. miombo* is a suspected BTV vector. Furthermore, a very broad distribution of *C. miombo* has been reported in tropical and subtropical Africa, in particular in Zimbabwe, Botswana, Nigeria, Ivory Coast, The Gambia and South Africa [25].

The fifth most abundant species was *C. nivosus*. The abundance of this species was low in The Gambia [31] and in South Africa [45]. In the case of BTV, several studies have tested this species for its competence [46,47]; but until this date, *C. nivosus* has not been purported as a vector for BTV or AHSV. As far as we know, *C. pseudopallidipennis* was not incriminated of being either a BTV or AHSV vector.

Based on the major species collected, it appears essential to assess the vector competence for AHSV, the biting rate and host preferences of the species in the Schultzei



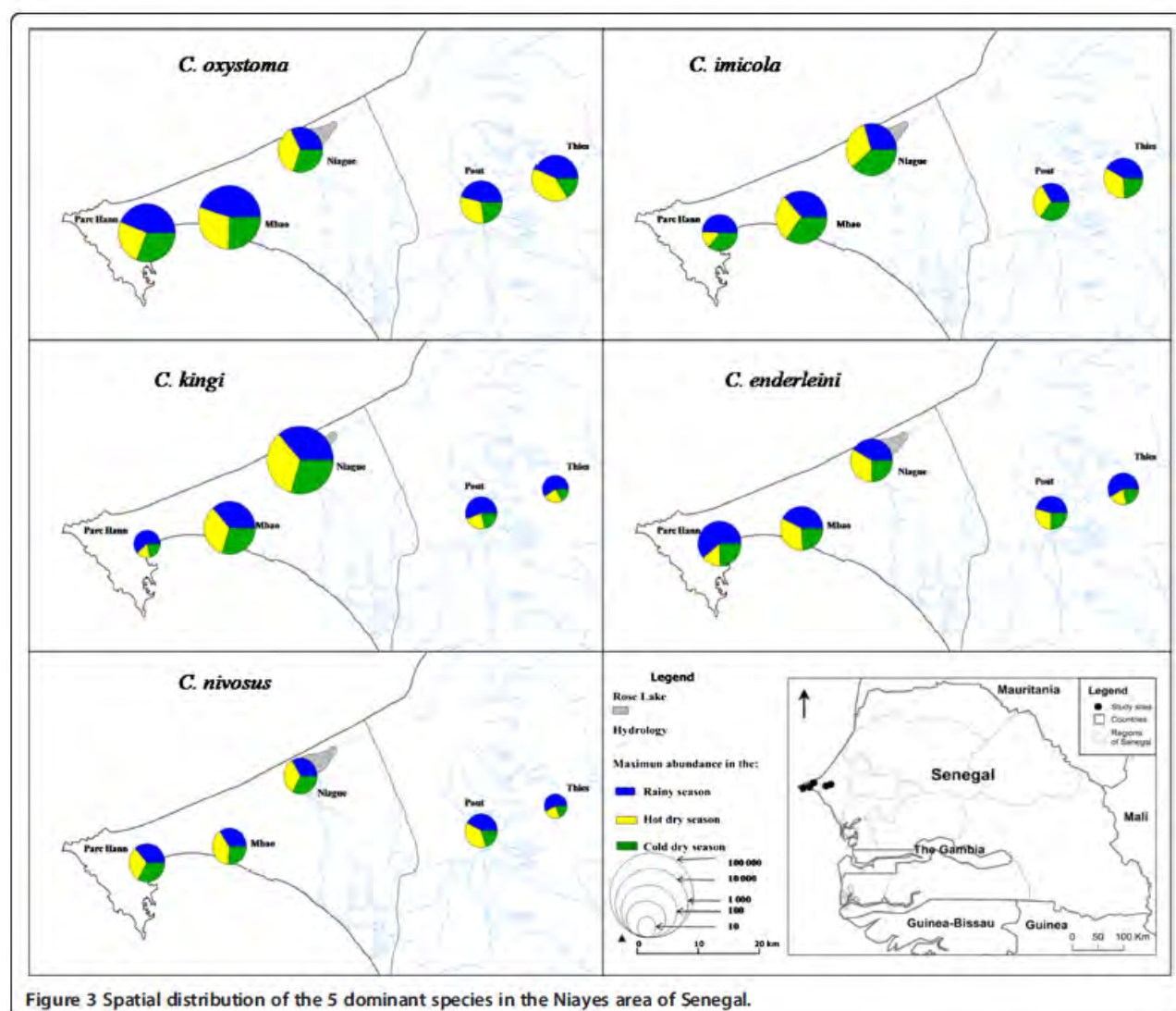
group. Indeed, in the Niayes region, depending on their competence and capacity, *C. oxystoma*, and/or *C. kingi* and/or *C. enderleini* may be significant vectors, perhaps more so than those in the *Imicola* group. In any case, evaluating the competence and capacity of all the potential vector species is crucial to better assess the risk of transmission through space and time.

The results of the present study revealed one or two peaks of abundance for the species that are potentially involved in the transmission of AHSV (*C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. kingi* and *C. enderleini*). These peaks occurred from April to June, and from July to October, coinciding respectively with the emergence and spread of AHS in 2007 [17].

Previous observations showed that *C. imicola* was the dominant species in many sub-Saharan African countries: South Africa [48-50], Nigeria [51], Botswana [52], The Gambia [31] and Zimbabwe [53]. In Senegal, for the first time, this study shows the importance of *C. oxystoma*, which was the dominant species in terms of abundance at 4 of the 5 sites, and the second most abundant (behind *C. kingi*) at the fifth (Niague). *Culicoides imicola*

was the second most abundant species at 4 sites and the 5th most abundant at Parc Hann. In terms of frequency of collection, *C. imicola* has a slight advantage over *C. oxystoma*.

The differences in abundance and frequency observed between sites for the 5 most abundant livestock associated species may be related to the ecological conditions that prevailed there, in particular the available larval habitats, i.e. humid locations with plenty of decaying organic matter such as animal droppings [54]. The high abundance of *C. oxystoma* at Mbao and Parc Hann may be connected with the presence of a permanent stream close to the Mbao riding center and a lake surrounded by marshy areas around Parc Hann [55]. The capacity of *C. kingi* larvae to develop in very salty muds exposed to sunlight [20] could contribute to explain why it is the most abundant species in Niague, a site close to a salt-saturated lake (Rose Lake, see Figure 2). The highest abundance for *C. nivosus* was observed at Mbao, perhaps in connection with the closeness of this site to the Mbao protected forest, as this species has been reported in other forested areas in Senegal (such as the Forest of



Bandia) [19]. For many species of *Culicoides*, larval habitats remain poorly described and larval identification techniques limited. Furthermore, although larval habitats are important determinants of the presence and abundance of *Culicoides*, other factors such as host characteristics (species, numbers, distance) [56,57] or trapping methods [58-60] can also greatly influence the diversity and abundance of collections made.

September and October, i.e., the end of the rainy season, were the months of highest overall abundance of *Culicoides*. The highest abundances of *C. oxystoma* were recorded during the rainy season, namely August to October. The abundances of *C. kingi* declined considerably midway through the rainy season. This is possibly due to the fact that during the tropical winter season the salt content of the large body of briny water located close to the Niague riding center might decline. Likewise,

a drop in abundance during the rainy season was also observed for *C. nivosus*.

Culicoides catches were made in the Niayes region of Senegal, i.e. a tropical environment, it is not surprising that activity of some dominant species is observed all year round, in contrast with what is found in temperate environments such as the Netherlands for instance [30]. The fact that vector species such as *C. imicola*, or potential vector species such as *C. oxystoma*, are active year round contributes to increasing the risk of transmission of BTV and AHSV in these areas since the length of the transmission season is increased and no overwintering mechanisms are necessary to ensure viral transmission the following year.

Overall, it is not easy to distinguish a stable pattern over time for each species as illustrated by the spatial and temporal variability displayed on the Mondrian matrix. There

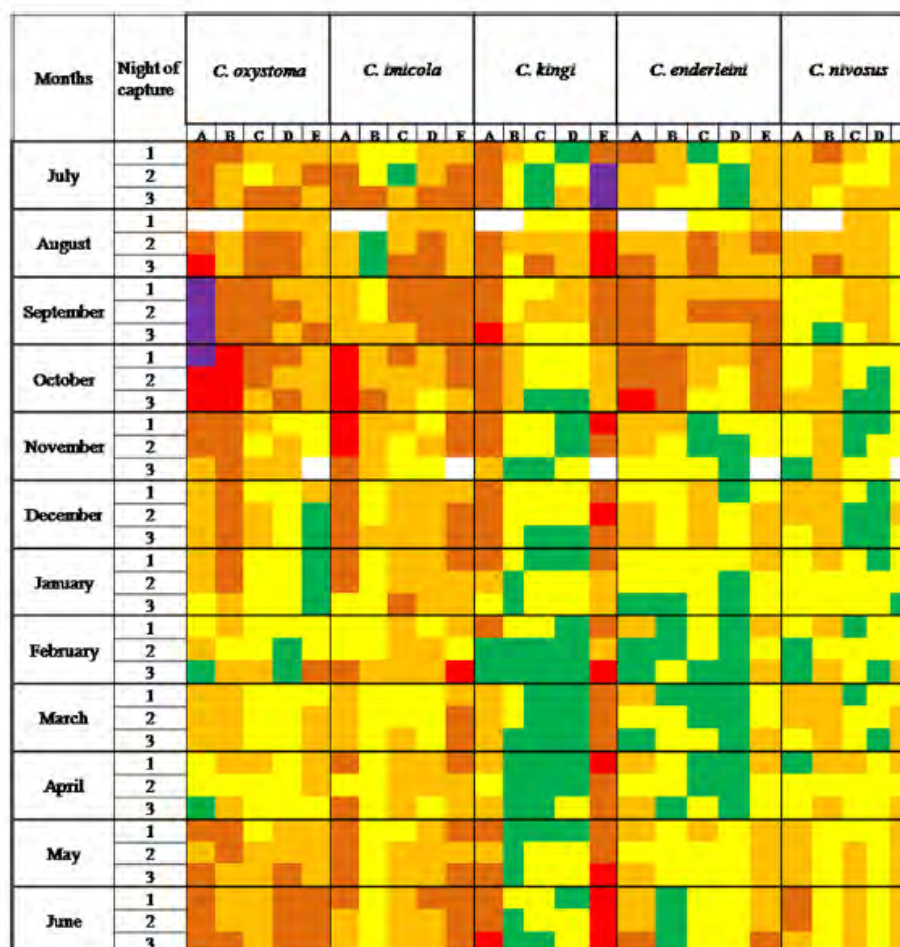


Figure 4 Mondrian matrix of monthly *Culicoides* (3 nights per month) abundances. Mondrian matrix of monthly *Culicoides* (3 nights per month) abundances (colour coded) for the 5 dominant species during 1 year (July 2011–June 2012 for Mbaio (A), Parc Hann (B), Pout (C) and Thies (D); November 2011–October 2012 for Niague (E) in Senegal. Green = 0 *Culicoides*; light yellow = 1–9, bright yellow = 10–99, orange = 100–999, red = 1,000–9,999, purple = 10,000–99,999, white = no data. The bold vertical lines separate the species; the bold horizontal lines separate the months.

are important variations in dynamics between sites and between species: on a single site there are differences according to species, while for a single species, the pattern differs depending on the site, even for sites which are close to one another. As expected for a given site, we observed differences in patterns between species. In particular in Niague, the patterns observed for the 5 dominant species seemed to differ from those in the 4 other sites. Models need to be developed so as to better understand the influence of environmental and climatic parameters on the distribution and dynamics of *Culicoides* in Senegal.

Conclusion

This descriptive study of the spatio-temporal dynamics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) was able to inventory the various species present in the Niayes region in Senegal and their abundance pattern over the course of

the year. Very high abundances of the species are observed mainly in September and October in this region, particularly for *C. oxystoma*, *C. kingi*, *C. imicola*, *C. enderleini* and *C. nivosus*, which are the most abundant and frequent species at the trapping sites and exhibit differing spatial patterns. The investigation showed up the presence of several species including *C. oxystoma*, which may be potential vectors for BTV and AHSV, possibly calling into question the role of *C. imicola*, which is thought to play as the main vector in Africa. It is essential to assess their respective competence for these two viruses so as to better evaluate the risk of African horse sickness and bluetongue disease in Senegal.

Abbreviations

AHSV: African horse sickness virus; BTV: Bluetongue virus; EEV: Equine encephalitis virus; EHDV: Epizootic haemorrhagic disease virus; LSTday: Land surface temperature day; LSTnight: Land surface temperature night; LST_mean: Land surface temperature mean.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

HG, AGF, MTS and JB designed and supervised the study. MF, AGF, IM performed sampling and global management of the entomological material. RL extracted Modis data. MF and IM performed the species identification with the help of CG, TB, XA, and IR. MTB, AMD, MD and MN participated in field and laboratory activities. MD, AGF, MTS and HG analysed the data and wrote the first draft of the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors are particularly grateful to Jean-Claude Delécolle for his morphological training and to all people who gave assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds) in Senegal. We also thank Dr Benz and Dr D. Morley, TALA research group, Oxford University, in the frame of the European EDENext project, for providing MODIS data. This study was funded partly by the EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. This paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext194 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Author details

¹Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires, Dakar, Sénégal. ²Université Gaston Berger, Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Statistiques et Développement, Saint-Louis, Sénégal. ³Cirad, UMR15 CMAEE, F-34398 Montpellier, France. ⁴INRA, UMR1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France. ⁵Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

Received: 26 December 2013 Accepted: 11 March 2014

Published: 31 March 2014

References

- Borkent A. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). 2014 [<http://www.inhills.illinois.edu/files/9913/9144/3328/CeratopogonidaeCatalog.pdf>]
- Borkent A. The subgeneric classification of species of *Culicoides* - thoughts and a warning. 2014 [<http://www.inhills.illinois.edu/files/9613/9136/7590/CulicoidesSubgenera.pdf>]
- Carpenter S, Groschup MH, Garros C, Felipe-Bauer ML, Purse BV. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res* 2013, **100**(1):102-113.
- Linley JR, Hoch AL, Pinheiro FP. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. *J Med Entomol* 1983, **20**(4):347-364.
- Mellor P, Baylis M, Mertens P. *Bluetongue*. Oxford, UK: Elsevier; 2009.
- OIE List of diseases in force in 2006. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2006/>.
- Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol* 2009, **17**(4):172-178.
- Mellor PS, Wittmann EJ. Bluetongue Virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet J* 2002, **164**(1):20-37.
- Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**(2):171-181.
- Curasson G. Introduction de la blue tongue en Afrique occidentale française. *Bull Soc Pathol Exot* 1925, **18**:215-218.
- Lefèvre PC, Calvez D. La fièvre catarrhale du mouton (bluetongue) en Afrique intertropicale: influence des facteurs écologiques sur la prévalence de l'infection. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1986, **39**(3-4):263-268.
- Lefèvre PC, Taylor WP. Situation épidémiologique de la fièvre catarrhale ovine (Blue tongue) au Sénégal. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1983, **36**(3):241-245.
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 2000, **45**:307-340.
- Mellor PS, Hamblin C. African horse sickness. *Vet Res* 2004, **35**(4):445-466.
- Bazusanga T. Contribution à l'étude de l'épidémiologie 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; 1995.
- Akampo AJ, Wombou Toukam CM, Mankor A, Ly C. Impact économique de l'épizootie de peste équine de 2007 au Sénégal. *Bull Anim Hlth Prod Afr* 2011, **59**:1-16.
- Diouf ND, Etter E, Lo MM, Lo M, Akampo AJ. Outbreaks of African horse sickness in Senegal, and methods of control of the 2007 epidemic. *Vet Rec* 2013, **172**(6):152.
- 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. 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* 2013, **8**(12):e84316.
- Comet M. Les *Culicoides* (Diptera Ceratopogonidae) de l'Ouest africain (1ère note). *Cah ORSTOM, sér Ent méd Parasitol* 1969, **VI**(4):341-364.
- Comet MJB. Révision des espèces de *Culicoides* apparentées à *C. schultzei* (Enderlein, 1908) dans la région afrotropicale (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomol France* 1994, **92**(2):149-164.
- Van Ark H, Meiswinkel R. Subsampling of large light trap catches of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res* 1992, **59**(3):183-189.
- Glick JL. *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol* 1990, **27**(2):85-195.
- Khamala CPM, Kettle DS. The *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) of East Africa. *Trans R ent Soc Lond* 1971, **123**(1):1-95.
- Meiswinkel P. 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* 1989, **56**(1):23-39.
- Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) miombo* sp. nov., a widespread species closely allied to *C. (A.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res* 1991, **58**(3):155-170.
- Wirth WW, Hubert AA. The *Culicoides* of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Am Entomol Inst* 1989, **44**:1-509.
- Baylis M, el Hasnaoui H, Bouayoune H, Touti J, Mellor PS. The spatial and seasonal distribution of African horse sickness and its potential *Culicoides* vectors in Morocco. *Med Vet Entomol* 1997, **11**(3):203-212.
- Hollander M, Wolfe DA. *Non parametric statistical methods*. New York: Wiley; 1973.
- R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. [<http://cran.r-project.org/manuals.html>]
- Meiswinkel R, Scolamacchia F, Dik M, Mudde J, Dijkstra E, VDV U, Elbers AR. The Mondrian matrix: *Culicoides* biting midge abundance and seasonal incidence during the 2006-2008 epidemic of bluetongue in the Netherlands. *Med Vet Entomol* 2013, **28**(1):10-20.
- Rawlings P, Snow WF, Boorman J, Denison E, Hamblin C, Mellor PS. *Culicoides* in relation to transmission of African horse sickness virus in The Gambia. *Med Vet Entomol* 1998, **12**(2):155-159.
- El Sinnary KA, Muller R, Atta el Mannan A, Hussein SH. The diurnal activity of *Culicoides kingi* in northern Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1985, **38**(3):270-275.
- Mellor PS, Carpenter S, White DM. Bluetongue virus in the insect host. In *Bluetongue*. Edited by Mellor P, Baylis M, Mertens P. Oxford, UK: Elsevier; 2009:295-320.
- Yanase T, Kato T, Kubo T, Yoshida K, Ohashi S, Yamakawa M, Miura Y, Tsuda T. Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985-2002. *J Med Entomol* 2005, **42**(1):63-67.
- Mellor PS, Osborne R, Jennings DM. Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan. *J Hyg (Lond)* 1984, **93**(3):621-628.
- Venter GJ, Mellor PS, Paweska JT. Oral susceptibility of South African stock-associated *Culicoides* species to bluetongue virus. *Med Vet Entomol* 2006, **20**(3):329-334.
- Meiswinkel R, Gornulski LM, Delecolle JC, Goffredo M, Gasperi G. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. *Vet Ital* 2004, **40**(3):151-159.
- Venter GJ, Paweska JT, Van Dijk AA, Mellor PS, Tabachnick WJ. Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African

- bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Med Vet Entomol* 1998, **12**(4):378–385.
39. Venter GJ, Graham SD, Hamblin C: African horse sickness epidemiology: vector competence of south african *Culicoides* species for virus serotypes 3, 5 and 8. *Med Vet Entomol* 2000, **14**(3):245–250.
 40. Venter GJ, Groenewald D, Venter E, Hermanides KG, Howell PG: A comparison of the vector competence of the biting midges, *Culicoides* (*Avaritia*) *bolitinos* and *C. (A.) imicola*, for the Bryanston serotype of equine encephalosis virus. *Med Vet Entomol* 2002, **16**(4):372–377.
 41. Venter GJ, Groenewald DM, Paweska JT, Venter EH, Howell PG: Vector competence of selected South African *Culicoides* species for the Bryanston serotype of equine encephalosis virus. *Med Vet Entomol* 1999, **13**(4):393–400.
 42. Paweska JT, Venter GJ, Hamblin C: 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* 2005, **19**(2):200–207.
 43. Meiswinkel R, Paweska JT: Evidence for a new field *Culicoides* vector of African horse sickness in South Africa. *Prev Vet Med* 2003, **60**(3):243–253.
 44. Lee VH: Isolation of viruses from field populations of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Nigeria. *J Med Entomol* 1979, **16**(1):76–79.
 45. Venter GJ, Koekemoer JJ, Paweska JT: Investigations on outbreaks of African horse sickness in the surveillance zone in South Africa. *Rev Sci Tech* 2006, **25**(3):1097–1109.
 46. Venter GJ, Mellor PS, Wright I, Paweska JT: Replication of live-attenuated vaccine strains of bluetongue virus in orally infected South African *Culicoides* species. *Med Vet Entomol* 2007, **21**(3):239–247.
 47. Venter GJ, Paweska JT: Virus recovery rates for wild-type and live-attenuated vaccine strains of African horse sickness virus serotype 7 in orally infected South African *Culicoides* species. *Med Vet Entomol* 2007, **21**(4):377–383.
 48. Venter GJ, Majatladi DM, Labuschagne K, Boikanyo SN, Morey L: The attraction range of the Onderstepoort 220 V light trap for *Culicoides* biting midges as determined under South African field conditions. *Vet Parasitol* 2012, **190**(1–2):222–229.
 49. Nevill EM: The use of cattle to protect sheep from bluetongue infection. *J S Afr Vet Assoc* 1978, **49**(2):129–130.
 50. Venter GJ, Meiswinkel R, Nevill EM, Edwards M: *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) associated with livestock in the Onderstepoort area, Gauteng, South Africa as determined by light-trap collections. *Onderstepoort J Vet Res* 1996, **63**(4):315–325.
 51. Hemirman KA, Boorman JP, Taylor WP: Bluetongue virus in a Nigerian dairy cattle herd. 1. Serological studies and correlation of virus activity to vector population. *J Hyg (Lond)* 1983, **90**(2):177–193.
 52. Mushi EZ, Isa JF, Chabo RG, Binta MG, Kapaata RW: *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) associated with horses at Mogoditshane, Gaborone, Botswana. *Vet Res Commun* 1998, **22**(5):295–297.
 53. Musuka GN, Meiswinkel R, Baylis M, Kelly PJ, Mellor PS: Prevalence of *Culicoides imicola* and other species (Diptera: Ceratopogonidae) at eight sites in Zimbabwe. *J S Afr Vet Assoc* 2001, **72**(2):62–63.
 54. Harrup LE, Purse BV, Golding N, Mellor PS, Carpenter S: Larval development and emergence sites of farm-associated *Culicoides* in the United Kingdom. *Med Vet Entomol* 2013, **27**(4):441–449.
 55. Poddar TK, Ray S, Choudhury A: Ecology of larval *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Hooghly estuary, Sagar Island India. *Ann Entomol* 1992, **10**(1):19–25.
 56. Garcia-Saenz A, McCarter P, Baylis M: The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. *Med Vet Entomol* 2010, **25**(1):113–115.
 57. Kluiters G, Sugden D, Guis H, McIntyre KM, Labuschagne K, Vilar MJ, Baylis M: Modelling the spatial distribution of *Culicoides* biting midges at the local scale. *J Appl Ecol* 2013, **50**(1):232–242.
 58. Carpenter S, Szmaragd C, Barber J, Labuschagne K, Gubbins S, Mellor P: An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *J Appl Ecol* 2008, **45**(4):1237–1245.
 59. Scheffer EG, Venter GJ, Labuschagne K, Page PC, Mullens BA, MacLachlan NJ, Osterrieder N, Guthrie AJ: Comparison of two trapping methods for *Culicoides* biting midges and determination of African horse sickness virus prevalence in midge populations at Onderstepoort, South Africa. *Vet Parasitol* 2012, **185**(2–4):265–273.
 60. Vienne E, Garros C, Lancelot R, Allene X, Gardes L, Rakotoarivony I, Crochet D, Delecalle JC, Moulia C, Baldet T, Balenghien T: Assessment of vector/host contact comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasit Vectors* 2011, **4**:119.

doi:10.1186/1756-3305-7-147

Cite this article as: Diarra et al: Seasonal dynamics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges, potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in the Niayes area of Senegal. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:147.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access

Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) midges, the vectors of African horse sickness virus – a host/vector contact study in the Niayes area of Senegal

Moussa Fall^{1,5*}, Maryam Diarra^{1†}, Assane G Fall¹, Thomas Balenghien², Momar T Seck¹, Jérémy Bouyer^{1,2,3}, Claire Garros^{2,3}, Geoffrey Gimonneau^{1,2,3}, Xavier Allène^{2,3}, Iba Mall¹, Jean-Claude Delécolle⁴, Ignace Rakotoarivony^{2,3}, Mame T Bakhoum¹, Ange M Dusom¹, Massouka Ndao¹, Lassana Konaté⁵, Ousmane Faye⁵ and Thierry Baldet^{1,2,3}

Abstract

Background: African horse sickness (AHS) is an equine disease endemic to Senegal. The African horse sickness virus (AHSV) is transmitted to the mammalian hosts by midges of the *Culicoides* Latreille genus. During the last epizootic outbreak of AHS in Senegal in 2007, 1,169 horses died from this disease entailing an estimated cost of 1.4 million euros. In spite of the serious animal health and economic implications of AHS, very little is known about determinants involved in transmission such as contact between horses and the *Culicoides* species suspected of being its vectors.

Methods: The monthly variation in host/vector contact was determined in the Niayes area, Senegal, an area which was severely affected by the 2007 outbreak of AHS. A horse-baited trap and two suction light traps (OVI type) were set up at each of five sites for three consecutive nights every month for one year.

Results: Of 254,338 *Culicoides* midges collected 209,543 (82.4%) were female and 44,795 (17.6%) male. Nineteen of the 41 species collected were new distribution records for Senegal. This increased the number of described *Culicoides* species found in Senegal to 53. Only 19 species, of the 41 species found in light trap, were collected in the horse-baited trap (23,669 specimens) largely dominated by *Culicoides oxystoma* (22,300 specimens, i.e. 94.2%) followed by *Culicoides imicola* (482 specimens, i.e. 2.0%) and *Culicoides kingi* (446 specimens, i.e. 1.9%).

Conclusions: *Culicoides oxystoma* should be considered as a potential vector of AHSV in the Niayes area of Senegal due to its abundance on horses and its role in the transmission of other *Culicoides*-borne viruses.

Keywords: Animal health, Suspected vectors, *Culicoides oxystoma*, *Culicoides imicola*, Population dynamics

* Correspondence: moussafall08@yahoo.fr

†Equal contributors

¹ISRA, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Route Front de Terre, Dakar, Senegal

⁵Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar BP 5005, Senegal

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Midges in the genus *Culicoides* Latreille are small biting dipterans (1 to 4 mm in length) that belong to the Ceratopogonidae family. *Culicoides* present a worldwide distribution. Some 1,250 species have been recorded [1], some of which are vectors of viral and parasitic (both protozoan and nematode) pathogens. Their impact is mainly on animal health: in particular, the transmission of virus of two epizootic diseases in horses and ruminants, respectively African horse sickness (AHS) and bluetongue (BT) [2].

AHS is an arboviral disease endemic to sub-Saharan Africa. In the north it is present up to the latitude that links Senegal to Ethiopia. South Africa presents the most southerly distribution. Nine antigenically serotypes are recognized [3]. African horse sickness virus (AHSV) has been responsible for epizootic outbreaks outside of its endemic area in regions previously free of the disease, namely in the Middle East and Asia between 1959 and 1960 [4], in the Maghreb and the Iberian peninsula between 1965–1966 [4], on the Iberian peninsula between 1987 and 1990 [4], in Yemen in 1997 [5], and in the Cape Verde Islands in 1999 [5].

AHS has devastating consequences on susceptible horses with death rates in excess of 90% [6]. Disease control depends on vaccination, isolation or slaughter of infected animals, restrictions on movements of equines and vector control. Only attenuated viral strains are used for vaccination purposes with the drawbacks inherent to the use of live vaccines in addition to the teratogenic effects that prohibit their use on gestating females. Vector control requires the identification of all *Culicoides* species involved in the transmission. However, control against *Culicoides* is very limited in the field due to a lack of knowledge of their bio-ecology and efficient operational methods [7].

The most recent epizootic outbreak of AHS in Senegal in 2007 caused the death of 1,169 horses, with an estimated cost of 1.4 million Euros [8]. Riding centres in the Dakar region were very badly affected with a mortality rate of 8.6% [8]. Virological investigations identified serotype 2 and 7 [8,9] as the responsible viral strains, whereas only serotype 9 had been encountered in Senegal previously [10,11].

Up to 1994, 34 *Culicoides* species were recorded in Senegal [1,12–14]. Amongst these are *Culicoides imicola* Kieffer is a proven vector of AHSV in southern Africa [15,16]. However, similar as to BT in Europe, virus detection in field collected specimens coupled to oral susceptibility results in the laboratory [16–18] infers that susceptibility to AHSV infection is not restricted to a few species but that it is widespread in the genus *Culicoides*.

To identify all potential *Culicoides* vectors in Senegal, we carried out light trap and horse-baited trap collections in an area which experienced outbreaks of AHSV

in 2007. Seasonal dynamics of *Culicoides* collected in light traps during these collections was described previously [19], updating the list of species known in Senegal from 34 to 45 [19,20]. In this work we focused on host-baited trap collections with the aim to (i) draw up an inventory of the *Culicoides* species relevant for animal health in the Niayes area of Senegal, (ii) identify *Culicoides* with a host preference for horses and are therefore potential vectors of AHSV and (iii) monitor the seasonal variations in this vector-host contact.

Methods

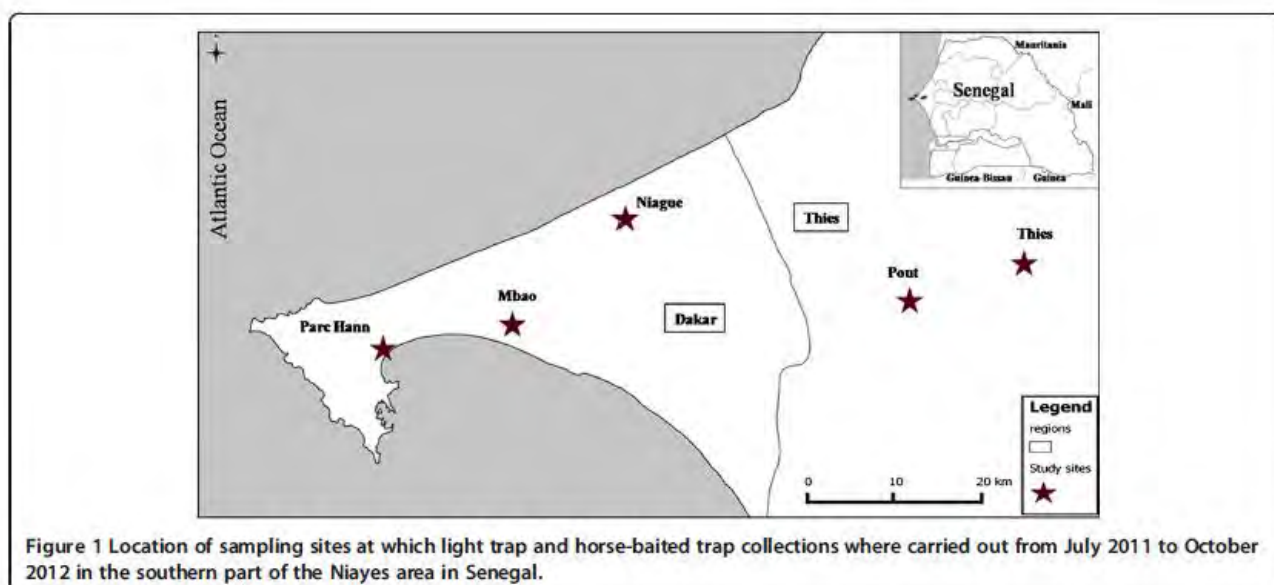
Study area

This study was conducted in the southern part of the Niayes area. The Niayes are depressions between dunes that are liable to flooding during the rainy season. They are located just inland of the coastline of Grande Côte, covering a strip 25 to 30 km wide that follows the coast for 180 km, stretching from Dakar to the mouth of the Senegal River. The climate is of the sub-Canarian tropical type with cool temperatures that vary within a narrow range [21]; the average highest monthly temperature is 27.5°C in Dakar and 28.1 °C in Saint-Louis [22]. The presence of the ocean is conducive to a high relative moisture rate ranging from 15% to 90% depending on distance from the sea and time of year. The vegetation in the area is diversified, with a plant cover of less than 50%. Typical vegetation consists of large expanses of household vegetable species (cabbage, potato, tomato, carrot, onion, green beans, salad) and fruit trees (citrus, mango). Dairy and poultry farms are also found. In addition, several riding centres that accommodate exotic breeds of horses are located in this area. Rainfall rarely exceeds 500 mm/year in the south, close to Dakar, and 350 mm/year in the north, close to the Senegal River delta. There are two main seasons in Senegal: the rainy season (from July to October) and the dry season (from November to June), which can be subdivided into a cold dry season (from November to February) and a warm dry season (from March to June). Occult precipitation called the 'heug' or mango rains often come during the dry season, and particularly during the cold dry season (December, January and February).

Collection sites

The survey was carried out at five riding centres, described in Diarra *et al.* [20], in the southern part of the Niayes area close to Dakar and Thies (Figure 1). The geographical coordinates and numbers of animals for each site are given by Diarra *et al.* [20].

The reasons for choosing the southern part of the Niayes area and the five sampling sites were its history of repeated AHS outbreaks and its considerable economic potential for stock-breeding in conjunction with



many modern farms with exotic breeds established there. Another consideration was the massive mortality among purebred horses during the last epizootic outbreak of AHS in 2007 [8].

Culicoides trap collections

To assess vector/host contact, *Culicoides* were collected using a horse-baited trap identical to the one used by Fall *et al.* for entomological investigations of mosquitoes' vectors of West Nile fever [23,24] (Figure 2A). In parallel, two light traps of the OVI (Onderstepoort Veterinary Institute) type were operated to compare host-baited collections with this more widely used *Culicoides* trapping method [25,26] (Figure 2B). The horse-baited trap consists of net boxes (3.5 m × 2.5 m × 2.5 m, with mesh of 1.5 mm × 0.3 mm) with an open space of 15 cm from the ground allowing *Culicoides* to enter, to engorge or not on horse, and avoiding the escape of trapped midges. Both sampling methods were used at each of the five

sites for three consecutive nights per month from July 2011 to June 2012 at Parc Hann, Mbao, Thies and Pout sites and from November 2011 to October 2012 at Niague.

The horse-baited trap and the light traps were activated simultaneously, operating from 6 p.m. to 8 a.m. based on the dusk/dawn and night-time activity of most *Culicoides* species. At every site, one of the light traps was placed within 5 m from the door of a loose box containing a horse, while the second was positioned outside the line of vision of the loose box more than 10 m away from the horses. Both light traps were placed at a height of 1.5 to 2 m and sheltered from the wind and any source of artificial light. The horse-baited trap was positioned more than 10 m away from the closest horse housed in a loose box. The three traps were fairly distant from one another (>10 m) so as to minimize possible interactions [27].

The *Culicoides* specimens collected in the light traps were recovered in the morning, strained to separate the



insects from the soapy water and transferred to an appropriate labelled jar. Samples were preserved in 90% alcohol and stored in the dark until identified.

As for the horse-baited traps, the animals were fed and watered according to the usual procedures applied at the stable. We used the same five horses, approximately in the same size and weight, during the entire survey: four were females (the male was in Parc Hann) and four were chestnut (the fifth was cream-colored and located at Niague). The *Culicoides* were collected into a collection bottle with a mesh bottom early in the morning using an electric vacuum cleaner for between 10 and 15 minutes. The sampling site and date of capture were indicated on each bottle. These live specimens were killed by freezing (-20°C), sorted and identified the same day before being stored in 90% alcohol in a labelled bottle.

Identification of the *Culicoides*

Morphological identification of *Culicoides* species was conducted by examination of the wing pigmentation pattern using a stereomicroscope. For species that are difficult to identify, the specimens were dissected and slide-mounted in accordance with the Wirth and Marston technique for observation under a microscope [28]. Several identification keys were used depending on the species found and their subgenus or group [13,14,29–34]. A count of all the *Culicoides* identified was made by species, gender and, for females, by physiological status. They were stored in 90% alcohol. Samples comprising more than 3 ml of insects were subsampled according to the modified procedure based on Van Ark and Meiswinkel [35].

Statistical analyses

Monthly abundance of each *Culicoides* species was determined by taking the largest of the catches made on three consecutive nights in every trap. Maximum was preferred to mean because the number of specimens collected can drop very quickly when local weather conditions are sub-optimal. Hence, the maximum of several consecutive collections was considered as the best representation of abundance over a short time period [36]. Capture frequency is the ratio of the number of nights a species was present over the total number of capture nights per site. The engorgement rate for a species is the ratio of engorged females to the total number of females of this species. Engorgement rates were compared between species by means of the Kruskal Wallis test [37]. Monthly abundances were compared between capture methods by performing Pearson's correlation test.

Diversity of *Culicoides* species by trap and by site was assessed using cumulative monthly abundances by Shannon index and the Simpson-Yule. Between-class (sites)

and within-class (trap types) measures were obtained by a centred principal component analysis of the natural logs of the cumulative abundance percentages by species, site and trap type [38,39].

The statistical analyses were all performed with the R programming language at the significance level of 5% [40].

Ethical approval

This protocol was approved by the Scientific and Technological Advice board of ISRA, Senegal on 22–27 November 2010. The protocol strictly adhered to the usual conditions of animal welfare. Animals used as baits were not no more exposed to *Culicoides* bites than other animals of the private stables in the area. They also received veterinary care during the experiment.

Results

Overall diversity

In total, 254,338 specimens of the *Culicoides* genus, of which 209,543 females (82.4%) and 44,795 males (17.6%) were collected using the two sampling methods over the 515 nights of trapping: 181 and 178 for each light trap and 156 for the horse-baited trap (Table 1). Diarra et al. [20] listed 24 different species in light trap collections, but 398 specimens remained unsorted and grouped into *Culicoides* sp. After completing the identification, we finally identified at least in light trap and horse-baited trap collections, 19 of which are new distribution records in Senegal (11 from Diarra et al. [20] and 8 from this paper). Hence the list of *Culicoides* in Senegal now comprises 53 species (Table 2). The most abundant species captured were *C. oxystoma* (41.4% of overall captures), *C. kingi* (39.0%), *C. imicola* (10.0%), *C. enderleini* (3.9%) and *C. nivosus* (1.4%). The co-dominance of *C. oxystoma* and *C. kingi* is illustrated by a Shannon index of 1.39 (maximum value 3.7) and a Simpson-Yule index of 0.34.

Culicoides collected on horses

During the overall collection nights, a total of 23,669 specimens were captured in horse-baited traps (9.3% of overall captures) as against a total of 230,670 specimens in the light traps (accounting for 90.7% of overall captures). Only 19 of the 41 species found in light traps were found in horse-baited trap (Table 2). No species was found only in horse-baited trap.

Culicoides oxystoma was the dominant species on horse (22,302 individuals; 94.2% of overall captures). The three most abundant species, *C. oxystoma*, *C. imicola* and *C. kingi*, represented 98.2% of collections (23,239 individuals) and the eight most abundant, which included *C. enderleini* and *C. bolitinos* (Table 3), 99.5% of collections.

Table 1 Cumulative maximum monthly abundance [number of *Culicoides* (percentage)] by trap (two light- and horse-baited traps) and by site collected over the year (from July 2011 to October 2012) in the Niayes area of Senegal

	Parc_hann		Mbao		Niague		Pout		Thies		TOTAL (cumulative %)	RANK
	OVI	Horse	OVI	Horse	OVI	Horse	OVI	Horse	OVI	Horse		
<i>C. oxystoma</i>	5,414 (66.65)	199 (75.95)	22,888 (69.94)	9,290 (97.37)	1,381 (3.11)	8 (2.33)	1,476 (49.27)	12 (35.29)	910 (38.91)	373 (65.10)	41,951 (41.39)	1
<i>C. kingi</i>	128 (1.58)	3 (1.15)	4,073 (12.45)	104 (1.09)	34,894 (78.56)	148 (43.02)	139 (4.64)		74 (3.16)	3 (0.52)	39,566 (80.43)	2
<i>C. imicola</i>	261 (3.21)	5 (1.91)	3,718 (11.36)	90 (0.94)	4,588 (10.33)	58 (16.86)	558 (18.62)	17 (50.00)	702 (30.01)	157 (27.40)	10,154 (90.45)	3
<i>C. enderleini</i>	1,021 (12.57)	4 (1.53)	1,165 (3.56)	40 (0.42)	1,279 (2.88)	3 (0.87)	325 (10.85)	1 (2.94)	152 (6.50)	2 (0.35)	3,992 (94.39)	4
<i>C. nivosus</i>	451 (5.55)	10 (3.82)	306 (0.94)		267 (0.6)	9 (2.62)	297 (9.91)	2 (5.88)	80 (3.42)	2 (0.35)	1,424 (95.79)	5
<i>C. austeni</i>	303 (3.73)	27 (10.31)	1 (<0.01)		559 (1.26)	87 (25.29)			6 (0.26)		983 (96.76)	6
<i>C. similis</i>	134 (1.65)	3 (1.15)	169 (0.52)	3 (0.03)	271 (0.61)		64 (2.14)		48 (2.05)	1 (0.17)	693 (97.44)	7
<i>C. gambiae</i>	1 (0.01)		34 (0.10)		450 (1.01)	7 (2.03)	3 (0.10)		6 (0.26)		501 (97.94)	8
<i>C. moreli</i>	4 (0.05)		101 (0.31)	8 (0.08)	215 (0.48)	16 (4.65)	28 (0.93)		9 (0.38)	2 (0.35)	383 (98.32)	9
<i>C. bolitinos</i>	3 (0.04)		22 (0.07)	4 (0.04)	82 (0.18)	4 (1.16)	9 (0.30)	1 (2.94)	115 (4.92)	21 (3.66)	261 (98.57)	10
<i>C. distinctipennis</i>	78 (0.96)		64 (0.20)		102 (0.23)	1 (0.29)	10 (0.33)		2 (0.09)		257 (98.83)	11
<i>C. milnei</i>	217 (2.67)	5 (1.91)	4 (0.01)		30 (0.07)						256 (99.08)	12
<i>C. murphyi</i>	55 (0.68)		22 (0.07)		114 (0.26)	1 (0.29)	1 (0.03)	1 (2.94)	4 (0.17)		198 (99.27)	13
<i>C. leucostictus</i>	14 (0.17)	3 (1.15)	68 (0.21)	1 (0.01)	23 (0.05)		50 (1.67)		21 (0.90)		180 (99.45)	14
<i>C. miombo</i>	1 (0.01)		25 (0.08)		56 (0.13)	1 (0.29)	20 (0.67)		48 (2.05)	7 (1.22)	158 (99.61)	15
<i>C. pseudopallidipennis</i>			28 (0.09)		16 (0.04)		4 (0.13)		44 (1.88)	4 (0.70)	96 (99.70)	16
<i>C. hortensis</i>	25 (0.31)	3 (1.15)			33 (0.07)	1 (0.29)					62 (99.76)	17
<i>C. accraensis</i>	2 (0.02)		1 (<0.01)		2 (<0.01)				38 (1.62)		43 (99.81)	18
<i>C. pycnostictus</i>	4 (0.05)		13 (0.04)		6 (0.01)		8 (0.27)		10 (0.43)		41 (99.85)	19
<i>C. translucens</i>					2 (<0.01)				25 (1.07)		27 (99.87)	20
<i>C. pretoriensis</i>			9 (0.03)						16 (0.68)	1 (0.17)	26 (99.90)	21
<i>C. azerbaijaniensis</i>	2 (0.02)				16 (0.04)		2 (0.07)		5 (0.21)		25 (99.92)	22
<i>C. dekeyseri</i>					20 (0.05)						20 (99.94)	23
<i>C. neavei</i>			9 (0.03)						1 (0.04)		10 (99.95)	24
<i>C. trifasciellus</i>					1 (<0.01)		1 (0.03)		8 (0.34)		10 (99.96)	25
<i>C. nevillei</i>	3 (0.04)		2 (0.01)	1 (0.01)					1 (0.04)		7 (99.97)	26
<i>C. expectator</i>									5 (0.21)		5 (99.98)	27
<i>C. nigripennis</i>									4 (0.17)		4 (99.98)	28
<i>C. ravus</i>	1 (0.01)				2 (<0.01)		1 (0.03)				4 (99.98)	29
<i>C. robini</i>	1 (0.01)		1 (<0.01)		1 (<0.01)						3 (99.99)	30

Table 1 Cumulative maximum monthly abundance [number of *Culicoides* (percentage)] by trap (two light- and horse-baited traps) and by site collected over the year (from July 2011 to October 2012) in the Niayes area of Senegal (Continued)

<i>C. quinquelineatus</i>				2 (<0.01)					2 (99.99)		31
<i>C. vomensis</i>								2 (0.09)	2 (99.99)		32
<i>C. wansoni</i>		2 (0.01)							2 (99.99)		33
<i>C. clarkei</i>								1 (0.04)	1 (99.99)		34
<i>C. congolensis</i>				1 (<0.01)					1 (99.99)		35
<i>C. dispar</i>				1 (<0.01)					1 (100.00)		36
<i>C. fulvithorax</i>								1 (0.04)	1 (100.00)		37
<i>C. punctithorax</i>								1 (0.04)	1 (100.00)		38
<i>C. sellersi</i>		1 (<0.01)							1 (100.00)		39
<i>C. vicinus</i>				1 (<0.01)					1 (100.00)		40
<i>C. yankari</i>		1 (<0.01)							1 (100.00)		41
	8,123	262	32,727	9,541	44,415	344	2,996	34	2,339	573	101, 354

Table 2 New list of *Culicoides* species found in Senegal

Reported species not found	Reported species found	Newly recorded species
<i>C. africanus</i> [‡] Clastrier	<i>C. accraensis</i> ² Carter, Ingram and Macfie	<i>C. austeni</i> ^{†1} Carter, Ingram and Macfie
<i>C. camicasi</i> Cornet and Château	<i>C. clarkei</i> ² Carter, Ingram and Macfie	<i>C. azerbaijdzhanicus</i> ² Dzhanfarov
<i>C. chateauli</i> Cornet	<i>C. congolensis</i> ² Clastrier	<i>C. bolitinos</i> ^{†1} Meiswinkel
<i>C. dasyops</i> Clastrier	<i>C. dekeyseri</i> ² Clastrier	<i>C. hortensis</i> ^{†1} Khamala and Kettle
<i>C. dutoitii</i> de Meillon	<i>C. dispar</i> ² Clastrier	<i>C. leucostictus</i> ¹ Kieffer
<i>C. grahamii</i> Austen	<i>C. distinctipennis</i> ¹ Austen	<i>C. milnei</i> ^{†1} Austen
<i>C. kobae</i> Cornet and Château	<i>C. enderleini</i> ^{†1} Cornet and Brunhes	<i>C. miombo</i> ^{†1} Meiswinkel
<i>C. krameni</i> [‡] Clastrier	<i>C. expectator</i> ² Clastrier	<i>C. murphyi</i> ¹ Clastrier and Wirth
<i>C. micheli</i> Cornet and Château	<i>C. fulvithorax</i> ² Austen	<i>C. nigripennis</i> ² Carter, Ingram and Macfie
<i>C. moucheti</i> Cornet and Kremer	<i>C. gambiae</i> ¹ Clastrier and Wirth	<i>C. oxystoma</i> ^{†1} Kieffer
<i>C. peretti</i> Cornet and Château	<i>C. imicola</i> ^{†1} Kieffer	<i>C. pretoriensis</i> ¹ Kremer and Nevill
<i>C. saboyae</i> Cornet	<i>C. kingi</i> ^{†1} Austen	<i>C. punctithorax</i> ² Carter, Ingram and Macfie
	<i>C. moreli</i> ^{†1} Clastrier	<i>C. quinquelineatus</i> ^{†2} Goetghebuer
	<i>C. neavei</i> ² Austen	<i>C. sellersi</i> ² Boorman and Dipeolu
	<i>C. nevillei</i> ^{†1} Cornet and Brunhes	<i>C. translucens</i> ² Khamala and Kettle
	<i>C. nivosus</i> ¹ de Meillon	<i>C. trifasciellus</i> ² Goetghebuer
	<i>C. pseudopallidipennis</i> ^{†1} Clastrier	<i>C. vomensis</i> ² Boorman and Dipeolu
	<i>C. pycnostictus</i> ² Ingram and Macfie	<i>C. wansonii</i> ^{†2} Goetghebuer
	<i>C. rarus</i> ² de Meillon	<i>C. yankari</i> ² Boorman and Dipeolu
	<i>C. robini</i> ² Cornet	
	<i>C. similis</i> ¹ Carter, Ingram and Macfie	
	<i>C. vicinus</i> ² Clastrier	

[‡]Species in the *Imicola* group; [†]species in the *Schultzei* group; [‡]species in the *Milnei* group.

¹species captured in horse-baited trap and light trap ²species captured only in the light trap.

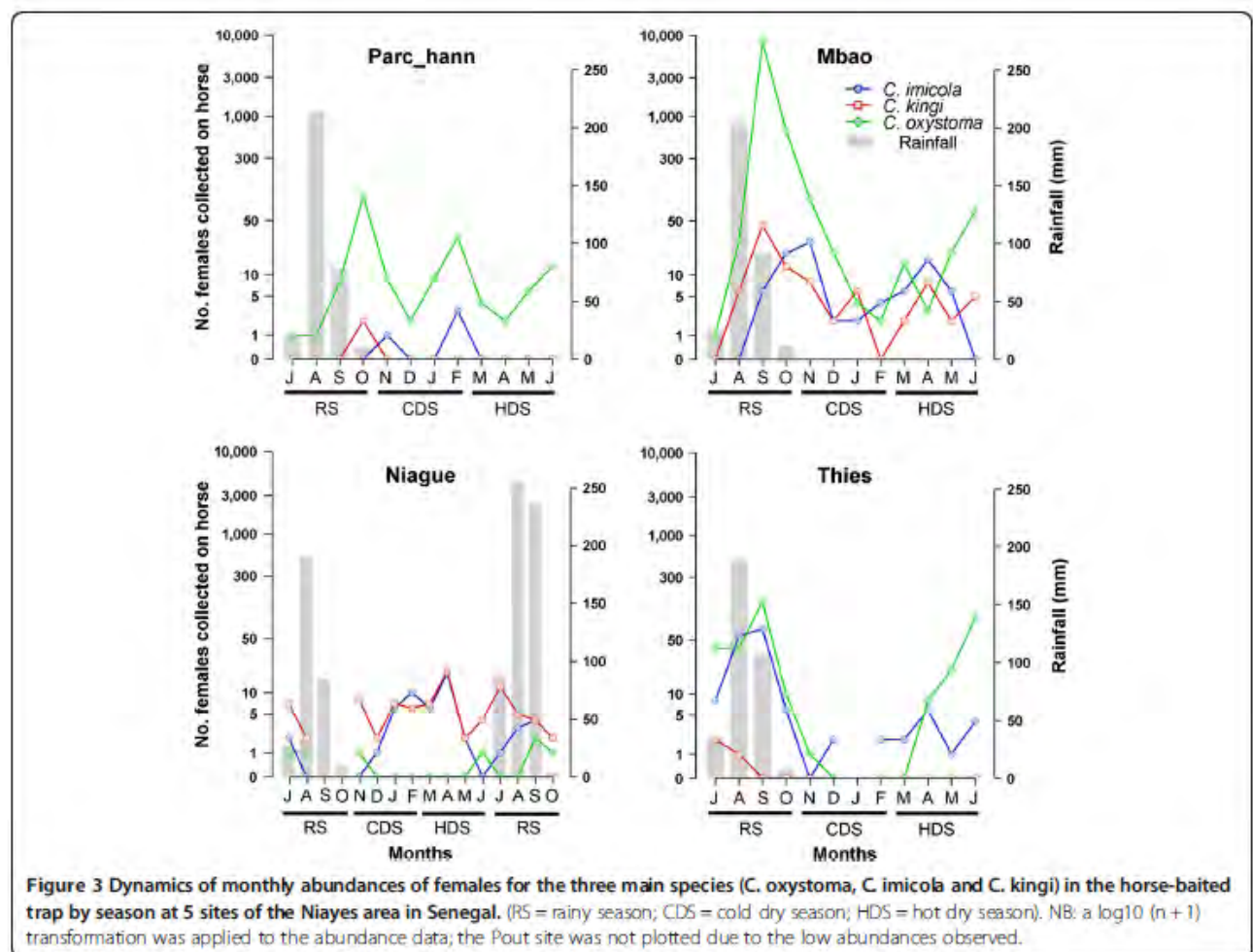
This update was made on the basis of species collected by light- and horse-baited traps in 2011–2012 in the Niayes area (Diarra et al. [20] and the present study). The individuals identified as *C. laxodontis* Meiswinkel in Diarra et al. [20] were identified in this paper as *C. imicola*.

Overall, biting rates on horses were high at Mbao, medium at Hann, Niague and Thies and relatively low at Pout (Table 3). For *C. oxystoma*, the mean value at Mbao was 772 females/trap/night as compared to 15 or 30 females/trap/night at the Hann Pony Club and at Thies, and close to 0 at Niague and Pout. The highest attack rates on horses were observed in the second half of

the rainy season (September and October) at Parc Hann, Mbao and Thies for *C. oxystoma*, *C. imicola* and *C. kingi* (Figure 3). At these three sites, the primary peak of attack rates was accompanied by a secondary peak during the hot dry season before the rains set in. These species had low abundances during the cold dry season (November to February). In contrast, at Niague, *C. kingi*

Table 3 Mean cumulative maximum monthly abundance (maximum) - frequency of *Culicoides* collected in the 5 study sites (N = No. collections) in horse-baited traps (from July 2011 to October 2012) in the Niayes area of Senegal

	Parc Hann (N = 36)	Mbao (N = 36)	Niague (N = 36)	Pout (N = 34)	Thies (N = 36)	Total (N = 178)
<i>C. oxystoma</i>	16.58 (105) - 100.0	774.17 (8,340) - 100.0	0.67 - 58.3	1.20 (4) - 70.0	31.08 (149) - 75.0	170.38 (8,502) - 100.0
<i>C. imicola</i>	0.42 (3) - 25.0	7.50 (27) - 75.0	4.58 (21) - 75.0	1.70 (5) - 80.0	13.08 (69) - 83.3	5.59 (80) - 100.0
<i>C. kingi</i>	0.25 (3) - 8.3	8.67 (47) - 83.3	11.17 (50) - 100.0	0	0.25 (2) - 16.7	4.21 (58) - 100.0
<i>C. enderleini</i>	0.33 (2) - 16.7	3.33 (35) - 33.3	0.17 (1) - 16.7	0.10 (1) - 10.0	0.17 (1) - 16.7	0.84 (35) - 66.7
<i>C. austeni</i>	2.25 (12) - 50.0	0	0.50 (4) - 16.7	0	0	0.57 (12) - 58.3
<i>C. bolitinos</i>	0	0.33 (2) - 25.0	0.17 (1) - 16.7	0.10 (1) - 10.0	1.75 (11) - 41.7	0.48 (11) - 58.3
<i>C. moreli</i>	0	0.67 (3) - 41.7	1.33 (8) - 25.0	0	0.17 (1) - 16.7	0.45 (10) - 50.0
<i>C. nivosus</i>	0.83 (4) - 58.3	0	0.75 (2) - 41.7	0.20 (1) - 20.0	0.17 (1) - 16.7	0.40 (4) - 91.7
Total	20.67 (118) - 100.0	794.67 (8,430) - 100.0	19.33 (73) - 100.0	3.30 (9) - 75.0	46.67 (224) - 91.7	



appeared to be attracted by the horse all year round, and *C. imicola* during the dry seasons (Figure 3).

All engorged females found in the horse-baited traps belong to the Imicola, Schultzei and Milnei groups (Table 4), with an overall engorgement rate of 36.7%. Differences in engorgement rates between species were significant (Kruskal Wallis test, $p = 0.03$). The engorgement rates may be classified in three groups: the species with an engorgement rate of more than 75% that include *C. bolitinos*, a proven vector of AHSV in South Africa, the species whose engorgement rate ranges between 50 and 75% that include *C. imicola* the main vector of AHSV in Africa, and those whose engorgement rate is less than 50% that include the species in the Schultzei group: *C. oxystoma*, *C. enderleini* and *C. kingi*. Females of *C. gambiae*, *C. leucostictus*, *C. murphyi*, *C. nevillei*, *C. nivosus* and *C. similis* species which were rarely collected in the horse-baited trap were found not to be engorged.

Comparison with light trap collections

A total of 127,197 *Culicoides* was collected by the light trap located <5 m from the horses, whereas the light

Table 4 Overall engorgement rate of female *Culicoides* caught in the horse-baited trap at the five sampling sites (from July 2011 to October 2012) in the Niayes area of Senegal

Species	Number of engorged females [total females]	Engorgement rate (%)
<i>C. hortensis</i> †	4 [4]	100.0
<i>C. milnei</i> †	4 [5]	80.0
<i>C. bolitinos</i> *	28 [36]	77.8
<i>C. miombo</i> *	6 [8]	75.0
<i>C. imicola</i> *	299 [465]	64.5
<i>C. pseudopallidipennis</i> *	3 [5]	60.0
<i>C. austeni</i> †	85 [156]	54.5
<i>C. moreli</i> †	16 [44]	36.4
<i>C. oxystoma</i> †	7,943 [21,941]	36.2
<i>C. enderleini</i> †	20 [99]	20.2
<i>C. kingi</i> †	62 [308]	20.1

*Species in the Imicola group; †species in the Schultzei group; ‡species in the Milnei group. Are listed only species from which at least one female was found engorged.

trap located >10 m from the horses collected 103,473 *Culicoides*. The total number of *Culicoides* by species was highly correlated between traps ($r = 0.95$, $p < 0.001$), the nine most abundant species (98% of the total collection for both traps) being the same. The three or four most abundant species (*C. oxystoma* and/or *C. kingi*, *C. imicola* and *C. enderleini*) presented the same rank at each site, with the only exception of Mbao where *C. kingi* and *C. imicola* were at the rank 2 and 3 in the light trap <5 m from the horses (12.8% and 9.2% of the total collection) and at the rank 3 and 2 in the light trap >10 m from the horses (15.2% and 24.1%). The differences of proportional representation were low between both light traps for the four most abundant species (mean = 4%, $N = 20$), with only three differences >4%: the differences were 33% between collections of the light trap <5 m and of the light trap >10 m for *C. oxystoma* at Mbao, but -10% for this species at Hann, and -18% for *C. kingi* at Niague. Moreover the monthly abundances

estimated with the light trap <5 m and the light trap >10 m were highly correlated ($r = 0.73$, $p < 0.001$). Considering thus that both light traps gave comparable results, this data was grouped for the remainder of the analyses, while maintaining the maximum abundance observed per species, site and month.

We compared horse-baited trap collections to light trap collections using two complementary approaches: 1) a principal component analysis (PCA) using between and within-classes decomposition to quantify relative influence of both sites and trap types on *Culicoides* diversity as a whole, and 2) correlations between horse-baited and light trap collections by species.

In a first step, centred PCA was performed on the natural logs of the percentages of cumulative abundance by species, site and type of trap. The four first axes represented 89.8% of total variance (Figure 4A respectively 41.3%, 63.2% and 78.6% for each of the first three axes). Between-class (between sites) variance explained 74.0%

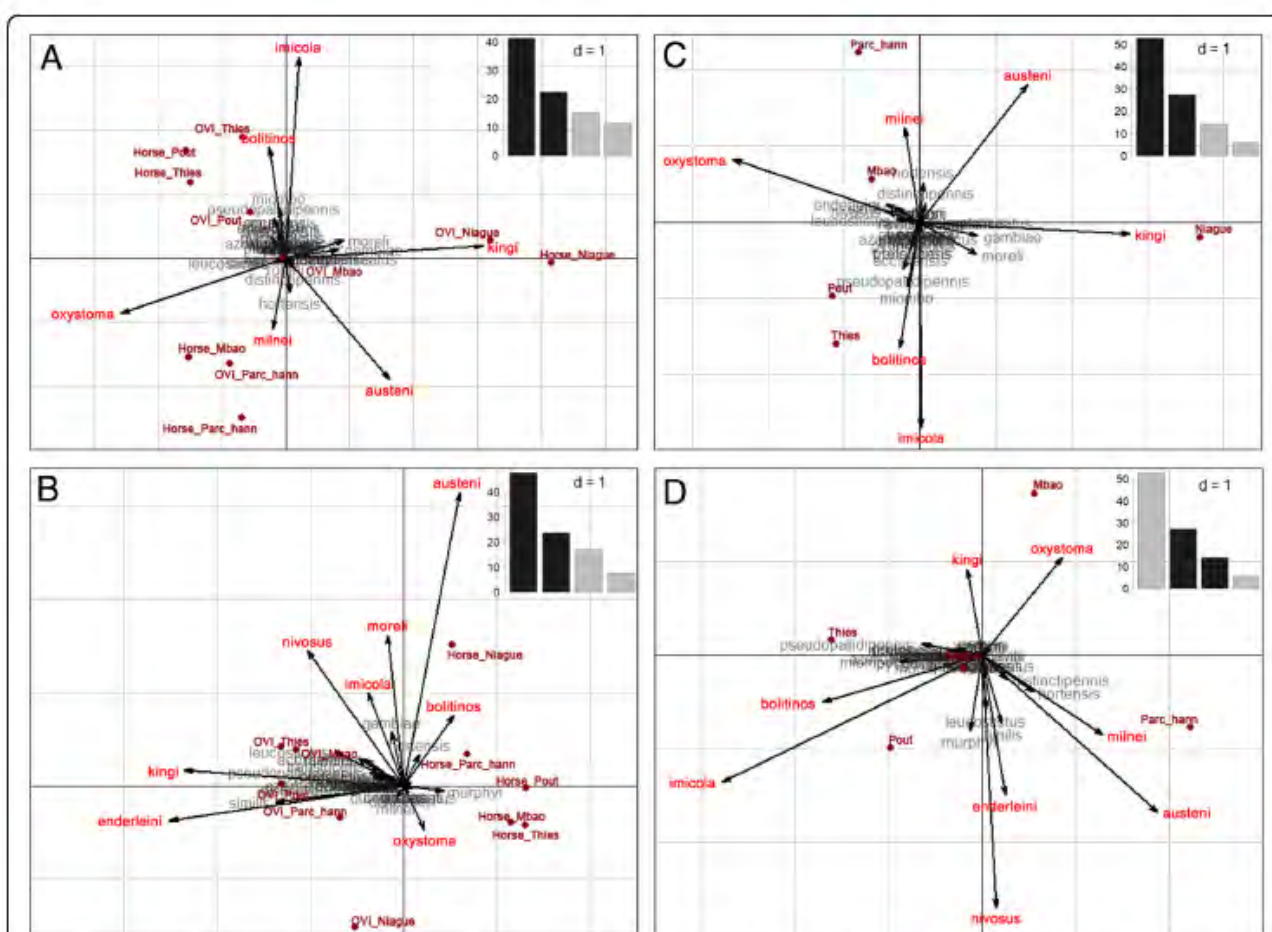


Figure 4 Diversity of the *Culicoides* captured by site (5 sites in the Niayes area of Senegal) and trap (light- and horse-baited trap) from July 2011 to October 2012. **A:** Centred principal component analysis (PCA) performed on the natural logs of the cumulative percentages of abundance by species, site and type of trap (axis 1/axis 2). **B:** PCA within-class analysis (axis 1/axis 2). **C** and **D:** PCA between-class analysis (axis 1/axis 2 and axis 2/axis 3).

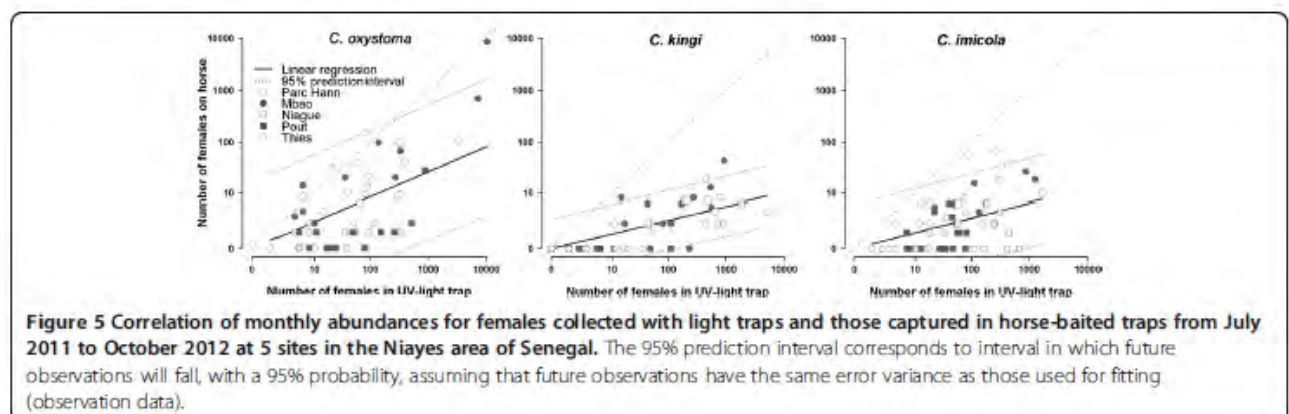
(as against 44.9% predicted by a permutation test, $p < 0.01$) of the PCA variance, while within-class (between trap types) accounted for 26.0%, indicating that the site effect was much more predominant in *Culicoides* diversity than the trap effect. This result was illustrated by the resemblance of Figure 4A (PCA) and Figure 4C (PCA with a maximisation of the variance between sites) with the opposition on axis 1 between the Niague site characterised by *C. kingi* and the other sites characterised by *C. oxystoma*, and on axis 2 between Parc Hann and Mbao sites characterised by *C. austeni* and *C. milnei* and Pout and Thies sites characterised by *C. imicola* and *C. bolitinos*. Figure 4D illustrated the opposition between Mbao characterised by both *C. oxystoma* and *C. kingi*, and Parc Hann and Pout characterised by *C. enderleini* and *C. nivosus* on axis 3. Indeed, in Parc Hann, *C. oxystoma* was dominant (66.7% of light trap catches) and was associated with *C. enderleini* (12.6%), in Mbao *C. oxystoma* was predominant (69.9%) in association with *C. kingi* (12.5%) and *C. imicola* (11.4%), in Niague the prevalent species was *C. kingi* (78.6%) in association with *C. imicola* (10.3%), in Pout *C. oxystoma* was dominant (49.3%) alongside *C. imicola* (18.6%) and *C. enderleini* (10.9%) and in Thies *C. oxystoma* was predominant (38.9%) followed by *C. imicola* (30.0%). Hence there was a west-to-east gradient of increasing proportional representation of *C. imicola* (from 3.2 to 30.0%) and of decreasing proportional representation of *C. oxystoma* (from 66.7 to 38.9%, with the exception of Niague where *C. oxystoma* was less represented [3.1%]). Within-class (between trap types) analysis showed differences in catch diversity as between light and baited traps (Figure 4B). This structure was mainly attributable to the species *C. kingi* and *C. enderleini*, which were chiefly captured by light traps (total cumulative monthly abundance is respectively 39,308 and 3,942 for the light trap as against 258 and 50 for the baited trap).

In a second step, correlations were assessed between horse-baited and light trap collections. Monthly abundances of female *C. oxystoma* captured in the light traps were correlated with those collected on the horse bait

(Figure 5) at the Parc Hann, Mbao and Thies sites, but not for the other two sites where hardly any of this species were captured on the horse. For those three sites, light trap captured more *Culicoides* by a factor of 1.57 with a $\log_{10}$ scale ($\log_{10}(\text{No. } Culicoides \text{ on horse} + 1) \times 1.57 = \log_{10}(\text{No. } Culicoides \text{ in light trap} + 1)$; $R^2 = 85.4$; $p < 0.001$) than horse baited trap. *Culicoides kingi* was captured on the horse bait in Mbao and Niague alone. At these two sites (Figure 5), the light trap considerably collected more *Culicoides* by a factor of 3.82 with a $\log_{10}$ scale ($R^2 = 74.1$; $p < 0.001$) than horse baited trap. Light trap catches of *C. imicola* were correlated with the horse-baited estimated abundances at the Mbao and Thies sites (Figure 5), where the light trap collections were greater by a factor of 2.41 with a $\log_{10}$ scale ($R^2 = 75.6$; $p < 0.001$). There was no correlation between horse-baited and light trap collections for *C. enderleini* or *C. nivosus*.

Discussion

The *Culicoides* inventory conducted during these horse-baited and light trap surveys in a relatively limited area in the southern part of the Niayes area provided an updated list of *Culicoides* for Senegal comprising 53 species and, more significantly, established the presence and abundance of *C. oxystoma* on horse-baited trap. This species' distribution was previously confined to the Eastern and Australasian Regions [30,41] and was during this survey identified for the first time in the Afro-tropical Region [19]. In Senegal, there are now at least four species that belong to the Schultzei group: *C. enderleini*, *C. kingi*, *C. nevillei*, and *C. oxystoma*. The presence of a number of other species in the Imicola group such as *C. bolitinos* and *C. miombo* and in the Milnei group such as *C. austeni*, *C. hortensis*, *C. milnei*, *C. quinquelineatus* and *C. wansonii* was also recorded for the first time in Senegal (some of these species were already mentioned by Diarra et al. [20]). Twelve species previously captured in other bioclimatic areas of Senegal [12,14] were not detected during this survey.



Culicoides oxystoma was the most abundant species associated with horses in the Niayes area, which is known for past outbreaks of AHS [11], and where the latest AHS epizootic in Senegal in 2007 caused considerable losses [8,42]. This raises questions about its role in transmitting the AHSV in Senegal. Its competence against AHSV has never been determined. *Culicoides oxystoma* is known to be involved in the transmission of bovine arboviruses such as Akabane in Japan [43,44]. It is a suspected vector of epizootic haemorrhagic disease virus in Israel [45] and a potential vector of the blue-tongue virus (BTV) in India [46].

To a lesser extent, horses were also attacked by *C. imicola* in Mbao, Niague and Thies, with *C. kingi* in Mbao and Niague, with *C. enderleini* in Mbao, with *C. austeni* in Parc Hann, and by *C. bolitinos* in Thies. *Culicoides imicola* is a proven vector of AHSV in South Africa [47] and probably in the Maghreb (Morocco) and the Iberian peninsula (Spain and Portugal) [48]. It is also the main vector of BTV in South Africa, in the Maghreb and in Southern Europe [49]. The role of *C. kingi* and of *C. enderleini* as vectors of AHSV is not clearly established. Field-collected specimens of *C. kingi* in Sudan have been found to be infected by epizootic haemorrhagic disease virus [50]. *Culicoides enderleini* is a potential vector for BTV in South Africa [47,51] and experimental infections conducted in the laboratory have shown that AHSV could be isolated in field specimens of this species 10 days after feeding on a virus-infected blood meal [52]. *Culicoides bolitinos*, the second proven vector for AHSV in South Africa [16], was rarely found at our sampling sites. It is difficult to conclude if this species may play a major role in the transmission of AHSV in Senegal because only a few sites were sampled. This species is mostly found in sub-tropical regions with a humid, cool climate like the coast and mountains of South Africa and locally closely linked with the presence of bovids. Indeed, the coprophilous larvae of *C. bolitinos* develop preferentially on cattle, buffalo and wildebeest dung [16]. However, molecular studies should be conducted on the rare individuals of *C. bolitinos* found in Senegal to ascertain their specific status in view of the many morphological variations observed on these specimens. It is interesting to note that *C. bolitinos* is morphologically similar to *C. brevitarsis*, a species whose coprophilous larvae also develop on cattle dung [53] and whose distribution in the Eastern and Australasian Regions is identical to that of *C. oxystoma*.

In tropical areas, high numbers of *Culicoides* are generally observed at the end of the rainy season, with significant decreases in population during the dry season, in connection with rainfall, relative moisture and temperature which impact both the productivity of larval habitats and the activity of adults [49,54]. The same

trend was found in Senegal where the highest abundances of *C. oxystoma* were observed at the end of the rainy season (September and October) and, to a lesser extent, at the end of the dry season (June). These seasonal dynamics for the dominant species in horse-baited traps was highly correlated with that in light traps [20]. These two peaks of abundance coincided with the periods of emergence and expansion of cases of AHS during the 2007 outbreak [42].

The dynamics for the three most abundant species on horses differ according to the site. Between-site variations in the dynamics of *C. oxystoma* may depend on local ecological conditions, in particular the productivity of the available larval habitats [55]. Indeed, the Mbao and Hann sites are respectively located close to a river and a marsh whereas in Thies flooding of larval habitats and their productivity may be more dependent on rainfall alone. Some of the species in the Schultzei group are regularly found along streams and drainage canals and in mud containing little organic matter [56]. The larvae of *C. oxystoma* can develop both in mud and sand. This may explain the overall abundance of *C. oxystoma* in the Niayes area (depressions between dunes that are liable to flooding in the rainy season). Studies out in India have shown that *C. oxystoma* is a euryhaline species that is present all year round in the Sagar Island estuary in India [57,58]. *Culicoides kingi*, a species typical of brackish environments [13], is the dominant species at the Niague site located close to Lake Retba (the pink lake) where salt is harvested. At this location, the species' maximum abundance occurs at the end of the dry season (June) and diminishes with rain when the salt concentration in breeding sites may drop creating conditions that are less conducive to the development of this species. This phenomenon is documented for *Anopheles melas* (Diptera: Culicidae), a mosquito species in the *Anopheles gambiae* complex whose halophilic larvae develop on West African lagoons [59]. As for *C. imicola*, *C. kingi* is relatively abundant at Niague and Mbao with essentially year round activity but its larval ecology is poorly known and deserves investigation, particularly in Senegal.

The high engorgement rates of the specimens belonging to the Imicola group, including *C. bolitinos* and *C. imicola*, confirmed the trophic preference of these two species for horses [60,61] and the probable role of *C. imicola* in the transmission of AHSV in Senegal in relation to its abundance and vector status in South Africa [15,47]. However, the average below engorgement rates on horses of the main species in the Schultzei group (*C. oxystoma*, *C. kingi* and *C. enderleini*) may be offset by their abundances, in particular as regards *C. oxystoma*, if it is proven that these species are competent vectors of AHSV.

It is established that light trap collections do not assess biting rates on animals accurately [62,63]. Nevertheless, both methods gave the same picture of *Culicoides* diversity as a whole, as highlighted by the decomposition of PCA variance into between-class (sites) and within-class (traps). This PCA was carried out using the proportional representation rather than the abundance to avoid a "size effect" due to important difference of abundance between sites and between traps. Using abundance in PCA, data were structured mainly along a single axis, highlighting the opposition for *C. kingi* and *C. enderleini* between light traps with high abundance and horse-baited traps with low abundances. This structure driven by *C. kingi* and *C. enderleini* was also found in the within-classes analysis.

The horse-baited trap collected fewer species and is therefore more appropriate for investigating host/vector contact. The difference is reflected by the over-representation of species such as *C. oxystoma* (1.57 in a log₁₀ scale), *C. kingi* (3.82 in a log₁₀ scale) and *C. imicola* (2.41 in a log₁₀ scale) in the light traps compared to the horse-baited traps. Determining such as correction factors is crucial to rescale wide-scale abundance maps, established with light traps as the most convenient trapping method, to probable biting rates which could be used in transmission models.

Conclusion

This study allows an update of list of *Culicoides* species of veterinary interest in Senegal (53 species to date). *Culicoides oxystoma*, and to a lesser extent *C. kingi* and *C. enderleini*, were furthermore identified as potential vectors of AHSV in the Niayes area of Senegal additionally to the vector *C. imicola* due to their abundance and aggressiveness on horses, as well as their role as vectors for transmitting other animal viral diseases such as Akabane and Epizootic haemorrhagic disease viruses. These preliminary results should however be corroborated by further studies, both in the field and in the laboratory, so as to better specify their bio-ecology, in particular their larval biotope, and their vector competence, and gain a better understanding of their role in the epidemiology of AHS in Senegal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TBt, AGF, MTS, TBN and JB designed and supervised the study. MF, AGF, IM performed sampling and global management of the entomological material. MF and IM performed the species identification with the help of CG, TB, XA, JCD, and IR. MTB, AMD, MD and MN participated in field and laboratory activities. MF, AGF, GG, TBt, LK, OF and TBN analysed the data and wrote the first draft of the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors want to thank both anonymous referees for their excellent suggestions. The authors are particularly grateful to Karlen Labuschagne for her help on morphology, to all people who provided assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds) in Senegal and to Hélène Guis for manuscript reading. This study was funded partly from the EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. This paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext247 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Author details

¹ISRA, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Route Front de Terre, Dakar, Senegal. ²Cirad, UMR CMAEE, F-34398 Montpellier, France. ³INRA, UMR1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France. ⁴UdS, IPPTS, Faculté de Médecine, F-67000 Strasbourg, France. ⁵Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar BP 5005, Senegal.

Received: 23 July 2014 Accepted: 26 December 2014

Published online: 21 January 2015

References

- Borkent A. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). British Columbia, Canada: RBC Museum; 2014.
- Du Toit RM. The transmission of blue-tongue and horse sickness by *Culicoides*. Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind. 1944;197-16.
- Coetzer JAW, Erasmus BJ. African horse sickness. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC, editors. Infectious Disease of Livestock with Special Reference to Southern Africa. Cape Town: Oxford University Press; 1994. p. 460-75.
- Mellor PS, Hamblin C. African horse sickness. Vet Res. 2004;35(4):445-66.
- OIE. African Horse Sickness. 2009. p. 1-5.
- Coetzer JAW, Guthrie AJ. African horse sickness. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. Infectious Diseases of Livestock, 2nd. Southern Africa: Oxford University Press; 2004. p. 1231-46.
- Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the UK and northwestern Palearctic. Med Vet Entomol. 2008;22:175-87.
- Akakpo AJ, Wombou Toukam CM, Mankor A, Ly C. Impact économique de l'épizootie de peste équine de 2007 au Sénégal. Bull Anim Health Prod Afr. 2011;59:1-16.
- MacLachlan NJ, Guthrie AJ. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. Vet Res. 2010;41(6):35.
- Bourdin P, Sarr J, Lejan C. Isolement et identification de la Peste équine africaine en zone sahéloenne à partir de foyers récents. Bull Int Epiz. 1976;86:717-9.
- Sarr J, Diop M, Cissoko S. La peste équine africaine au Sénégal: un nouveau foyer à type 9 dans la commune de Thiès. ISRA VIROLOGIE. 1987.
- Cornet M. Les *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) de l'Ouest Africain (1ère note). Cah ORSTOM Ser Entomol med Parasitol. 1969;7(4):341-64.
- Cornet M, Brunhes J. Révision des espèces de *Culicoides* apparentées à *C. shultzei* (Enderleini, 1908) dans la région afro-tropicale (Diptera: Ceratopogonidae). Bull Soc Entomol Fr. 1994;92(2):149-64.
- Cornet M, Chateau R. Les *Culicoides* de l'Ouest africain (2^e note) Espèces apparentées à *C. similis* Carter, Ingrain et Macfie, 1920 (Diptera: Ceratopogonidae). Cah ORSTOM Ser Entomol med Parasitol. 1970;8(2):141-73.
- Venter GJ, Graham SD, Hamblin C. African horse sickness epidemiology: vector competence of south african *Culicoides* species for virus serotypes 3, 5 and 8. Med Vet Entomol. 2000;14(3):245-50.
- Meiswinkel R, Paweska JT. Evidence for a new field *Culicoides* vector of African horse sickness in South Africa. Prev Vet Med. 2003;60(3):243-53.
- Venter GJ, Paweska JT. Virus recovery rates for wild-type and live-attenuated vaccine strains of African horse sickness virus serotype 7 in orally infected South African *Culicoides* species. Med Vet Entomol. 2007;21:377-83.
- Meiswinkel R, Gornulski LM, Delécolle JC, Goffredo M, Gasperi G. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. Vet Ital. 2004;40(3):151-9.
- Bakhoun MT, Fall M, Fall AG, Bellis GA, Gottlieb Y, Labuschagne K, et al. First record of *Culicoides oxystoma* Kleffer and diversity of species within the

- Schultzei group of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. *PLoS ONE*. 2013;8(12):1–8.
20. Diarra M, Fall M, Fall AG, Diop A, Seck MT, Garros C, et al. 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*. 2014;7:147.
 21. Sagna P. Le climat. In: Paris JA, editor. *Atlas du Sénégal*. 5th ed. 2000. p. 16–9.
 22. Faye O, Gaye O, Fontenille D, Hébrard G, Konate I, Sy N, et al. La sécheresse et la baisse du paludisme dans les Niayes du Sénégal. *Cah Santé*. 1995;5299–305.
 23. Fall AG, Dialte A, Lancelot R, Tran A, Soti V, Etter E, et al. Feeding behaviour of potential vectors of West Nile virus in Senegal. *Parasit Vectors*. 2011;9(4):1–7.
 24. Fall AG, Dialte A, Seck MT, Bouyer J, Lefrançois T, Vachliery N, et al. West Nile virus transmission in sentinel chickens and potential mosquito vectors, Senegal river delta, 2008–2009. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10:4718–27.
 25. Venter GJ, Paweska JT, Van Dijk AA, Mellor PS, Tabachnick WJ. Vector competence of *Culicoides* *bolitinos* and *C. imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Med Vet Entomol*. 1998;12:378–85.
 26. Goffredo M, Meiswinkel R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Ital*. 2004;40(3):260–5.
 27. Venter GJ, Majatadi DM, Labuschagne K, Bokanyo SNB, Morey L. The attraction range of the Onderstepoort 220 V light trap for *Culicoides* biting midges as determined under South African field conditions. *Vet Parasitol*. 2012;190:222–9.
 28. Wirth WW, Marston N. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Ann Entomol Soc Am*. 1968;61:783–4.
 29. Cornet M, Nevill EM, Walker AR. Notes sur les *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), du groupe de *C. milnei* Auten, 1909, en Afrique orientale et australe. *Cah ORSTOM Ser Entomol med Parasitol*. 1974;12(4):231–43.
 30. Boorman J. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian Peninsula with Notes on their medical and veterinary importance. *Fauna Saudi Arabia*. 1979;10:160–224.
 31. Boorman J, Dipeolu OO. A taxonomic study of adult Nigerian *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species. *Occ Publ Ent Soc Nigeria*. 1979;22:1–121.
 32. Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (Avaritia) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*. 1989;56:23–39.
 33. Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) miombo* sp. nov., a widespread species closely allied to *C. (A.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res*. 1991;58(3):155–70.
 34. Glick JL. *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol*. 1990;27(2):85–195.
 35. Van Ark H, Meiswinkel R. Subsampling of large light trap catches of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res*. 1992;59:183–9.
 36. Baylis M, B Hasnaoui H, Bouayoune H, Touti J, Mellor PS. The spatial and seasonal distribution of African horse sickness and its potential *Culicoides* vectors in Morocco. *Med Vet Entomol*. 1997;11(3):203–12.
 37. Hollander M, Wolfe DA. Non parametric statistical Inference. N Y: John Wiley & Sons, Inc; 1973.
 38. Benzécri JP. Analyse de l'inertie Intra-classe par l'analyse d'un tableau de correspondances. *Cah Anal Données*. 1983;8:351–8.
 39. Dolédec S, Chessel D. Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique I- Description d'un plan d'observations complet par projection de variables. *Acta Oecologica, Oecologia Generalis*. 1987;8(3):403–26.
 40. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2005. ISBN 3-900051-07-0 2005.
 41. Wirth WW, Hubert AA. The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Am Entomol Inst*. 1989;44:1–509.
 42. Diouf ND, Etter E, Lo MM, Lo M, Akapo AJ. Outbreaks of African horse sickness in Senegal and methods of control of the 2007 epidemic. *Vet Record*. 2013;172(6):152.
 43. Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, Matsumoto M. Isolation of Akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Vet Microbiol*. 1987;15(3):243–8.
 44. Yanase T, Kato T, Kubo T, Yoshida K, Ohashi S, Yamakawa M, et al. Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985–2002. *J Med Entomol*. 2005;42(1):63–7.
 45. Morag N, Saroya Y, Bravermann Y, Klement E, Gottlieb Y. Molecular identification, phylogenetic status and geographic distribution of *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33610.
 46. Dadawala AI, Biswas SK, Rehman W, Chand K, De A, Mathapati BS, et al. Isolation of bluetongue virus serotype 1 from *Culicoides* vector captured in livestock farms and sequence analysis of the viral genome segment-2. *Transbound Emerg Dis*. 2012;59:361–8.
 47. Venter GJ, Mellor PS, Paweska JT. Oral susceptibility of South African stock-associated *Culicoides* species to bluetongue virus. *Med Vet Entomol*. 2006;20:329–34.
 48. Rawlings P, Pro MJ, Pena I, Ortega MDC. Spatial and seasonal distribution of *Culicoides imicola* in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus. *Med Vet Entomol*. 1997;11:49–57.
 49. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol*. 2000;45:307–40.
 50. Mellor PS, Osborne R, Jennings DM. Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan. *J Hyg*. 1984;93(3):621–8.
 51. Nevill EM, Venter GJ, Edwards M. Potential *Culicoides* vectors of livestock orbiviruses. In: Walton TE, Osburn BJ, editors. *Bluetongue, African horse sickness, and related orbiviruses: Proceedings of the 2nd International Symposium*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1992. p. 306–13.
 52. Venter GJ, Labuschagne K, Hermanides KG, Bokanyo SNB, Majatadi DM, Morey L. Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Vet Parasitol*. 2009;166(3):299–307.
 53. Yanase T, Matsumoto Y, Matsumori Y, Aizawa M, Hirata M, Kato T, et al. Molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the southern part of Japan. *J Med Entomol*. 2013;50(5):1105–10.
 54. Herniman KA, Boorman JP, Taylor WP. Bluetongue virus in a Nigerian dairy cattle herd. 1. Serological studies and correlation of virus activity to vector population. *J Hyg*. 1983;90(2):177–93.
 55. Bishop AL, McKenzie J, Sporh LJ, Barchia IM. *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in different farm habitats. *Aust J Zool*. 1994;42:372–84.
 56. Wirth WW, Dyce AL. The taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses. In: Barber TL, Jochim MM, Alan R, editors. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. NY: Liss; 1985. p. 151–64.
 57. Ray S, Choudhury A. Vertical distribution of a biting midge, *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) during different seasons in the Hooghly Estuary, Sagar Island, India. *Insect Sci Appl*. 1988;9(3):329–33.
 58. Poddar TK, Ray S, Choudhury A. Ecology of larval *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Hooghly Estuary, Sagar Island, India. *Ann Entomol Soc Am*. 1992;10(1):19–25.
 59. Akogbeto M. Etude entomologique sur la transmission du paludisme côtier lagunaire : cas d'un village construit sur un lac d'eau saumâtre. *Ann Soc Belge Med Trop*. 1995;75:219–27.
 60. Nevill EM, Anderson D. Host preferences of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in South Africa as determined by precipitin tests and light trap catches. *Onderstepoort J Vet Res*. 1972;39(3):147–52.
 61. Meiswinkel R, Baylis M, Labuschagne K. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bull Entomol Res*. 2000;90:509–15.
 62. Viennet E, Garros C, Lancelot R, Allene X, Gardes L, Rakotoarivony I, et al. Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasites Vectors*. 2011;4:119.
 63. Scheffer EG, Venter GJ, Labuschagne K, Page PC, Mullens BA, MacLachlan NJ, et al. Comparison of two trapping methods for *Culicoides* biting midges and determination of African horse sickness virus prevalence in midge populations at Onderstepoort, South Africa. *Vet Parasitol*. 2012;185:265–73.

Circadian activity of *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vector of bluetongue and African horse sickness viruses in the Niayes area, Senegal

Moussa Fall^{1,2} · Assane G. Fall¹ · Momar T. Seck¹ · Jérémy Bouyer^{1,3,4} · Maryam Diarra¹ · Thomas Balenghien^{3,4} · Claire Garros^{3,4} · Mame T. Bakhom¹ · Ousmane Faye² · Thierry Baldet^{1,3,4} · Geoffrey Gimonneau^{1,3,4}

Received: 31 March 2015 / Accepted: 6 May 2015

© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are important vectors of arboviruses in Africa. *Culicoides oxystoma* has been recently recorded in the Niayes region of Senegal (West Africa) and its high abundance on horses suggests a potential implication in the transmission of the African horse sickness virus in this region. This species is also suspected to transmit bluetongue virus to imported breeds of sheep. Little information is available on the biology and ecology of *Culicoides* in Africa. Therefore, understanding the circadian host-seeking activity of this putative vector is of primary importance to assess the risk of the transmission of *Culicoides*-borne pathogens. To achieve this objective, midges were collected using a sheep-baited trap over two consecutive 24-h periods during four seasons in 2012. A total of 441 *Culicoides*, belonging to nine species including 418 (94.8 %) specimens of *C. oxystoma*, were collected.

C. oxystoma presented a bimodal circadian host-seeking activity at sunrise and sunset in July and was active 3 h after sunrise in April. Daily activity appeared mainly related to time periods. Morning activity increased with the increasing temperature up to about 27 °C and then decreased with the decreasing humidity, suggesting thermal limits for *C. oxystoma* activity. Evening activity increased with the increasing humidity and the decreasing temperature, comprised between 20 and 27 °C according to seasons. Interestingly, males were more abundant in our sampling sessions, with similar activity periods than females, suggesting potential animal host implication in the facilitation of reproduction. Finally, the low number of *C. oxystoma* collected render practical vector-control recommendations difficult to provide and highlight the lack of knowledge on the bio-ecology of this species of veterinary interest.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00436-015-4534-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Geoffrey Gimonneau
geoffrey.gimonneau@cirad.fr

¹ Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, Route du Front de Terre, BP 2057, Dakar, Senegal

² Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005, Dakar, Senegal

³ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, F34398 Montpellier, France

⁴ Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 1309, Montpellier, France

Keywords *Culicoides oxystoma* · Host-seeking activity · Animal-baited trap · African horse sickness · Bluetongue · Senegal

Introduction

Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are small hematophagous insects particularly known for their veterinary importance. Females of several species are implicated in the transmission of viruses, affecting wild and domestic animals worldwide (Mellor et al. 2000). African horse sickness (AHS) is one of the most important and lethal infectious diseases endemic in sub-Saharan Africa affecting equids leading to high mortality rates in susceptible horses (>90 %). Bluetongue (BT) is also an important livestock disease affecting ruminants (Mehlhorn et al. 2007) with a particular concern in

sub-Saharan Africa for imported breeds of sheep (Curasson 1925). Although the local sheep breeds in Senegal do not seem to express clinical signs of BT infection, seroprevalence rates remains high among sheep and goats (Lefèvre and Taylor 1983) and the importance of BT for local ruminants remains poorly understand. Moreover, there is little information in West Africa about the biology and ecology of *Culicoides* species, especially those involved in the transmission of AHS and BT viruses. This information is crucial to design and implement vector control strategies, particularly important when safe and efficient vaccines against AHS and BT are not available.

In 2007, an outbreak of AHS virus occurred in Senegal and caused 1169 horse deaths leading to considerable economic losses, estimated to 1.4 million € (Akakpo et al. 2011). Thus, many studies were initiated in the Niayes region of Senegal, particularly affected by the AHS outbreak, to better understand *Culicoides* diversity and their role in the transmission of AHS and BT viruses. These studies identified for the first time *Culicoides oxystoma* Kieffer, 1910 in the Afrotropical region (Bakhoun et al. 2013). This species is abundant in the Niayes area and presents a very aggressive behavior on horses (Diarra et al. 2014; Fall et al. 2015). Although *C. oxystoma* implication in the transmission of AHS and BT viruses in Senegal has never been established (Diarra et al. 2014; Fall et al. 2015), this species is known to be involved in the transmission of bovine arboviruses such as Akabane virus in Japan (Kurogi et al. 1987; Yanase et al. 2005). Furthermore, *C. oxystoma* is a suspected vector of epizootic hemorrhagic disease virus in Israel (Morag et al. 2012) and a potential vector of the bluetongue virus in India (Dadawala et al. 2012). However, there is little information on the biology and ecology of this putative vector, including the description of circadian host-seeking activity, which could have practical implications to allow the development of operational methods for controlling populations of these midges in the field.

Little is known on the host-seeking activity of most Afrotropical *Culicoides* species; on the contrary, some studies have been carried out on Palearctic and Afro-Asiatic species (Mellor et al. 2000). *Culicoides* are mostly crepuscular. For instance, *Culicoides kingi* Austen, 1912 displays two biting peaks: one after sunrise and the other close to sunset (Auriault 1977; El Sinnary et al. 1985; Service 1969). Other species could be active throughout the night, such as reported for *Culicoides venustus* Hoffman, 1925 (Schmidtman et al. 1980) and *Culicoides distinctipennis* Austen, 1912 (Itoua et al. 1987). Flight activity of midges depends on environmental conditions according to seasons. Indeed, Viennet et al. (2012) highlighted a shift in *Culicoides obsoletus* Meigen, 1818 peak activity from before sunset in spring and autumn to after sunset in summer. These information are crucial to implement vector control strategies such as stabling animals at night to reduce bites by nocturnal vectors (Carpenter et al.

2008). In this context, this study aims to describe the circadian host-seeking activity of *C. oxystoma* according to abiotic conditions observed during four seasons in Senegal.

Material and methods

Study area

The entomological survey was conducted at the Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires (LNERV) of the Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Hann, Dakar (decimal geographical coordinates: 14.722969, -17.434227). The laboratory is located close to the “Park de Hann,” a forested and swampy area of 0.6 km² inside the urban agglomeration of Dakar, the capital of Senegal. A zoo with approximately 32 different animal species and a horse farm affected by the last epizootic outbreak of AHS in 2007 are located at 200 m and 1 km inside the park, respectively. Rainfall rarely exceeds 500 mm/year with a rainy season ranging from July to October. The dry season (from November to June) can be subdivided into a cold dry season (from November to February) and a warm dry season (from March to June). Ocean vicinity is conducive to a high relative moisture rate ranging from 15 to 90 %, depending on the time of year. The presence and high abundance of *C. oxystoma* in this area have recently been documented (Diarra et al. 2014; Fall et al. 2015).

Host-baited trap collections

Culicoides were collected with a sheep-baited trap (animal weight, 30–35 kg) (Fall et al. 2015). Briefly, the sheep-baited trap was a net box (3.5×2.5×2.5 m, with mesh of 1.5×0.3 mm) with an open space of 15 cm from the ground on each four sides of the trap allowing *Culicoides* to enter in the trap, to engorge or not on the sheep, and avoiding their escape (see Fall et al. 2015 for picture). The sheep was caged in the middle of the trap. The trap was operated during two consecutive periods of 24 h (from 12 p.m. to 12 p.m. the next day) in four different seasons in 2012 and collections were conducted every 3 h (at 12, 15, 18, 21, 0, 3, 6, and 9 o'clock) leading to eight collections per 24-h session. Insects inside the trap were collected with an electric aspirator for 10 to 15 min along the net (not directly on the sheep), which was dropped on the ground during this process. Two collection sessions were carried out during the cold and hot dry season (January and April) and two at the beginning and end of the rainy season (July and October). During experiments, air temperature and relative humidity were recorded every 15 min (thermo-hygrometer HOBO; Onset, Pocasset, MA).

Culicoides identification

After sampling sessions, collection cups were placed at -20°C for 10 min to kill insects. *Culicoides* were identified under a stereomicroscope (Zeiss, Stemi DV4) using the morphological keys for the Afrotropical region (Boorman 1979; Boorman and Dipeolu 1979; Cornet and Brunhes 1994; Cornet et al. 1974; Glick 1990; Meiswinkel 1989; Meiswinkel 1991). When needed, specimens were dissected and slide-mounted in accordance with the Wirth and Marston technique (1968). *Culicoides* were counted by species and sex, and females were categorized as nulliparous or parous (Dyce 1969), engorged or not, and gravid or not. Samples were stored in Eppendorf tubes with 90° alcohol.

Statistical analysis

To perform graphical presentation of the results and statistical analysis, the collection results obtained in each of the 3-h duration period were attributed to the median time (i.e., 1:30, 4:30, 7:30, 10:30, 13:30, 16:30, 19:30, 22:30) and associated to average temperature and relative humidity of the same collection periods. Abundance of *C. oxystoma* was modeled using a beta-binomial generalized linear model. We used the temperature, humidity, collection time, and all interactions in the complete model. The best model was selected on the basis of the lowest corrected Akaike information criterion (AICc), and the significance of fixed effects was tested using the likelihood test ratio. We also checked that models fitted the data using a test of goodness-of-fit. All the statistical analyses were conducted using the R software v.3.0.2 (R_Development_Core_Team 2009), with the aods3 package for the beta-binomial generalized linear model and the MuMin package for the implementation of the AICc.

Results

A total of 441 individuals belonging to nine species were collected (Table 1) over eight 24-h collection sessions (two per season). *C. oxystoma* represented 94.8 % (418 specimens) of the total collections. Males were more abundant than females accounting respectively for 302 (72.2 %) and 116 (27.8 %) individuals. According to season, this higher ratio for males was observed in April (79.7 %) and July (59.8 %) whereas females were more abundant in January (80 %; but only four females were then collected) and October (61.5 %). *C. oxystoma* was collected throughout the four sampling periods. Maximum abundance was observed in April (hot dry season) with 300 individuals collected, and the minimum abundance was in January (cold dry season) with only five individuals caught. For each collection session, approximately half of the caught females were engorged (50, 42.6, and

48.6 % in January, April, and July, respectively) except in October where all females were blood-fed. Gravid females were more abundant in April (47.5 %) and nulliparous females in July (28.6 %).

The circadian host-seeking activity was similar through seasons (Fig. 1), except in October, with a bimodal pattern of host-seeking activity with peaks at sunrise and sunset, although specific differences in amplitude and time were highlighted. Indeed, the time of the activity peaks depended on the season. In April, morning peak activity occurred at least 3 h after sunrise whereas it occurred around sunrise in July and was absent in October. A bimodal activity was also observed in January (Fig. 1), but the number of collected specimens was too low to allow statement about peak activity (Table 1). Evening activity was relatively similar among seasons and took place around sunset.

During the dry season, mean daily temperatures observed in January and April were quite similar: 23.5°C ($17.9\text{--}32.6$) and 22.8°C ($18.5\text{--}33.2$), respectively, but humidity rate was higher in April with 71.6 % ($38.2\text{--}94.6$) than in January with 58.4 % ($17.4\text{--}87.8$). Mean temperatures increased thereafter in July: 28°C ($24.8\text{--}34.1$) with a maximum observed at the end of the rainy season in October with 30.8°C ($24.4\text{--}44.2$). Despite high variations of relative humidity recorded during trap collections in July and October ($57.5\text{--}94.1$ and $28.7\text{--}98.8$ %, respectively), the average values of the daily humidity were similar in both collection periods (see additional table 1 for range value per collection session). Although differences in temperatures were observed during the four sampling periods, morning peaks activities always occurs around 27°C whereas it varied between 20°C (April) and 27°C (July and October) at the sunset according to seasons. However, in January, collections were positive in the morning at temperature around 27°C and after the sunset around 20°C , but in both cases very few individuals were collected (Table 1). Humidity was variable according to season, but decreasing the morning and increasing the afternoon.

The numbers of male and female collected over the year were strongly correlated (Pearson's correlation test, $r=0.897$, $P<0.001$) indicating a similar pattern of activity (Fig. 1). According to this result, male and female abundance data were pooled in the model in order to gain power. The highest activity was observed at sunrise and sunset (Fig. 1) with significant effects of temperature (Z value= 3.685 , $P<0.001$) and humidity (Z value= -2.223 , $P=0.026$). Overall, morning activity was related to temperature increase and humidity decreases whereas the reverse was observed in the evening. However, the time period was much more important than these two effects, with the lowest activity observed between 15 and 18 h (median of 16:30, with a significantly lower activity than all other time periods; Fig. 1).

Table 1 Numbers of *Culicoides* collected over two consecutive 24-h periods during four seasons in 2012 using a sheep-baited trap in the Niayes area, Senegal

Species	January						April						July						October											
	Female						Male						Female						Male											
	Go			P			Gr			N			Total			Go			P			Gr			N			Total		
	Go	Gr	P	N	Total	Total	Go	Gr	P	N	Total	Total	Go	Gr	P	N	Total	Total	Go	Gr	P	N	Total	Total	Go	Gr	P	N	Total	Total
<i>C. oxystoma</i> (Kieffer, 1910)	2	1	0	1	4	1	26	29	4	2	61	239	17	6	2	10	35	52	16	0	0	0	0	16	0	0	0	0	16	10
<i>C. distinctipennis</i> (Austen, 1912)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. imicola</i> (Kieffer, 1913)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	1
<i>C. austeni</i> (Carter, 1920)	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. nivosus</i> (De Meillon, 1937)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. moreli</i> (Clastrier, 1959)	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>C. similis</i> (Carter, 1921)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. leucostictus</i> (Kieffer, 1911)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. murphyi</i> (Clastrier & Wirth, 1961)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Go gorged, Gr gravid, P parous, N nulliparous

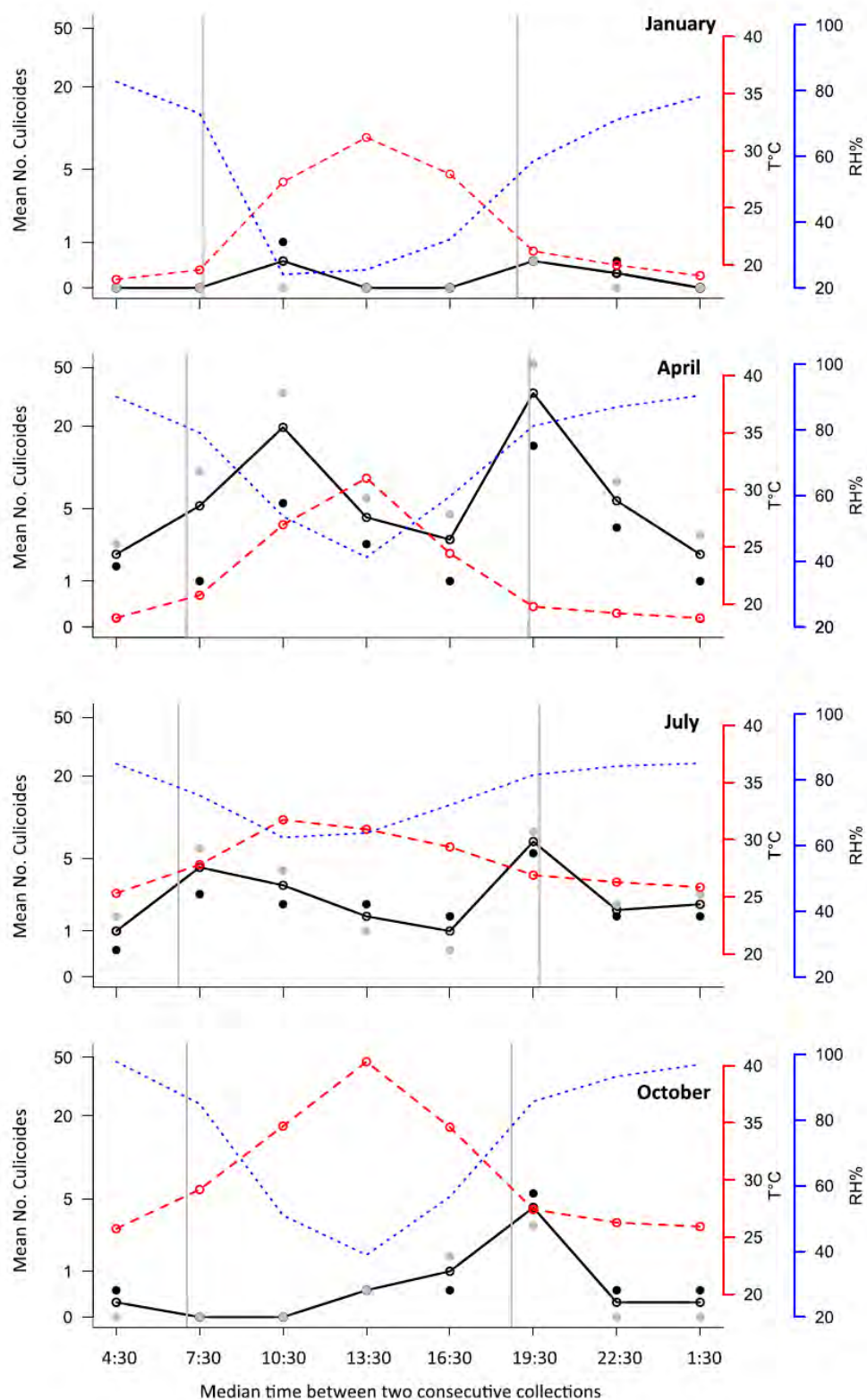
Discussion

This study presents the first data on circadian activity of *C. oxystoma* during different seasons, a newly recorded species for Senegal (Bakhoum et al. 2013) and a putative vector of AHS and BT viruses in the Niayes region of Senegal (Diarra et al. 2014; Fall et al. 2015). Although this species was collected throughout the four sampling periods, maximum abundances were observed in hot dry season and at the beginning of the rainy season. Circadian bimodal activity at an animal host was observed around sunset and sunrise with a similar activity pattern between males and females and abiotic parameters, temperature, and humidity having significant effects on midge activity.

The bimodal activity observed for *C. oxystoma* (around sunset and sunrise) has been described for *Culicoides* species in the Afrotropical region (Auriault 1977; El Sinnary et al. 1985) and the lower activity during daylight has been attributed to abiotic parameters. Flight activity is influenced by meteorological parameters such as variation in light intensity, temperature, and humidity, which are closely correlated (Auriault 1977; El Sinnary et al. 1985; Tsutsui et al. 2011; Zimmer 2007). Indeed, Blackwell (1997) highlighted that *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, 1920 activity is positively correlated to both relative humidity and rainfall and presents negative relationships with wind velocity. Temperatures above and below certain limits restrict *Culicoides* activity (Auriault 1977; Zimmer et al. 2008) and the 3-h shift in morning activity of *C. oxystoma* in July is probably due to the high increase in temperature during this season. Indeed, morning collections in January, as well as morning peak activity in April and July occurred around 27 °C. Beyond this temperature, flight activity decreases, suggesting thermal limits for *C. oxystoma* activity. In the same time, humidity was always decreasing during these morning activity periods. The absence of morning peak activity in October was probably due to high temperature (the hottest month of the year) early in the morning but also other parameters like wind speed (not recorded in this study), which could disrupt the odor flows emanating from the host or reduce flight activity (Walker 1977). Although variable between seasons in amplitude, flight activity was always more pronounced at sunset as for other *Culicoides* species in the Afrotropical region and seemed always limited between 20 and 27 °C and related to a humidity rate of over 80 % (Auriault 1977; El Sinnary et al. 1985; Walker 1977).

The close association found between male and female *C. oxystoma* activity is intriguing. To our knowledge, this is the first time that males are so abundantly collected using an animal-baited trap. Rawlings et al. (1998) captured more males than females at dry season using light trap in Gambia. However, this result is unusual and males are rarely caught in light trap collections. The relative high abundance of males may be the result of trap position, set up between trees to avoid direct animal exposure to the sun. Indeed, it has been

Fig. 1 Circadian activity of *Culicoides oxystoma* through four seasons of 2012 using a sheep-baited trap in the Niayes area, Senegal. Legend: *black lines*—the mean number of collected specimens (log 10 scale), *gray dots*—the mean number of males, *black dots*—the mean number of females, *red dashed lines*—average temperatures (°C), *blue dashed lines*—average relative humidity (%). Gray vertical bars represent sunrise and sunset time



highlighted that *Culicoides* are generally found during day-time in shaded vegetated areas and/or the underside of leaves (Zimmer 2007). Moreover, males are nectar and pollen feeder

and rest preferentially in shrubs or trees (Zimmer et al. 2008). It could also be suggested that male abundance is in relation to the ongoing reproductive status of the population (i.e.,

emergence of a new generation). Indeed, as in many dipterans, the abundance of males in certain periods indicates the ongoing emergence of a new generation of adults (Downes 1969), as males usually emerge a little bit earlier than females, being ready for mating as soon as females emerge. However, few nulliparous females were collected for each collection session and approximately half of the caught females were engorged preventing reproductive status determination. Another hypothesis could be related to *C. oxystoma* mating behavior. There is not much information on *Culicoides* mating behavior (Campbell and Kettle 1979; Gerry and Mullens 1998; Zimmer et al. 2008). Campbell and Kettle (1979) described *Culicoides brevitarsis* Kieffer, 1917 mating behavior indicating that males and females swarms and mates around ecological markers such as shadows cast by clumps of living grass slightly elevated or near to cattle (<10 m). Observations of mating behavior near and on a host calf were made at a nearby dairy for *Culicoides sonorensis* Wirth & Jones, 1957 (Gerry and Mullens 1998). Males swarmed 1–2 m downwind of a restrained calf and 0.3–1.0 m above ground level. Males were also observed coupled with blood-feeding females on the calf venter (especially umbilicus and teats). Swarming reproductive behavior has been well described for many Diptera species (Downes 1969). Mating occurs in and around swarms of numerous males that form at specific sites at sunset and last for about 20 min. Females typically approach a swarm, acquire a mate, and leave in copula. This typical swarming reproductive behavior could explain the high abundance of males collected in our study. Although no specific studies have been conducted on *C. oxystoma* mating behavior, our results suggest that the animal host could also be a “swarm marker” in the reproduction of this species according to its shape and/or odor litter. Because our sampling collections were not directly conducted on the host, it could not be excluded that *C. oxystoma* mate on the host (Gerry and Mullens 1998). Further studies are needed to better understand the reproductive behavior of this species.

Overall, the total number of *Culicoides* collected during present study seems lower than previous studies performed in the same area (Diarra et al. 2014; Fall et al. 2015). In our study, a sheep-baited trap was preferred to an UV-light/suction trap because the latter misestimate the biting rate and/or attack rate on a host animal (Viennet et al. 2011). Moreover, a specific shortcoming of the UV-light/suction trap is that it is able only to monitor *Culicoides* that are active nocturnally (being unable to attract and collect species which are active diurnally). Diurnal livestock attack rates need to be quantified as they have implications for the transmission of BT and AHS viruses. There is no information on *C. oxystoma* host preference, and we could suggest that sheep is not the preferential host of this putative vector species explaining why relatively few individuals were collected. Moreover, other potential hosts present in the vicinity such as mammals inside the zoo (200 m) and horses (1 km) may have contributed to the low collection rate of *C. oxystoma*

but also other *Culicoides* species. Overall, our result highlights that *C. oxystoma* host-seeking and blood-feeding activity mainly occurred at sunrise and sunset and to a lesser extent during the day. This behavioral activity has implication in the protection of valuable animals in Senegal such as horse and imported breeds of sheep. Indeed, in order to reduce host/vector contacts, animals could be sheltered before sunset and release after sunrise as it has been proposed to protect horses from AHS vectors such as *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 in South Africa (Meiswinkel et al. 2000). However, the effectiveness of this measure to limit their risk to be bitten by *C. oxystoma* and then to be infected by *Culicoides*-borne pathogens is highly dependent in the degree of endophagy and exophagy of this species. However, there is no information on *C. oxystoma* endo-/exophagy behavior which renders practical vector-control recommendations difficult to provide.

This study represents the first data on *C. oxystoma* circadian activity, which demonstrated a bimodal activity at sunset and sunrise as described for other species. Although *C. oxystoma* exhibits mainly a crepuscular activity, its ability to be active after the sunrise in optimal temperature and humidity conditions makes us question the possibility of a daytime transmission of BT virus to sheep and AHS virus to horses. These results show that we should not only be limited to develop tools and methods to protect the animals at night but also during the day, especially at sunrise and sunset. The high presence of males in collections, the strong correlation of their daily activity pattern to females, and the overall low number of specimens collected highlight the lack of knowledge on the bio-ecology (i.e., mating and host preference behaviors) of this important species. Further research is needed to gain a better understanding of the bio-ecology of this species and its role as potential vector of AHS and BT viruses in Senegal.

Acknowledgements This study was partly funded from the EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. This paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext 249 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Compliance with ethical standards All investigations comply with the current laws of the countries in which they were performed. All handling of animals was done by veterinary staff trained and experienced following usual conditions of animal welfare.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' contributions MF, TBt, AGF, MTS, and JB designed and supervised the study. MF and AGF performed the sampling and global management of the entomological material. MF performed the species identification. MTB and MD participated in field and laboratory activities. GG, JB, and TBn analyzed the data. MF, AGF, TBt, JB, CG, OF, TBn, and GG wrote the first draft of the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Akakpo AJ, Wombou Toukam CM, Mankor A, Ly C (2011) Impact économique de l'épizootie de peste équine de 2007 au Sénégal. *Bull Anim Health Prod Afr* 59:1–16
- Auriault M (1977) Contribution à l'étude biologique et écologique de *Culicoides grahamii* (Austen), 1909, (Diptera, Ceratopogonidae) I. Rythme d'activité des femelles. *Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol* 15:171–176
- Bakhoun 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
- Blackwell A (1997) Diel flight periodicity of the biting midge *Culicoides impunctatus* and the effects of meteorological conditions. *Med Vet Entomol* 11:361–367
- Boorman J (1979) *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna Saudi Arab* 10:160–224
- Boorman J, Dipeolu OO (1979) A taxonomic study of adult Nigerian *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species. *Occ Publ Ent Soc Nigeria* 22:1–121
- Campbell MM, Kettle DS (1979) Swarming of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with reference to markers, swarm size, proximity of cattle, and weather. *Aust J Zool* 27:17–30
- Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ (2008) Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. *Med Vet Entomol* 22:175–187
- Cornet M, Brunhes J (1994) Révision des espèces de *Culicoides* apparentées à *C. shultzei* (Enderleini, 1908) dans la région afro-tropicale (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull Soc Entomol Fr* 92: 149–164
- Cornet M, Nevill EM, Walker AR (1974) Notes sur les *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), du groupe de *C. milnei* Auten, 1909, en Afrique orientale et australe. *Cah ORSTOM Ser Entomol Med Parasitol* 12:231–243
- Curasson G (1925) Introduction de la bluetongue en Afrique Occidentale Française. *Bull Soc Pathol Exot Fil* 18:235–238
- Dadawala AI et al (2012) Isolation of bluetongue virus serotype 1 from *Culicoides* vector captured in livestock farms and sequence analysis of the viral genome segment-2. *Transbound Emerg Dis* 59:361–368
- Diarra M et al (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
- Downes JA (1969) The swarming and mating flight of Diptera. *Annu Rev Entomol* 14:271–298
- Dyce AL (1969) The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *J Aust Entomol Soc* 8:11–15
- El Sinnary KA, Muller R, Atta El Mannan A, Hussein SH (1985) The diurnal activity of *Culicoides kingi* in northern Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 38:270–275
- Fall M et al (2015) *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) midges, the vectors of African horse sickness virus—a host/vector contact study in the Niayes area of Senegal. *Parasit Vectors* 8:39
- Gerry AC, Mullens BA (1998) Response of male *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) to carbon dioxide and observations of mating behavior on and near cattle. *J Med Entomol* 35: 239–244
- Glick JJ (1990) *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *J Med Entomol* 27:85–195
- Itoua A, Cornet M, Vattier-Bernard G, Trouillet J (1987) The *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of Central Africa. *Cah ORSTOM Ser Ent Med Parasitol* 127–134
- Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, Matumoto M (1987) Isolation of Akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Vet Microbiol* 15:243–248
- Lefèvre PC, Taylor WP (1983) Situation épidémiologique de la fièvre catarrhale ovine (bluetongue) au Sénégal. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 36:241–245
- Mehlhorn H et al (2007) First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol Res* 101:219–228
- 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 (1991) Afrotropical *Culicoides*: *C. (avaritia) miombo* sp. nov., a widespread species closely allied to *C. (a.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Onderstepoort J Vet Res* 58:155–170
- Meiswinkel R, Baylis M, Labuschagne K (2000) Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bull Entomol Res* 90(6):509–515
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45:307–340
- Morag N, Saroya Y, Braverman Y, Klement E, Gottlieb Y (2012) Molecular identification, phylogenetic status, and geographic distribution of *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *PLoS ONE* 7, e33610
- R_Development_Core_Team (2009) R: a language and environment for statistical computing
- Rawlings P, Snow WF, Boorman J, Denison E, Hamblin C, Mellor PS (1998) *Culicoides* in relation to transmission of African horse sickness virus in the Gambia. *Med Vet Entomol* 12:155–159
- Schmidtman ET, Valla ME, Abend JA (1980) Nocturnal blood-feeding from pastured calves by the Ceratopogonid midge, *Culicoides venustus*, in New York state. *Mosq News* 40:571–577
- Service MW (1969) Studies on the biting habits of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, *C. obsoletus* (Meigen) and *C. punctatus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) in Southern England. *Proc Entomol Soc Land* 44:1–10
- Tsutsui T, Hayama Y, Yamakawa M, Shirafuji H, Yanase T (2011) Flight behavior of adult *Culicoides oxystoma* and *Culicoides maculatus* under different temperatures in the laboratory. *Parasitol Res* 108: 1575–1578
- Viennet E et al (2011) Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasit Vectors* 4:119
- Viennet E et al (2012) Host-seeking activity of bluetongue virus vectors: endo/exophagy and circadian rhythm of *Culicoides* in Western Europe. *PLoS ONE* 7, e48120
- Walker AR (1977) Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. *Bull Entomol Res* 67:217–233
- Wirth W, Marston N (1968) A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Ann Entomol Soc Am* 61:783–784

- Yanase T et al (2005) Isolation of bovine Arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985–2002. *J Med Entomol* 42:63–67
- Zimmer JY (2007) Contribution à l'étude écologique des larves du genre *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae), comprenant les espèces vectrices de la fièvre catarrhale ovine (Bluetongue). Travail de fin d'études (option Nature, Eaux et Forêts), Faculté universitaire des Sciences agronomiques
- Zimmer JY, Losson B, Haubruge E (2008) Biologie et écologie des *Culicoides* (Diptera), vecteurs de la fièvre catarrhale ovine. *Entomolo Faunistique* 61:53–57



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Host preferences and circadian rhythm of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in Senegal



Moussa Fall^{a,c,*}, Assane G. Fall^a, Momar T. Seck^a, Jérémy Bouyer^{a,b,d,e,f}, Maryam Diarra^a, Renaud Lancelot^b, Geoffrey Gimonneau^{a,b}, Claire Garros^b, Mame T. Bakhoun^a, Ousmane Faye^c, Thierry Baldet^b, Thomas Balenghien^b

^a Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, BP 2057 Dakar, Hann, Senegal

^b Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, F34398, Montpellier, France

^c Faculté des Sciences et Techniques, Département de Biologie Animale, Cheikh Anta Diop University, Dakar BP 5005, Senegal

^d Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 1309, Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, 34398 Montpellier, France

^e Pan-African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign, 01 BP 1087 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

^f Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité Mixte de Recherche 'Interactions hôtes-vecteurs-parasites-environnement dans les maladies tropicales négligées dues aux trypanosomatidés', 34398 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2015

Received in revised form 10 June 2015

Accepted 12 June 2015

Available online 19 June 2015

Keywords:

Culicoides

Orbivirus transmission

Host-feeding pattern

Diel host-seeking activity

Thiès (Senegal)

ABSTRACT

African horse sickness- and bluetongue virus are orbiviruses transmitted by *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) to horses and to ruminants, respectively. Since the last epizootic outbreak of African horse sickness in 2007 in Senegal, extensive investigations have been undertaken to improve our knowledge on *Culicoides* species involved locally in the transmission of the virus. The purpose of this study was to compare and quantify the host preferences of potential vectors of these orbiviruses on horse and sheep and to study their circadian rhythm. We found that *Culicoides oxystoma* and species of the subgenus *Avaritia* (*Culicoides imicola*, *Culicoides bolitinos* and *Culicoides pseudopallidipennis*) had a preference for horse when compared to sheep (the predicted ratio between horse and sheep was 80 for *C. oxystoma* and 26 for *C. imicola*), and were mostly crepuscular: *C. oxystoma* had continuous activity throughout the diel with peaks in numbers collected after sunrise and sunset, while *C. imicola* was mostly nocturnal with peak after sunset. Unexpectedly, species of the subgenus *Lasiohelea* was also collected during this study. This diurnal biting species was a nuisance pest for both animal species used as bait.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

African horse sickness (AHS) and bluetongue (BT) are endemic diseases in West Africa; caused by Orbiviruses (*Reoviridae*) transmitted by small hematophagous insects of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). In southern Africa, *Culicoides imicola* Kieffer and *Culicoides bolitinos* Meiswinkel are proven vectors of African horse sickness virus (AHSV) (Venter et al., 1999, 2000; Meiswinkel and Paweska, 2003) and of bluetongue virus (BTV) (Rawlings et al., 1997; Venter et al., 2000; Mellor and Hamblin,

2004). Little is known about the biology and ecology of *Culicoides* species in West Africa, in particular those involved in the transmission of AHS and BT, which impedes the development of efficient vector control methods.

Culicoides oxystoma Kieffer was detected for the first time in Senegal in 2011 (Bakhoun et al., 2013). This species is abundant in light-traps in the Niayes area (Diarra et al., 2014), a region particularly affected by the previous epizootic outbreak of AHS in 2007; it is also aggressive towards horses (Fall et al., 2015). Furthermore, these studies collected up to 41 *Culicoides* species (this increased the number of described *Culicoides* species found in Senegal from 34 to 53) and highlighted that *Culicoides kingi* Austen reaches abundances on horse equivalent to those of *C. imicola*. It may be that *C. oxystoma* and *C. kingi* also contribute to the transmission of the AHSV in Senegal, and more broadly in West Africa (Fall et al., 2015).

* Corresponding author at: ISRA-LNERV, Route du Front de Terre, BP 2057 Dakar-Hann, Sénégal. Fax: +221 33 832 3679.

E-mail address: moussafall08@yahoo.fr (M. Fall).

Culicoides oxystoma has been reported as a putative vector for BTV in northern India (Prasad et al., 1999), as involved in the transmission of bovine arboviruses such as Akabane virus in Japan (Kurogi et al., 1987; Yanase et al., 2005) and is suspected of transmitting the epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) in Israel (Morag et al., 2012). *Culicoides kingi* has been found in the field to be infected by EHDV in Sudan (Mellor et al., 1984).

Outside of South Africa, little research has been conducted on the biology and ecology of the African species of the genus *Culicoides*. The only in-depth investigations were conducted in Cameroon (Nicholas, 1953), Gabon (Auriault, 1977) and Congo (Vattier-Bernard et al., 1986; Itoua et al., 1987) and primarily related to *Culicoides grahamii* Austen. This species is anthropophilic and its peak feeding activity occurs at sunrise and sunset, causing a nuisance to humans in some areas and during abundance seasons. However, most *Culicoides* species studied in Central Africa are zoo-anthropophilic in their feeding behaviour, e.g., *Culicoides kumbaensis* Callot, Kremer, Mouchet and Bach, *Culicoides fulvithorax* Austen, *Culicoides dubitatus* Kremer, Rebholtz-Hirtzel and Delécolle and *Culicoides trifasciellus* Goetghebuer (Itoua et al., 1987). Outside southern Africa, the only African species of veterinary significance studied so far are *C. kingi* in Sudan which displays two biting peaks: one after sunrise and the other close to sunset (El Sinnary et al., 1985).

This illustrates how fragmentary current data about the life history and ecology of *Culicoides* is in Africa. The present study describes host preferences, as key elements in the transmission of arboviruses, of *Culicoides* that are potential vectors of the AHSV and BTV in Senegal by comparing their attraction to horse and sheep and determining their circadian rhythm.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study was conducted at the Thiès national stud farm between 29 August and 28 September, 2013 in the middle of the rain season. This stud farm was located in a forested area. This season was selected as optimal for *Culicoides* abundance, and this site was selected because *C. imicola* and *C. oxystoma* were both abundant (Diarra et al., 2014). The city of Thiès is in the Niayes area; it is characterised by depressions between dunes that flooded during the rainy season. These depressions are located from Dakar in the south to the Senegal River Delta in the north. This is an area where commercial garden crops and fruit are intensively grown. Dairy and poultry farms are also found there together with a number of riding centres that accommodate purebred horses. Rainfall rarely exceeds 500 mm/year with a rainy season ranging from July to October. Ocean vicinity is conducive to a high relative moisture rate ranging from 90% to 15%, depending on the distance from the sea and time of year.

2.2. Host-baited trap collections

We compared two hosts on two sites using a Latin-square design. One horse and two sheep were used. No insecticide was applied on animals the year before the start of the experiment. The horse was across-bred English yearling weighing between 110 and 120 kg. The sheep were two ewes of a local breed weighing between 25 and 30 kg each. The baited traps used were identical to that used by Fall et al. (2015). The animal-baited trap consists of a net box (3.5 m × 2.5 m × 2.5 m, with mesh of 1.5 mm × 0.3 mm) with an open space of 15 cm from the ground allowing *Culicoides* to enter, to engorge or not on animal, and avoiding the escape of trapped midges. The traps were placed at two locations separated

by a distance of 150 m (without visual contact between them) to minimise between-trap interactions. Other horses were present in vicinity of the stud farm for pasturage and a cattle herd was grazing at a distance of more than 1000 m.

Collections were conducted in three sessions. During each session, midges were collected every three hours over two periods of 24 h – midges trapped inside the tents were collected for 10–15 min using an electric vacuum cleaner. Each 24-h period was spread over two consecutive days, stretching from midday (day 1) to midday (day 2). The two 24-h periods were separated by a 3-h interval to allow the switch of animals between the two locations. Thus, horse and sheep were exposed during $24 \times 2 \times 3 = 144$ h each.

2.3. *Culicoides* identification

The insects collected were killed by low temperature and identified. Morphological identification of *Culicoides* species relied on an examination of wing patterns under a stereomicroscope (Zeiss, Stemi DV4) using the morphological keys for the Afrotropical region (Boorman and Dipeolu, 1979; Boorman, 1989; Meiswinkel, 1989; Glick, 1990; Meiswinkel, 1991; Cornet and Brunhes, 1994). When needed, specimens were dissected and slide-mounted in accordance with the Wirth and Marston (1968) technique. *Culicoides* were counted by species and sex, and females were categorized as nulliparous or parous (Dyce, 1969), engorged or unengorged, and gravid or not. The specimens were placed in Eppendorf tubes and stored in 90% alcohol.

2.4. Statistical analysis

Abundances on respective hosts were compared by species using the raw data and data adjusted for host weight. Engorgement rates were computed by dividing the number of engorged females by the total number of females collected.

Unadjusted abundance of *Culicoides* species was modelled using a Poisson mixed-effect model fitted with a method providing an adaptive Gauss–Hermite approximation to the maximized log-likelihood. We used the trapping day (1–6) as a random effect, and the location and the host (horse, sheep) as fixed effects. Selection of effects in the abundance model was based on a likelihood ratio test, the confidence intervals for parameters in the fitted model, and the Akaike information criterion (AIC). The procedure proposed by Nakagawa and Schielzeth (2013) was used as an overall test for goodness of fit.

All data analyses were performed using R statistical packages (R Core Team, 2014).

3. Results

Collections were carried out during the rainfall season. Weather was cloudy during the two first collection sessions and sunny during the last session. Temperatures varied from 23.2 to 32.8 °C the first collection session, from 26.4 to 34.8 °C the second session, and from 25.2 to 33.6 °C the third session and humidity varied from 55.1 to 90.6%, from 49.3 to 84.6% and from 47.0 to 85.6% for the three sessions. Intra-session amplitudes of both temperature and humidity were higher (about 9 °C and 37%) than inter-session amplitudes (1–3 °C and 1–9%).

3.1. Host preference

A total of 1259 *Culicoides* specimens were collected, of which 54 were males. In total, 1215 *Culicoides* were collected in the horse-baited trap, i.e., 96.5% of overall collections, vs. 44 in the sheep-baited trap, i.e., 3.5% (Table 1). We identified 11 different species, all of which were found in the horse-baited trap,

Table 1
Number of *Culicoides* collected during the 6 trapping days on horse and sheep baits

Culicoides species	Total					Horse-baited trap								Sheep-baited trap								Ratio horse/total
	Rank	(C%)	F	(P)	M	F	bf F	(bf R)	N	P	G	M	F	bf F	(bf R)	N	P	G	M			
C. oxystoma	1	73.7	881	35.8	47	867	381	43.9	308	176	2	36	14	3	21.4	10	1	0	11	98.4		
C. imicola	2	90.7	212	12.8	2	206	99	48.0	91	14	2	1	6	1	–	4	0	1	1	97.2		
C. bolitinos	3	95.1	55	16.1	0	53	22	41.5	26	4	1	0	2	1	–	0	1	0	0	96.4		
C. pseudopallidipennis	4	97.8	33	5.6	1	32	14	43.8	17	1	0	0	1	1	–	0	0	0	1	97.0		
C. trifasciellus	5	98.7	11	–	0	11	3	–	6	2	1	0	0	–	–	–	–	–	0	–		
C. translucens	6	99.1	4	–	1	1	0	–	0	0	1	1	3	1	–	0	0	2	0	–		
C. nivosus	7	99.4	3	–	1	0	0	–	0	0	0	1	3	2	–	0	0	1	0	–		
C. nigripennis	8	99.7	3	–	1	2	0	–	0	2	0	1	1	0	–	0	0	1	0	–		
C. accraensis	9	99.9	2	–	0	1	0	–	0	0	1	0	1	0	–	0	0	1	0	–		
C. moreli	10	100.0	0	–	1	1	0	–	0	1	0	0	0	–	–	–	–	–	0	–		
C. leucostictus	11	100.0	1	–	0	0	0	–	0	0	0	1	0	–	–	–	–	–	0	–		
Total			1,205	30.4	54	1,174	519	44.2	448	200	7	41	31	9	29.0	14	2	6	13	97.4		

Note (C%): cumulative percentages of abundance; F: number of females; P: parous rate; M: number of males; bfF: number of engorged females; bfR: engorgement percentage; N: number of nulliparous females; P: number of parous females; G: number of gravid females.

while only 8 were found in the sheep-baited trap. *Culicoides oxystoma*, the only representative species of the Schultzei group, was predominant in the collections, with 928 specimens (73.7%). The medium-abundance species belonged to the Imicola group, namely *C. imicola* with 214 specimens (16.9%), *C. bolitinos* with 55 specimens (4.3%) and *Culicoides pseudopallidipennis* Clastrier with 34 specimens (2.7%). Taken together, these 4 species accounted for 97.8% of the *Culicoides* collected (Table 1). The engorgement rate for these species ranged from 40 to 50% on the horse and was 20% on sheep for *C. oxystoma* (Table 1). The other species – *C. trifasciellus*, *Culicoides translucens* Khamala and Kettle, *Culicoides nivosus* De Meillon, *Culicoides nigripennis* Carter, Ingram and Macfie and *Culicoides moreli* Clastrier were uncommon. Finally, *Culicoides accraensis* Carter, Ingram and Macfie and *Culicoides leucostictus* Kieffer were not attracted by the horse and sheep baits and their collection was incidental since only gravid females or males were identified. The *Culicoides* population was relatively young with a nulliparous rate of 70%.

Overall, *Culicoides* numbers were fairly balanced between sites (593 in one site and 600 in the other). The number of females caught varied significantly between trapping sessions. Both the raw and the host weight-adjusted figures were always much greater for the horse than for the sheep-baited trap for *C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos* and *C. pseudopallidipennis* (Fig. 1); from 96 to 98% of females were collected on this host (Table 1).

To predict the abundance of *C. oxystoma* females, we selected the full model with the site and the host as the fixed effects, and the trapping day as the random effect. The conditional R^2 (percentage of

variance explained by both fixed and random effects) was very high (99.6%), whereas the marginal R^2 (percentage of variance explained by fixed effects) was high (marginal $R^2 = 64.6\%$), and mainly (96.0%) explained by the host effect. For the fixed effects, the model predicted a ratio of 80 between females collected on the horse and those collected on the sheep (the horse weighing twice as much as the ewes) and a ratio of 2.5 between the two sites. To predict the abundance of *C. imicola* females, we selected the full model. The conditional R^2 was very high (97.0), whereas the marginal R^2 was high (63.8), and mainly (94.2%) explained by the host effect. For the fixed effect, this model predicted a ratio of 26 between females collected on the horse and those collected on the sheep and a ratio of 2.2 between the two sites.

3.2. Circadian rhythms

Fig. 2 shows the overall abundance of *C. oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos*, and *C. pseudopallidipennis* females over the diel regardless of host. For each species, observed abundances in each trapping session were correlated for nulliparous, parous, gravid and engorged females, thus suggesting that there was no activity difference related to time of day associated with differences in the physiological status of females. *Culicoides oxystoma* was collected at all times, with activity peaks immediately after sunrise, and immediately after sunset. *Culicoides imicola* was nocturnal and its activity peaked just after sunset. The activity of *C. bolitinos* and *C. pseudopallidipennis* peaked just after sunset and sunrise but the low numbers collected renders it difficult to validate this result.

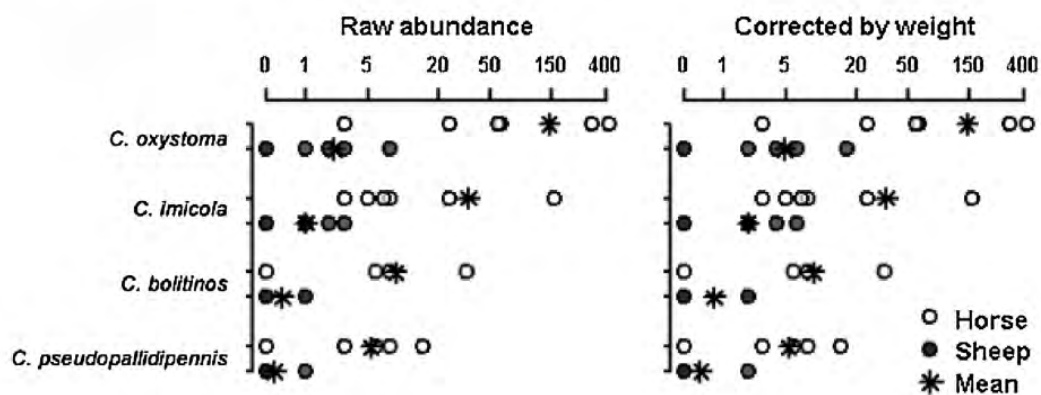


Fig. 1. Raw abundance and host weight-adjusted abundance of *Culicoides oxystoma*, *Culicoides imicola*, *Culicoides bolitinos*, and *Culicoides pseudopallidipennis* females collected on each host. Both plots look quite similar as weight-correction (which is limited as two sheep were used against one horse) was applied on the numbers of *Culicoides* collected on sheep, which were always low.

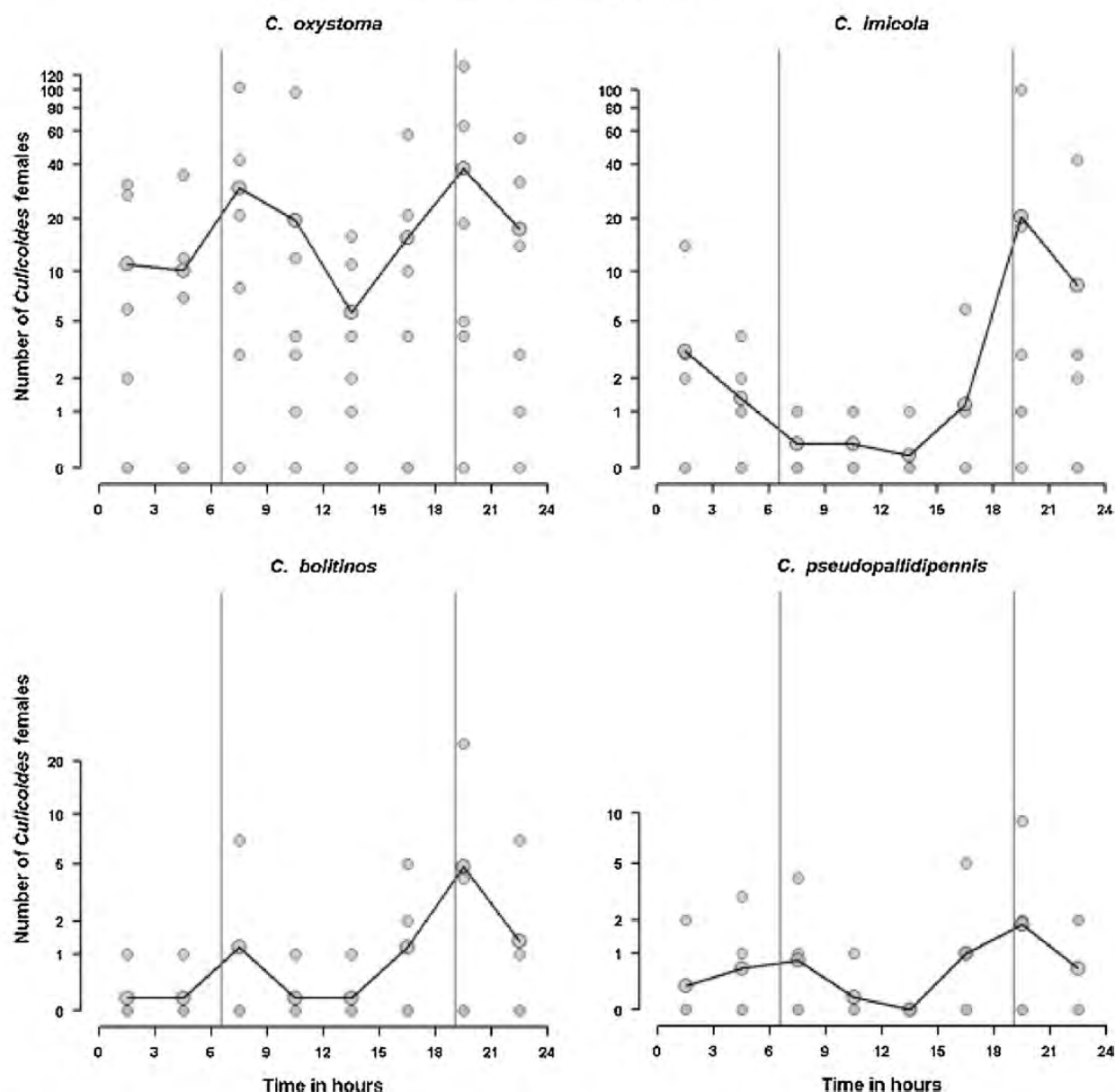


Fig. 2. Circadian activity of female *Culicoides oxystoma*, *C. imicola*, *C. bolitinos*, and *C. pseudopallidipennis*, collected in host-baited traps regardless of the host. The black, broken line represents the average of observations. The vertical grey lines illustrate the time of sunrise and sunset.

Additionally, we identified another Ceratopogonidae species of the *Forcipomyia* genus and of the *Lasiohelea* sub-genus that was remarkably aggressive toward the hosts, particularly the horse. No male was collected and we were unable to identify the specimens to the species level. A total of 735 specimens were collected, 644 of which were found on the horse (87.6%), with an engorgement rate of 80.2%, as compared with 91 specimens collected on the sheep (12.4%), with an engorgement rate of 70.3%. This species of the *Lasiohelea* subgenus was markedly diurnal and its peak of activity is the pre-sunset period (Fig. 3).

4. Discussion

The predominance of *C. oxystoma* and *C. imicola* in UV-light traps and horse-baited traps has previously been reported in the region (Diarra et al., 2014; Fall et al., 2015). This study showed a host preference of *C. oxystoma* and *Culicoides* species from the *Avaritia*

sub-genus for horse as compared to sheep. Similar host preference for horse was found by Viennet et al. (2012) for *Culicoides* species of veterinary significance using host-baited traps in the Palearctic region. The authors did not however reach the conclusion that horse were more attractive than other hosts, or that there was a non-linear relationship between weight and attractiveness (the horse being by far the largest host). In our study, the limited difference in weight between the horse and the sheep suggested that this difference in abundance was connected with greater attractiveness of horse for the 4 most abundant *Culicoides* species collected.

The number of midges collected varied between days. The numbers collected in baited traps depended not only on factors inherent to the host but also on weather conditions. Indeed, Cornet (1969) and Walker (1977) reported that as soon as night temperatures were somewhat higher in the Afro-tropical region, the number of specimens collected by light trap increased. Moreover, it is classically reported that catches in light trap or on human bait were

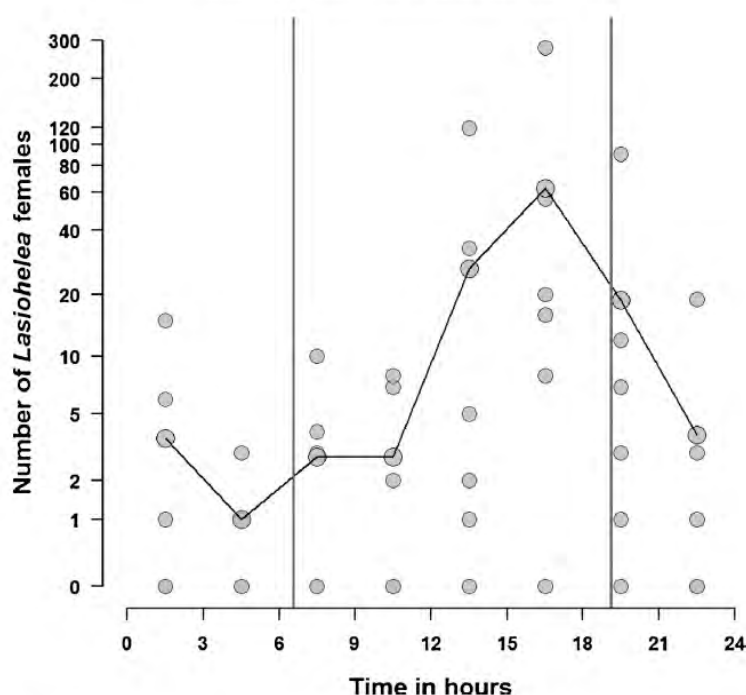


Fig. 3. Circadian activity of females belonging to the unknown of the *Lasiohelea* subgenus, i.e., overall number of females collected in each catch regardless of host. The black, broken line represents the mean of the observations. The vertical grey lines illustrate time of sunrise and sunset.

generally higher on moonless nights in Sub-Saharan Africa (Cornet, 1969; Auriault, 1979; Itoua et al., 1987) and in other regions (Mellor et al., 2000). Host attractiveness to haematophagous insects can be dependent on the size of the host, its body temperature, the carbon dioxide (CO_2) its other specific odours or its color, as it has been highlighted by many studies conducted on mosquitoes (Dow et al., 1957; Edman et al., 1974; Lardeux et al., 2007; Takken and Verhulst, 2013). Wind can also disrupt the odour flows emanating from the host or interfere with insect activity: Almost all activity was suppressed at wind speeds greater than three m/s for *C. imicola* in Kenya (Walker, 1977). Host color does not seem to have any influence on engorgement rate of *Culicoides sanguisuga* Coquillett and *Culicoides guttipennis* Coquillett (Humphreys and Turner, 1973). Carbon dioxide attracted specimens of the *Variipennis* complex in northern America (Nelson, 1965; Mullens, 1995) and *Culicoides impunctatus* Goetghebuer in Scotland (Bhasin et al., 2001). Also, greater host size, corresponding to higher quantity of carbon dioxide released by the host, resulted in greater host attractiveness for *Culicoides* to hosts (Humphreys and Turner, 1973; Tanner and Turner, 1974; Raich et al., 1997).

The predominance of *C. oxystoma* in the horse-baited trap in the Niayes region was in line with observations made by Fall et al. (2015) using the same trap. Interestingly, *Culicoides subschultzei* Cornet and Brunhes was consistently collected in very small numbers in studies on *Culicoides* associated with livestock collected by light trap in southern Africa (Venter et al., 1996; Mushi et al., 1998) and in western Africa (our study) whereas this species was previously considered using light traps as highly abundant in the south and eastern Africa region (Cornet & Brunhes, 1994). This reputation was however based on taxonomic investigations in forested areas, which might explain this apparent mismatch. Scheffer et al. (2012) showed there were no *C. subschultzei* among the insects collected on horses by direct suction in South Africa. *Culicoides oxystoma* is regarded as abundant in light trap collections in the vicinity of livestock in areas where it is present (Oem et al., 2013; Sathesha et al., 2014). Following the detection of *C. oxystoma* in the Afro-

tropical region (Bakhomou et al., 2013) and due to the taxonomic imbroglio pertaining to the Schultzei group (Cornet and Brunhes, 1994), the status of the species in this group needs to be clarified. Further research is needed on host preferences in different ecosystems and different seasons, including in other African countries, to supplement the observations made in this study.

The night-time host seeking activity of *C. imicola* recorded in our study matched previous findings (Barnard, 1997; Meiswinkel et al., 2000). As this species is exophilic, enter horses into closed holdings during the night might protect them from *C. imicola* bites and then against AHSV transmission. *Culicoides bolitinos* and *C. pseudopalidipennis* are also nocturnal. Although *C. bolitinos* does not seem to use horse manure as a larval developing site, it is considered as a vector of AHSV. The presence of cattle near horses may increase the numbers of *C. bolitinos*, and the risk of AHSV being transmitted, in a given area.

Culicoides trifasciellus was only collected in the horse-baited trap. Due to the low numbers collected, no firm conclusions can be drawn as to its feeding patterns. However, this species is undoubtedly zoo-anthropophilic (Itoua et al., 1987). Its taxonomic status is uncertain as for other species such as *C. brosetti* and *C. dubitatus*, the male specimens of *C. dubitatus* being highly characteristic (Kremer et al., 1975). Added to this, no taxonomic keys based on morphological characters are available for these species. It should also be noted that only one *C. nivosus* specimen – a male – was found on the horse whereas 3 females, 2 of which were engorged, were found on sheep. During a previous study performed with a horse-baited trap (Fall et al., 2015), no engorged female of this species was found despite a high abundance in light-trap collections in the area (Diarra et al., 2014).

We observed females belonging to the *Lasiohelea* subgenus to cause major nuisance to the horse and sheep, in particular during the day with pre-sunset peak of activity. No information is available regarding the role of species of this subgenus in virus transmission. In Australia, an undescribed species of day-feeding midge belonging to this subgenus was recently identified as possible vector of

Leishmania enrietti complex to the red kangaroo (*Macropus rufus*) (Dougall et al., 2011). Further research is needed to identify this species and its potential role in Orbivirus transmission. However, due to the pattern of AHSV and BTV outbreaks observed worldwide, it was always accepted that night active insects will play a more important role in Orbivirus transmission.

5. Conclusion

The eco-epidemiological features of *Culicoides* midges populations in the Niayes area of Senegal differs from southern Africa, with the predominance of *C. oxystoma* (vs. *C. imicola*), the attractiveness of horses to this species, its continuous activity (mostly crepuscular), and the lack of information regarding its vector competence for Orbiviruses, notably for the AHSV. Knowledge is too scarce to allow the development of operational methods for controlling populations of these midges in the field (Carpenter et al., 2008). In particular, further research on the larval ecology and resting behaviour of this species would provide relevant information for developing more efficient control methods. Moreover, similar work should be done in other ecosystems in Senegal where other *Culicoides* species – particularly those of the *Avaritia* sub-genus, are more abundant.

Acknowledgments

This study was funded partly from the EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. This paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext322 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References

- Auriault, M., 1977. Contribution à l'étude biologique et écologique de *Culicoides grahamii* (Austen), 1909. (Diptera: Ceratopogonidae) I. Rythme d'activité des femelles. Cahiers ORSTOM Serie Entomol. Méd. Parasitol. 15, 171–176.
- Auriault, M., 1909. Contribution à l'étude biologique et écologique de *Culicoides grahamii* (Austen) 1909. (Diptera: Ceratopogonidae) V-Rythme d'activité en forêt dense. Cahiers ORSTOM Serie Entomol. Méd. Parasitol. 17, 77–79.
- Bakhom, M., Fall, M., Fall, A., Bellis, G., Gottlieb, Y., Labuschagne, K., 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, 1–8.
- Barnard, B.J.H., 1997. Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. Onderstepoort J. Vet. Res. 64, 227–233.
- Bhasin, A., Mordue Luntz, A.J., Mordue, W., 2001. Field studies on efficacy of host odour baits for the biting midge *Culicoides impunctatus* in Scotland. Med. Vet. Entomol. 15, 147–156.
- Boorman, J., 1989. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Arabian peninsula with notes on their medical and veterinary importance. Fauna Saudi Arabia 10, 160–224.
- Boorman, J., Dipeolu, O.O., 1979. A taxonomic study of adult Nigerian *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species. Occ. Publ. Entomol. Soc. Nigeria 22, 1–121.
- Carpenter, S., Mellor, P.S., Torr, S.J., 2008. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U. K. and northwestern Palaeartic. Med. Vet. Entomol. 22, 175–187.
- Cornet, M., 1969. Les *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) de l'Ouest Africain (1ère note). Cahiers ORSTOM Ser. Entomol. Méd. Parasitol. 7, 341–364.
- Cornet, M., Brunhes, J., 1994. Révision des espèces de *Culicoides* apparentées à *C. schultzei* (Enderleini, 1908) dans la région afro-tropicale (Diptera: Ceratopogonidae). Bull. Soc. Entomol. France 92, 149–164.
- Diarra, M., Fall, M., Fall, A., Diop, A., Seck, M., Garros, C., et al., 2014. Seasonal dynamics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges, potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in the Niayes area of Senegal. Parasites Vectors 7, 147.
- Dougall, A.M., Alexander, B., Holt, D.C., Harris, T., Sultan, A.H., Bates, P.A., et al., 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. Int. J. Parasitol. 41, 571–579.
- Dow, R.P., Reeves, W.C., Bellamy, R.E., 1957. Field tests of avian host preference of *Culex tarsalis* Coq. Am. J. Trop. Med. Hyg. 6, 294–303.
- Dyce, A.L., 1969. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. J. Aust. Entomol. Soc. 8, 11–15.
- Edman, J.D., Webber, L.A., Schmid, A.A., 1974. Effect of host defences on the feeding pattern of *Culex nigripalpus* when offered a choice of blood sources. J. Parasitol. 60, 874–883.
- El Sinnary, K.A., Muller, R., Atta El Mannan, A., Hussein, S.H., 1985. The diurnal activity of *Culicoides kingi* in northern Sudan. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux 38, 270–275.
- Fall, M., Diarra, M., Fall, A., Balenghien, T., Seck, M., Bouyer, J., et al., 2015. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) midges, the vectors of African horse sickness virus – a host/vector contact study in the Niayes area of Senegal. Parasites Vectors 8, 39.
- Glick, J.L., 1990. *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. J. Med. Entomol. 27, 85–195.
- Humphreys, J.G., Turner, J.E.C., 1973. Blood-feeding activity of female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). J. Med. Entomol. 10, 79–83.
- Itoua, A., Cornet, M., Vattier-Bernard, G., Trouillet, J., 1987. The *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of Central Africa. Cahiers ORSTOM Ser. Entomol. Méd. Parasitol. 25, 127–134.
- Kremer, M., Rebholtz-Hirtzel, C., Delécolle, J.C., 1975. Description d'une espèce nouvelle *C. dubitatus* n. sp. (Diptera: Ceratopogonidae) de la région éthiopienne. Cahiers ORSTOM Ser. Entomol. Méd. Parasitol. 13, 233–236.
- Kurogi, H., Akiba, K., Inaba, Y., Matumoto, M., 1987. Isolation of Akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. Vet. Microbiol. 15, 243–248.
- Lardeux, F., Loayza, P., Bouchité, B.C., 2007. Host choice and human blood index of *Anopheles pseudopunctipennis* in a village of the Andean valleys of Bolivia. Malaria J. 6, 14.
- Meiswinkel, R., 1913. Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (Avaritia) 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., 1913. Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) miombo* sp. nov., a widespread species closely allied to *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, (Diptera: Ceratopogonidae). Onderstepoort J. Vet. Res. 58, 155–170.
- Meiswinkel, R., Baylis, M., Labuschagne, K., 2000. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. Bull. Entomol. Res. 90, 509–515.
- Meiswinkel, R., Paweska, J.T., 2003. Evidence for a new field *Culicoides* vector of African horse sickness in South Africa. Prev. Vet. Med. 60, 243–253.
- Mellor, P.S., Boorman, J., Baylis, M., 2000. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. Annu. Rev. Entomol. 45, 307–340.
- Mellor, P.S., Hamblin, C., 2004. African horse sickness. Vet. Res. 35, 445–466.
- Mellor, P.S., Osborne, R., Jennings, D.M., 1984. Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan. J. Hyg. 93, 621–628.
- Morag, N., Saroya, Y., Bravermann, Y., Klement, E., Gottlieb, Y., 2012. Molecular identification, phylogenetic status and geographic distribution of *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. PLoS One 7, e33610.
- Mullens, B.A., 1995. Flight activity and response to carbon-dioxide of *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in southern California. J. Med. Entomol. 32, 310–315.
- Mushi, E.Z., Isa, J.F.W., Chabo, R.G., Binta, M.G., Kapaata, R.W., 1998. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) associated with horses at Mogoditshane, Gaborone, Botswana. Vet. Res. Commun. 22, 295–297.
- Nakagawa, S., Schielzeth, H., 2013. A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. Methods Ecol. Evol. 4, 133–142.
- Nelson, R.L., 1965. Carbon dioxide as an attractant for *Culicoides*. J. Econ. Entomol. 2, 56–57.
- Nicholas, W.M., 1953. The bionomics of *Culicoides austeni*, vector of *Acanthocheilonema perstans* in the rain-forest of the British Cameroons, together with notes on *C. grahamii* and other species which may be vectors in the same area. Ann. Trop. Med. Parasitol. 47, 187–206.
- Oem, J.K., Chung, J.Y., Kwon, M.S., Kim, T.K., Lee, T.U., Bae, Y.C., 2013. Abundance of biting midge species (Diptera: Ceratopogonidae, *Culicoides* spp.) on cattle farms in Korea. J. Vet. Sci. 14, 91–94.
- Prasad, G., Malik, Y., Sushila, 1999. Bluetongue: an alarming disease to livestock industry in India. Indian Farm. 49, 16–20.
- RCore-Team. (2014). 2014. R Version 3.1.1: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL: <<http://www.R-project.org/>>.
- Raich, T., Jacobson, M., Holbrook, F., Babion, R., Blair, C., Beaty, B.J., 1997. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host selection in Colorado. J. Med. Entomol. 34, 247–249.
- Rawlings, P., Pro, M.J., Pena, I., Ortega, M.D.C., 1997. Spatial and seasonal distribution of *Culicoides imicola* in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus. Med. Vet. Entomol. 11, 49–57.
- Satheesha, S.P., Udupa, K.G., Appannavar, M.M., Labuschagne, K., 2014. A study on *Culicoides* midges associated with buffaloes. Buffalo Bull. 33, 400–406.
- Scheffer, E.G., Venter, G.J., Labuschagne, K., Page, P.C., Mullens, B.A., MacLachlan, N.J., et al., 2012. Comparison of two trapping methods for *Culicoides* biting midges and determination of African horse sickness virus prevalence in midge populations at Onderstepoort, South Africa. Vet. Parasitol. 185, 265–273.
- Takken, W., Verhulst, N.O., 2013. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 58, 433–453.
- Tanner, G.D., Turner, J.E.C., 1974. Vertical activities and host preferences of several *Culicoides* species in a southwestern Virginia Forest. Mosquito News 34, 66–70.
- Vattier-Bernard, G., Itoua, A., Trouillet, J., Lallemand, M., 1909. Les Ceratopogonidae (Diptera) du Mayombé Congolais. I. Rythme d'activité journalier des femelles

- de *Culicoides grahamii* Austen, 1909. Ann. Parasitol. Humaine Comparée 61, 367–377.
- Venter, G.J., Graham, S.D., 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.
- Venter, G.J., Groenewald, D.M., Paweska, J.T., Venter, E.H., Howell, P.G., 1999. Vector competence of selected South African *Culicoides* species for the Bryanston serotype of equine encephalosis virus. Med. Vet. Entomol. 13, 393–400.
- Venter, G.J., Meiswinkel, R., Nevill, E.M., Edwards, M., 1996. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) associated with livestock in the Onderstepoort area, Gauteng, South Africa as determined by light trap collections. Onderstepoort J. Vet. Res. 63, 315–325.
- Viennet, E., Garros, C., Gardes, L., Rakotoarivony, I., Allene, X., Lancelot, R., et al., 2012. Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges: implications for transmission of orbiviruses. Med. Vet. Entomol., 1–12.
- Walker, A.R., 1977. Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. Bull. Entomol. Res. 67, 217–233.
- Wirth, W.W., Marston, N., 1968. A method for mounting small insects on microscope slides in canada balsam. Ann. Entomol. Soc. Am. 61, 783–784.
- Yanase, T., Kato, T., Kubo, T., Yoshida, K., Ohashi, S., Yamakawa, M., et al., 2005. Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985–2002. J. Med. Entomol. 42, 63–67.

RESEARCH ARTICLE

Modelling the Abundances of Two Major *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Species in the Niayes Area of Senegal

Maryam Diarra^{1,2*}, Moussa Fall¹, Renaud Lancelot^{3,4}, Aliou Diop², Assane G. Fall¹, Ahmadou Dicko¹, Momar Talla Seck¹, Claire Garros^{3,4}, Xavier Allène^{3,4}, Ignace Rakotoarivony^{3,4}, Mame Thierno Bakhoun¹, Jérémy Bouyer^{1,3,4}, Hélène Guis^{3,4}

1 Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires, Dakar, Sénégal, **2** Université Gaston Berger, Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Statistiques et Développement, Saint-Louis, Sénégal, **3** Cirad, UMR15 CMAEE, F-34398 Montpellier, France, **4** INRA, UMR1309 CMAEE, F-34398 Montpellier, France

* myriem85@yahoo.fr



CrossMark
click for updates

Abstract

In Senegal, considerable mortality in the equine population and hence major economic losses were caused by the African horse sickness (AHS) epizootic in 2007. *Culicoides oxystoma* and *Culicoides imicola*, known or suspected of being vectors of bluetongue and AHS viruses are two predominant species in the vicinity of horses and are present all year-round in Niayes area, Senegal. The aim of this study was to better understand the environmental and climatic drivers of the dynamics of these two species. *Culicoides* collections were obtained using OVI (Onderstepoort Veterinary Institute) light traps at each of the 5 sites for three nights of consecutive collection per month over one year. Cross Correlation Map analysis was performed to determine the time-lags for which environmental variables and abundance data were the most correlated. *C. oxystoma* and *C. imicola* count data were highly variable and overdispersed. Despite modelling large *Culicoides* counts (over 220,000 *Culicoides* captured in 354 night-traps), using on-site climate measures, overdispersion persisted in Poisson, negative binomial, Poisson regression mixed-effect with random effect at the site of capture models. The only model able to take into account overdispersion was the Poisson regression mixed-effect model with nested random effects at the site and date of capture levels. According to this model, meteorological variables that contribute to explaining the dynamics of *C. oxystoma* and *C. imicola* abundances were: mean temperature and relative humidity of the capture day, mean humidity between 21 and 19 days prior a capture event, density of ruminants, percentage cover of water bodies within a 2 km radius and interaction between temperature and humidity for *C. oxystoma*; mean rainfall and NDVI of the capture day and percentage cover of water bodies for *C. imicola*. Other variables such as soil moisture, wind speed, degree days, land cover or landscape metrics could be tested to improve the models. Further work should also assess whether other trapping methods such as host-baited traps help reduce overdispersion.

OPEN ACCESS

Citation: Diarra M, Fall M, Lancelot R, Diop A, Fall AG, Dicko A, et al. (2015) Modelling the Abundances of Two Major *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Species in the Niayes Area of Senegal. PLoS ONE 10(6): e0131021. doi:10.1371/journal.pone.0131021

Editor: Ulrike Gertrud Munderloh, University of Minnesota, UNITED STATES

Received: February 27, 2015

Accepted: May 26, 2015

Published: June 29, 2015

Copyright: © 2015 Diarra et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are provided as supporting information files.

Funding: This study was funded partly by the EU FP7-HEALTH (European Framework Programme 7 under the Health component)-2010-single-stage grant 261504 EDENext (Emerging Disease in a changing European eNvironment) and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext323 (<http://www.edenext.eu>).

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

Introduction

Bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) are two devastating *Culicoides*-borne viral diseases affecting ruminants and equids respectively. The importance of these two arboviral diseases derives from their very broad geographical distribution, their potential for spreading rapidly and their major economic impact, justifying their status of notifiable diseases by the World Animal Health Organisation [1]. Both viruses are transmitted by females of several species of midges belonging to the large *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) genus (which accounts for more than 1,300 species described worldwide [2, 3]).

In Senegal, the last epidemic of AHS occurred in 2007. It caused considerable economic loss, estimated to 0.9 billion FCFA (Franc des Communautés Financières d'Afrique, 1.4 million euros) [4]. On a national scale, this epizootic led to an estimated mortality rate of 0.2% and a morbidity rate of 0.3% in traditional horse breeding farms, and a 5.4% mortality rate in modern farms [4, 5]. In the Niayes area, particularly affected by the outbreak, several studies were initiated in order to better understand *Culicoides* diversity and their role in the AHS and BT viruses transmission. Results showed that *Culicoides oxystoma* (43.33% of the total capture) and *Culicoides imicola* (12.5% of the total capture) were the predominant species in the vicinity of horses and were present all the year [6]. It was the first record of *Culicoides oxystoma* in the Afrotropical region [7]. This species is a suspected bluetongue virus (BTV) vector in Australasia and Oceania [8, 9]. *Culicoides imicola* is known to be a vector of BTV [10–12] and African horse sickness virus (AHSV) [11, 13, 14]. There are many environmental and climatic variables associated with *Culicoides* [15]. For *C. imicola* in particular; temperature [16–23], rainfall [22–24], wind speed [24], altitude [17, 20, 21, 25, 26], NDVI (normalized difference vegetation index) [16, 17, 21, 23, 24, 27, 28], MIR (middle infrared reflectance) [17, 22, 23], host densities [28] and sparse vegetation habitat [21] were associated with the presence and abundance of this species. These drivers relate to the distribution of *C. imicola* in Europe mainly [18–23, 25, 28]. In Africa, drivers of its distribution have only been studied in Morocco [17, 24, 27] and in South Africa [16]. To our knowledge, there are no published models for *C. oxystoma*. The aim of the current study was to better understand the environmental and climatic drivers of the dynamics of *Culicoides* species important in terms of abundance in the vicinity of horses in the Niayes area and known or suspected of being vectors of BTV or AHSV, namely *C. oxystoma* and *C. imicola*.

One of the most commonly used statistical distribution to describe count data is the Poisson distribution that assumes equidispersion of the counts. However, in real datasets, these counts are often overdispersed [29–31] and various methods can be used to demonstrate it [32, 33]. The causes of overdispersion include the excess of zeros and/or missing covariates or interactions [34]. Ways to deal with count overdispersion include the use of other types of models such as negative binomial (NB) models or adding random effects at the site of capture and/or at the date of capture in a Poisson regression mixed-effect model [34]. In the present work, we assessed the ability of Poisson, NB, Poisson regression mixed-effect model with random effects at the site of capture (PRME-S) and with random effects at the site and date of capture (PRME-SD) to fit the distribution of counts of *C. oxystoma* and *C. imicola* measured monthly in 5 sites in Niayes area of Senegal during one year.

Methods

Vector monitoring

Data collected in five horse stables (Mbao (longitude: -17.3327; latitude: 14.7467), Parc Hann ((longitude: -17.4298; latitude: 14.7283)), Pout (longitude: -17.0357; latitude: 14.7665), Thies

(longitude: -16.95; 14.794) and Niague (longitude: -17.2499; latitude: 14.8234)) in the Niayes area of Senegal from July 2011 to June 2012 were used in this study. Monitoring *Culicoides* midge apparent abundance over time was conducted by capturing the insects for three consecutive nights every month at each site over a period of one year. Two OVI (Onderstepoort Veterinary Institute) light traps were placed at each site at a distance of more than 10 m from each other. Indeed, the use of more than one trap per site allows for a more accurate sampling scheme as demonstrated in [35]. They were operated in the evening before dusk and collected the following morning after dawn. The traps were positioned close to the horses (hung on a post or a tree in the vicinity of the animals) at a height of 1.5 to 2 m from the ground. The identification of *Culicoides* was explained by Diarra et al. [6] and for more detailed information see [36]. Abundances from the two traps were summed for each night and each site. The maximum abundance of the sum of the two traps for three nights of collection per month and per site was used in model building. Maximum catches were preferred to mean catches because the number of specimens caught in a trap can drop very quickly when local weather conditions are sub-optimal [37]. Hence, the maximum of several consecutive catches was considered as the best measure for abundance over a short time period [37].

Culicoides Oxystoma and *Culicoides imicola* database are provided as supporting information (S1 and S2 Data).

Meteorological and environmental data

This study included a total of 10 variables belonging to the following categories: land cover, livestock density, vegetation index (mean covering the catch event and interval lagged NDVI), temperature (mean of the catch day and interval lagged temperature), humidity (mean of the catch day and interval lagged humidity) and precipitation (mean of the catch day and interval lagged precipitation). These variables were extracted in a 2 km radius around the trap sites because *Culicoides* spp. can easily spread as far as 2 km from their breeding sites [38]. The land cover information was derived from FAO dataset (<http://www.fao.org/geonetwork/srv/en/main.home?uuid=545be438-bc87-480b-83ec-ba3f4e486daf>). The class 'water bodies' was selected because water is known to be an important characteristic of *Culicoides* breeding sites for both *C. imicola* [20, 26, 39–41] and *C. oxystoma* [42, 43]. *Culicoides imicola* larvae can be found in breeding sites composed of a rich mixture of organic matter and damp soil [39]. Such areas with wet organic soil can be found in many areas on a farm: in irrigated areas, areas with leaky taps or drinking troughs, or other small sources of water. *Culicoides oxystoma* larvae have been found in different breeding sites: sandflats and intertidal mud [42, 44], in paddy fields, pond margins and stream edges [45]. The percentage cover of water bodies within 2 km radius was computed for each site. Livestock density influences abundance of some species of *Culicoides* as it was shown for *C. obsoletus* [46] and *C. imicola* [47]. Livestock density (cattle, goats and sheep) was obtained from FAO dataset (http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/glw/GLW_dens.html). Mean density of domestic ruminants (sum (cattle+goats+sheep)/3) within 2 x 2 km from each site was calculated. The NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) data for daily rainfall were extracted for each of the 5 sampling sites, (<http://iridl.ldeo.columbia.edu/expert/SOURCES/.NOAA/.NCEP/.CPC/.FEWS/.Africa/.DAILY/.ARC2/.daily.est.prcp/>). The 10-day normalized difference vegetation index (NDVI) data was obtained from Spot-Vegetation (<https://rs.vito.be/africa/en/data/Pages/vegetation.aspx>). Daily temperature and relative humidity were obtained from Hobo data logger (<http://www.microdaq.com/occ/u10/u10-003.php>) set up at each site.

Missing data of temperature and relative humidity were estimated by Multivariate Singular Spectrum Analysis (MSSA) [48–50]. Statistical descriptions of the MSSA analysis are provided

as supporting information (see [S1 Text](#)). This method was evaluated on meteorological data by calculating the mean absolute prediction error (MAPE) defined as:

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|obs_i - pred_i|}{obs_i} \quad (1)$$

With *obs* the meteorological records in the field and *pred* the MSSA estimations.

Visualizing time-dependant associations

Meteorological variables such as temperature, humidity and rainfall affect different development stages of *Culicoides* life cycle, but precise quantitative assessments of the timing and importance of these relations and interactions for each life stage are lacking. Thus, to determine the time lags for which each variable (temperature, relative humidity, rainfall and NDVI) was the most correlated to *Culicoides* counts, we performed a Cross Correlation Map (CCM) analysis. CCM has been used to determine the time lags for which correlations between environmental variables and the abundance of a wide range of vectors such as mosquitoes [[51–54](#)] and *Culicoides* [[55](#)] are maximal.

Using a more mathematical notation, the statistical analysis reads as follows:

For Y_i representing the number of captured *Culicoides* at time i and $X_{i-j,i-k}$ a meteorological quantity, averaged over a time period starting at time $i-j$ (time lag 1) and ending at $i-k$ (time lag 2), with $j \geq k$, a CCM at the coordinates j and k illustrates:

$$CCM_{j,k} = cor(Y_i, X_{i-j,i-k}) \quad (2)$$

For the special case of $j = k$ (plotted in the diagonal), the correlation coefficients are equal to those of a cross-correlogram.

For each species, a CCM was performed using time frames of 30 days for temperature, relative humidity and rainfall, and a time frame of 90 days for NDVI.

Modelling vector abundance

Environmental covariates included livestock density, land cover, daily temperature (T), relative humidity (H), rainfall (R) (corresponding to the catch day), 10-day NDVI (covering the catch event) and the interval lagged T, H, R and NDVI. For each species, a univariate analysis was performed to visualize the relationship between the species abundance and each of the covariates, but also to assess the correlation between different covariables. Variables found to be highly correlated (coefficient of correlation greater than 0.5) with others covariables (provided as supporting information [S1](#) and [S2](#) Tables) were not kept for the multivariate analysis. Two interaction terms between temperature and humidity and between temperature and rainfall were introduced to the model as these variables are often found to influence life cycles in interaction with each other.

C. oxystoma and *C. imicola* count data were assessed according to a set of environmental covariates using 4 different models: a Poisson regression (P), a negative binomial (NB), a Poisson regression mixed-effect model with random effect at the site of capture (PRME-S) and a Poisson regression mixed-effect model with nested random effects at the site and date of capture levels (PRME-SD). The four models were evaluated to see whether they accounted for overdispersion (the overdispersion test used is well described in [[56](#)]). The database was divided into two datasets. We randomly chose 2/3 of the sample for the training dataset with which the coefficients of the models were estimated, and assessed the predictions on the remaining 1/3 of the sample, the test dataset. The root mean square error (RMSE) was

calculated in the training (internal validation) and test datasets (external validation). The RMSE is defined as:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Y_i - \hat{Y}_i|^2} \quad (3)$$

For the *Culicoides* abundance data Y_{ij} counted on site i and date j , which takes any non-negative integer as its value, for $i = 1, \dots, p$ ($p = 5$ (5 sites)) and $j = 1, \dots, q$ ($q = 12$ (12 dates)) as y_{ij} :

- The stochastic component is described by a Poisson distribution with parameter λ_{ij}

$$Y_{ij} \sim \text{Poisson}(y_{ij} | \lambda_{ij}) = \frac{\lambda_{ij}^{y_{ij}} \exp(-\lambda_{ij})}{y_{ij}!} \quad (4)$$

Where $y_{ij} = 0, 1, \dots$

- The 2-dimensional vector of random effects (site and date), b_i , is restricted to be of mean zero, and therefore is completely characterized by the variance covariance matrix φ , a (2×2) symmetric positive matrix. $b_i \sim \text{Normal}(0, \varphi)$
- The systematic component is:

$$\log(y_{ij}) = \beta^T X_{ij} + b_i Z_{ij} \quad (5)$$

Where X_{ij} is the $(p \times q \times M)$ array of known fixed effects explanatory variables, β is the M -dimensional vector of fixed effects coefficients, Z_{ij} is the $(p \times q \times 2)$ array of known random effects explanatory variables and b_i , the 2-dimensional vector of random effects (site and date) [57].

Parameter estimation was done by maximum likelihood [58]. A backward procedure was applied to select the variables that remained significant with a p-value < 0.05 in the final model. All analyses were performed using the 'R' software [59], with 'lme4' (for the model) and 'Rssa' (for gap filling temperature and relative humidity data) packages.

Ethics Statements

This sampling protocol was approved by the Scientific and Technological Advice board of ISRA (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles), Senegal on 22–27 November 2010. The owners of farms gave permission to conduct the study on their sites. Field workers did not have any contact with the horses.

Results

The 354 night-traps captured 78,069 females of *C. oxystoma* and 24,176 females of *C. imicola* in 4 sites (Mbao, Pout, Thies and Parc Hann) from July 2011 to June 2012 and from November 2011 to October 2012 in Niague. The total of maximum monthly abundance was 30,070 for *C. oxystoma* and 13,904 for *C. imicola*.

As missing data occurred mainly at the end of the rainy season, when catches were at their maximum [6], it was essential to estimate their values. Results from MSSA method used to fill the gaps in temperature and relative humidity data are presented in Fig 1. Missing data of temperature and relative humidity were present in each site: at Mbao, they were 3% of missing data, Niague 43.98%, Parc Hann 22.95%, Pout 24.31% and Thies 20.49%. Overall, in the 5 sites, prediction errors were low: for temperature MAPE = 0.07 and for relative humidity MAPE = 0.08. *C. oxystoma* abundances were negatively correlated with temperature and relative humidity; and positively correlated with rainfall and NDVI (Fig 2). The highest

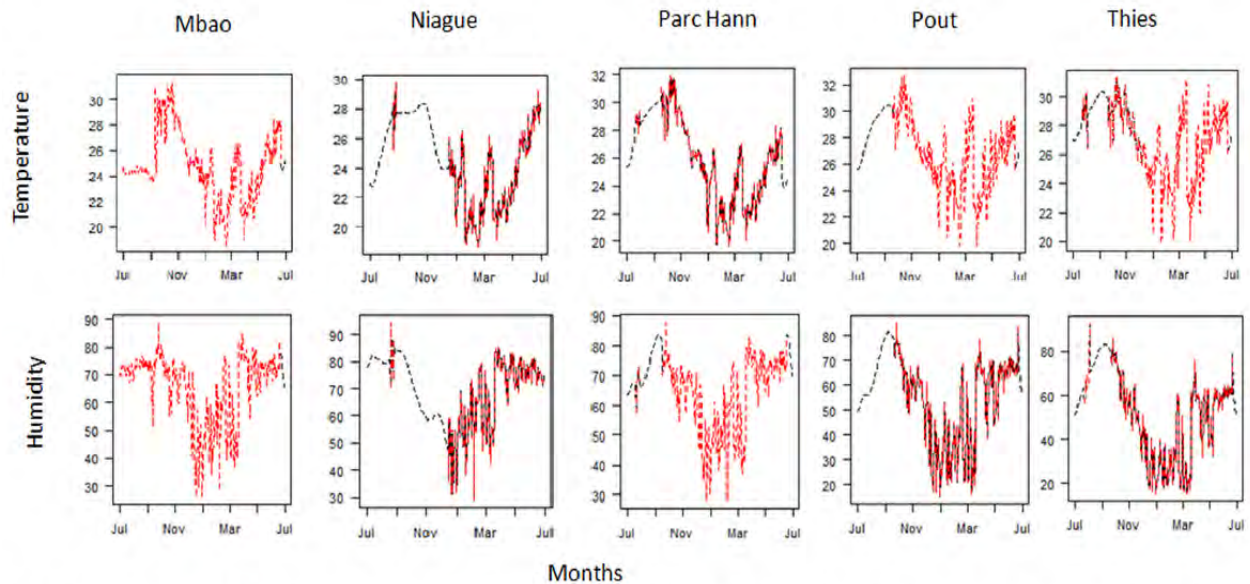


Fig 1. Gap filling data using Multivariate Singular Spectrum Analysis (MSSA). Estimating temperature and relative humidity missing data using MSSA method in each study site. In red the recorded environmental quantities, in black the reconstructed environmental quantities using MSSA method.

doi:10.1371/journal.pone.0131021.g001

correlations were found between *C. oxystoma* abundance and i) temperature averaged between 10 and 7 days prior the capture event ($r(10, 7) = -0.575$), ii) mean relative humidity between 21 and 19 days prior a capture event ($r(21, 19) = -0.495$), iii) rainfall averaged over the time period of 12 to 10 days prior capture ($r(12, 10) = 0.324$) and iv) mean NDVI over 80 days prior the capture event ($r(8, 0) = 0.617$). *C. imicola* abundances were negatively correlated with temperature, relative humidity, rainfall and NDVI. The highest correlations were found between *C. imicola* abundances and i) temperature averaged over the time period of 29 to 24 days prior capture ($r(29, 24) = -0.601$), ii) relative humidity averaged over the preceding 22 to 6 days before capture ($r(22, 6) = -0.572$), iii) rainfall averaged over the time period of 20 to 8 days prior capture ($r(20, 8) = -0.565$), and iv) NDVI averaged over the 30 days before capture event ($r(3, 0) = -0.495$).

Overdispersion test applied to the 4 models for each species are presented in Table 1. For *C. oxystoma* and *C. imicola* data, tests were statistically significant for Poisson regression model ($p < 10^{-3}$), negative binomial model ($p = 0.0048$ for *C. oxystoma* and $p = 0.0046$ for *C. imicola*) and Poisson regression mixed-effect model with random effect at the site of capture ($p < 10^{-3}$). However, for both species, overdispersion test was not significant for PRME-SD ($p = 1$), indicating that there is no overdispersion in this model.

Results from modelling the female *C. oxystoma* and *C. imicola* monthly population dynamics for 4 models are shown in Fig 3. Visual inspection of these results shows that the PRME-SD better estimates the observed data. Further support is provided by the root mean square error (RMSE). PRME-SD models had the lowest mean prediction errors both in the training dataset and in the test dataset: for *C. oxystoma* RMSE = 0.72 in the training dataset (respectively RMSE = 0.76 in the test dataset); for *C. imicola* RMSE = 0.87 in the training dataset (respectively RMSE = 0.89 in the test dataset) (Table 1).

For each species, covariates that were kept in the final multivariate analysis PRME-SD are presented in Table 2. The number of captured *C. oxystoma* increased with the mean

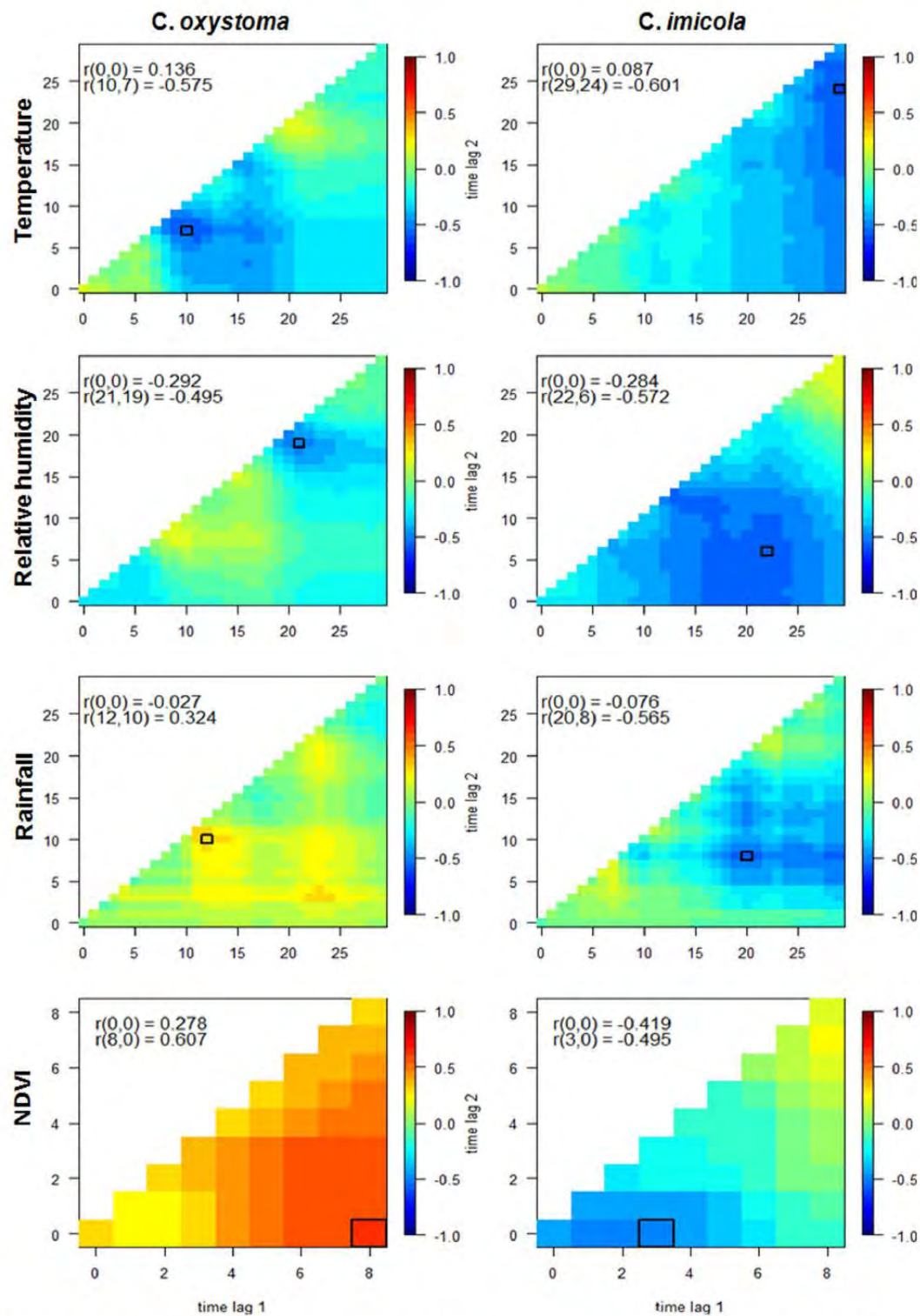


Fig 2. Cross Correlation Maps. Cross correlation maps for female *C. oxystoma* and *C. imicola* abundance with temperature, relative humidity, rainfall and NDVI

doi:10.1371/journal.pone.0131021.g002

Table 1. Overdispersion test and model validation.

Models	<i>C. oxystoma</i>					<i>C. imicola</i>				
	Overdispersion test			Validation		Overdispersion test			Validation	
	χ^2	DdI	$P > \chi^2$	RMSE_Training	RMSE_Test	χ^2	DdI	$P > \chi^2$	RMSE_Training	RMSE_Test
Poisson	45295.6	49	0.0000	178.31	29.4	26002.1	49	0.0000	232.8	78.73
NB	77.2	48	0.0048	195.91	243.01	77.4	48	0.0046	465.5	282.03
PRME-S	12478.3	48	0.0000	131.36	29.41	12393.3	48	0.0000	214.36	41.39
PRME-SD	3.8	48	1.0000	0.72	0.76	2.1	48	1.0000	0.87	0.89

doi:10.1371/journal.pone.0131021.t001

temperature at the capture day (Table 2). Relative humidity at the time of capture and from 21 and 19 days prior capture events were positively associated with the *C. oxystoma* abundance. High livestock density (values greater than 100 animals per km²) increased *C. oxystoma* abundance whereas high percentages cover of 'water bodies' (values greater than 5%) reduced *C. oxystoma* abundance. The interaction between temperature and rainfall had a negative effect on *C. oxystoma* abundance. For *C. imicola* (Table 2), abundances decreased with the mean rainfall at the date of capture and also with relative humidity between the 22nd and the 6th day before capture events. Opposite, mean NDVI of 10-day covering the capture event and high percentages cover of 'water bodies' increased *C. imicola* abundance.

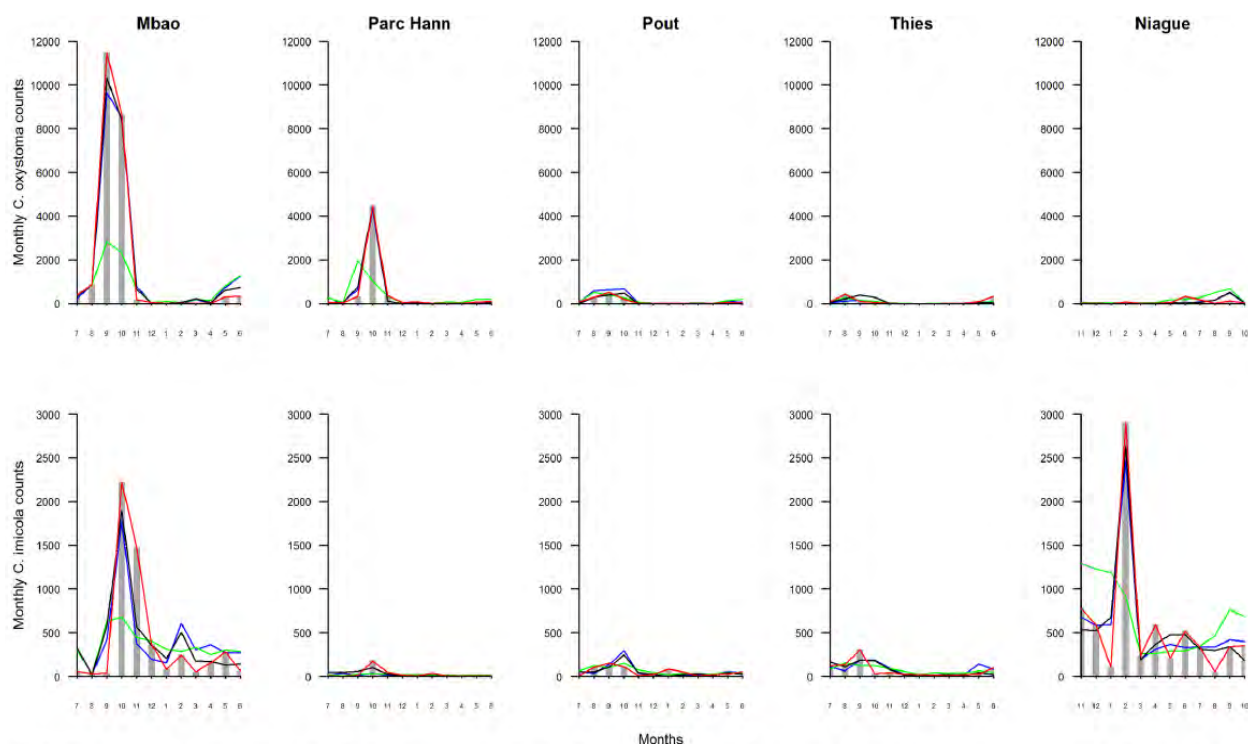


Fig 3. Observed vs Predicted monthly *Culicoides* counts. Monthly *C. oxystoma* (A) and *C. imicola* (B) counts observed vs. predicted by Poisson, NB, PRME-S, PRME-SD, in each site (in column). Months' quotation: 1 = January to 12 = December.

doi:10.1371/journal.pone.0131021.g003

Table 2. Summary of the PRME-SD abundance model for the two species.

	Regression coefficients	Standard Errors	Z value	P_value
<i>C. oxystoma</i>				
Intercept	3.8587	0.2378	16.22	< 2e-16
Temperature (mean of capture day)	0.3641	0.0577	6.305	2.85E-10
Humidity (mean of capture day)	0.0563	0.0118	4.739	2.15E-06
H.21.19 (mean humidity from 21 to 19 days prior the capture event)	0.0788	0.0375	2.102	0.0355
Density of ruminants	1.7845	0.5241	3.405	0.0006
Water bodies (percentage cover)	-1.029	0.4849	-2.122	0.0338
Temperature:Rainfall	-0.0084	0.004	-2.095	0.0358
<i>C. imicola</i>				
Intercept	3.0916	0.1963	15.75	< 2e-16
Rainfall (mean of capture day)	-0.0828	0.037	-2.238	0.0253
NDVI (mean of capture 10-day period)	0.5847	0.1363	4.287	1.81E-05
Water bodies (percentage cover)	2.6365	0.3057	8.623	< 2e-16

doi:10.1371/journal.pone.0131021.t002

Discussion

McCullagh and Nelder [56] asserted that whenever the variable of interest is a count, its distribution is often an overdispersed Poisson distribution. The present data are another illustration of this assertion. Here overdispersion was not due to excess zeroes because for all sites and during the whole trapping period, *C. imicola* was always captured and *C. oxystoma* was only absent 1 month at 1 site. Here overdispersion is probably due to very high extreme values. 25% of extremes values represent 79.28% of the total catch for *C. oxystoma* and 47.55% for *C. imicola*. The first part of this work aimed at comparing which distribution among Poisson, NB, PRME-S and PRME-SD better fitted on counts of *C. oxystoma* and *C. imicola* recorded using the OVI light traps. For both species, only PRME-SD model dealt with overdispersion and provided the best predictions of the distribution of the observed data.

In the Niayes area of Senegal, both spatial and temporal heterogeneities in *C. oxystoma* and *C. imicola* abundances were mentioned by Diarra et al. [6]. This can partly be explained by several factors we found associated with these *Culicoides* species.

Abundance of *C. oxystoma* was positively correlated to temperature (without any time lag), humidity (with and without time lag) and the density of ruminants, and negatively correlated to the surface of water bodies and to an interaction term of temperature and rainfall. As this work is the first attempt to identify drivers of *C. oxystoma*, we will discuss the meanings of these correlations and whether these environmental variables (temperature, humidity, ruminant density, and water body surface) have been involved as drivers of the distribution of other species of *Culicoides*.

Firstly, mean temperature and humidity were positively associated with *C. oxystoma* abundance. Indeed, *C. oxystoma* peaks were obtained in September-October, at the end of the rainy season and period for which highest temperatures were recorded in our study sites. In Kagoshima, southern Japan, which has a humid sub-tropical climate, this species is also present in very large numbers [45]. It is collected from May to November [45] i.e. during the warmest and rainiest period of the year, showing that similar seasonal patterns are observed in southern Japan and Senegal. These results also confirm once more the importance of temperature and humidity as major drivers of abundance of many species of insects. Temperature and humidity of capture day can influence adult activity and survival. The correlation between relative humidity from the 21st to the 19th day prior the collection and adult abundance suggests that it

also influences larval and/or pupal stages of *C. oxystoma*. More generally, temperature is known to influence greatly the development and survival of all stages of the life cycle of *Culicoides* species [11, 60–66], driving the dynamics and distribution of many *Culicoides* species [16–23, 67]. Concerning humidity, Murray *et al.* [68] showed it was an important criterion for the development and survival of *Culicoides brevitarsis* and Conte *et al.* [25] demonstrated that high relative humidity increased *C. imicola* probability of presence in Italy. High livestock densities were positively associated with *C. oxystoma* abundance. Presence and numbers of hosts are key factors known to affect catches of other *Culicoides* vector species [46, 69, 70]. High percentage covers of ‘water bodies’ decreased *C. oxystoma* abundance. Abundance of *C. oxystoma* was negatively associated with the interaction between temperature and rainfall. High rainfall could decrease temperature and inhibit the activity of some *Culicoides* species.

Abundance of *C. imicola* was negatively correlated to rainfall, and positively correlated to NDVI and the surface of water bodies. As for *C. oxystoma*, *C. imicola* populations peaked at the end of the rainy season (September–October period) in the Niayes region [6]. The fact that mean rainfall at the date of capture was negatively associated with *C. imicola* abundances could confirm that rainfall can inhibit the activity of some *Culicoides* species as shown by Murray [71]. To a lesser extent, the fact that rainfall can cause *C. imicola* nymphs to drown by flooding their breeding sites [72] could also impact the daily catches. Similar results were found by Ducheyne *et al.* [19] for *C. imicola* in Spain showing that precipitation, especially summer rainfall (June–September), was the most influential factor determining its distribution. This is concurrent with the observations from Calvete and colleagues [47, 73], who noted that the coefficient of variation and the total amount of precipitation significantly influenced the presence of *C. imicola* in Iberia.

In this study *C. imicola* abundance was positively influenced by NDVI, a variable correlated with soil moisture [74], precipitation [75] and biomass vegetation [76]. This finding agrees with several other studies which linked high NDVI with increased *C. imicola* abundance both in North Africa and in Europe [16, 17, 24, 27, 28, 77]. In Senegal, vegetation growth is important during the rainy season, particularly at the end of the rainy season (September and October), when the highest abundances of *C. imicola* were obtained. In Morocco, Baylis *et al.* [27] suggested that the positive correlation between *C. imicola* abundance and average annual minimum NDVI was driven by soil moisture. Finally, results show that high percentages cover of ‘water bodies’ were positively associated with *C. imicola* abundance. Moreover, the presence of water bodies in Niague, Mbao and Parc Hann could have provided breeding sites and increased *C. imicola* in these sites.

CCM has allowed us to identify time lagged associations between meteorological variables and the abundance of each of the two *Culicoides* species through statistical methods. The use of CCM analysis is a considerable improvement compared to arbitrarily defined time lags. Yet this analysis could be further refined by testing whether the optimal lags found in the CCM vary, seasonally for example, over time. Taking into account eventual seasonal patterns would help better fitting the model throughout the year.

To our knowledge no other published models of *Culicoides* abundance take into account overdispersion. Accounting for overdispersion when it is present is vital; failing to do so can erroneously inflate measures of explained variance [78], bias parameter estimates [79, 80], and may cause researchers to identify variables as having a biologically meaningful effect when in fact they do not [34, 79, 81]. In this work, including random effects for the site and the date enabled to take into account overdispersion, opposite to the three other models tested. The PRME-SD model gave better estimates of *C. oxystoma* and *C. imicola* abundances: very large differences were noticed between the RMSE of the PRME-SD models and the three others models for both species. For the PRME-SD models, RMSE values are close to zero, and can

thus be considered as good. The disadvantage of PRME-SD model is that we cannot predict *C. oxystoma* and *C. imicola* abundances at other sites. The fact that overdispersion persisted in the other models could indicate that some important variables were omitted or were not included at the correct spatial or temporal resolution. Other variables such as soil moisture [24, 27, 82], wind speed [24, 27, 69, 83–85] and other classes of land cover or landscape metrics [15, 86, 87] could also be explored as they are known to impact *Culicoides* abundance. Modelling *Culicoides* dynamics is very difficult because *Culicoides* catch data is often very “noisy”, with very large variability in catches even at fine spatial [70] or temporal scales and hindered by knowledge gaps on *Culicoides* ecology, as noted by Searle et al. [88], for example. Despite having collected over 220,000 *Culicoides* during this study, more robust models could be obtained with more sites, and/or a finer and/or longer temporal monitoring. Yet larger datasets are scarce because identifying huge numbers of *Culicoides* is difficult and extremely time consuming. To take into account local meteorological variations, temperature and humidity data were collected at a fine scale in each of the study sites. Furthermore CCM enabled to explore the best temporal resolution of the variables tested. This could indicate that climatic variables need to be considered differently, perhaps as degree days for temperature instead of mean daily temperature. Finer spatial resolution of livestock and land cover variables could also help improve the models. Finally, as water bodies seemed to influence the abundance of both species, more attention should be given to better characterizing the larval habitats of this two species in the Niayes area. Modelling *Culicoides* dynamics is an essential step for evaluating the risk of disease transmission as shown by Brugger et al. [55], Guis et al. [89] and Hartemink et al. [90]. Indeed, vector dynamics are necessary to estimate the vector to host ratio, one of the key parameters of R_0 , the basic reproduction ratio, which measures disease transmission risk.

Conclusions

This study is the first to model the dynamics of *C. oxystoma*. It is also the first to investigate the influence of environmental and climatic parameters on the dynamics of *C. imicola* in West Africa. This work confirmed that *Culicoides* count data can be extremely variable even at fine spatial and temporal scales. This variability resulted in strong overdispersion of the data. Despite modelling large *Culicoides* counts (over 220,000 *Culicoides* captured in 354 night-traps), using on-site climate measures instead of satellite-derived measures, determining the time-lags for which environmental variables and abundance data were the most correlated through a CCM analysis, overdispersion persisted in all models except the PRME-SD (with nested random effects at the site and date of capture). According to this model, meteorological and environmental variables that contribute to explaining the dynamics of *C. oxystoma* and *C. imicola* abundances were identified. To take into account overdispersion without including random effects in the models, other variables such as soil moisture, wind speed, degree days, land cover or landscape metrics could be tested. Further work should also assess whether the distribution of counts obtained using host-baited traps are less overdispersed.

Supporting Information

S1 Data. Database for *Culicoides Oxystoma* abundance.
(XLSX)

S2 Data. Database for *Culicoides imicola* abundance.
(XLSX)

S1 Table. Correlation coefficients for explanatory variables for *C. oxystoma*. Variables found to be highly correlated (coefficient of correlation greater than 0.5) with others

covariables were not kept for the multivariate analysis.
(DOCX)

S2 Table. Correlation coefficients for explanatory variables for *C. imicola*. Variables found to be highly correlated (coefficient of correlation greater than 0.5) with others covariables were not kept for the multivariate analysis.
(DOCX)

S1 Text. Statistical description for Multivariate Singular Spectrum Analysis.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors are particularly grateful to all people who gave assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds) in Senegal. We also thank Dr Katharina Brugger (Institute for Veterinary Public Health, Vienna, Austria) for helping with the CCM analysis. The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MD HG RL A. Diop. Performed the experiments: MD RL HG A. Diop. Analyzed the data: MD RL A. Diop A. Dicko. Contributed reagents/materials/analysis tools: MF AGF MTS XA IR MTB. Wrote the paper: MD HG A. Diop A. Dicko AGF CG JB. Help analysis in MSSA method: A. Dicko.

References

1. Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol Evol*. 2005; 20(6):328–36. PMID: [16701389](#).
2. Borkent A. World species biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Available: <http://www.inhsillinois.edu/files/9913/9144/3328/CeratopogonidaeCatalogpdf>. 2014.
3. Borkent A. The subgeneric classification of species of *Culicoides*—thoughts and a warning. Available: <http://www.inhsillinois.edu/files/9613/9136/7590/CulicoidesSubgenerapdf>. 2014.
4. Akakpo AJ, Wombou Toukam CM, Mankor A, Ly C. Impact économique de l'épizootie de peste équine de 2007 au Sénégal. *Bull Anim Hlth Prod Afr*. 2011; 59:1–16.
5. Diouf ND, Etter E, Lo MM, Lo M, Akakpo AJ. Outbreaks of African horse sickness in Senegal and methods of control of the 2007 epidemic. *Vet Rec*. 2013; 172(6):152. doi: [10.1136/vr.101083](#) PMID: [23223002](#)
6. Diarra M, Fall M, Fall AG, Diop A, Seck MT, Garros C, et al. 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*. 2014; 7(1):147. doi: [10.1186/1756-3305-7-147](#) PMID: [24690198](#); PubMed Central PMCID: PMC3973751.
7. Bakhour MT, Fall M, Fall AG, Bellis GA, Gottlieb Y, Labuschagne K, et al. 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*. 2013; 8(12):e84316. doi: [10.1371/journal.pone.0084316](#) PMID: [24386366](#); PubMed Central PMCID: PMC3875552.
8. Mellor P, Carpenter S, White DM. Bluetongue virus in the insect host. In *Bluetongue* Edited by Mellor P, Baylis M, Mertens P Oxford, UK: Elsevier 2009. p. 295–320.
9. Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. Bionomics of Temperate and Tropical *Culicoides* Midges: Knowledge Gaps and Consequences for Transmission of *Culicoides*-Borne Viruses. *Annu Rev Entomol*. 2015; 60(1):373–92. doi: [10.1146/annurev-ento-010814-020614](#)
10. Meiswinkel R, Gomulski LM, Delecolle JC, Goffredo M, Gasperi G. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes—unfinished business. *Vet Ital*. 2004; 40(3):151–9. PMID: [20419654](#).
11. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45:307–40. PMID: [10761580](#)

12. Venter GJ, Paweska JT, Van Dijk AA, Mellor PS, Tabachnick WJ. Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Med Vet Entomol*. 1998; 12(4):378–85. PMID: [9824821](#).
13. Mellor PS, Hamblin C. African horse sickness. *Vet Res*. 2004; 35(4):445–66. PMID: [15236676](#).
14. Venter GJ, Graham SD, Hamblin C. African horse sickness epidemiology: vector competence of south african *Culicoides* species for virus serotypes 3, 5 and 8. *Med Vet Entomol*. 2000; 14(3):245–50. PMID: [11016430](#).
15. Purse BV, Falconer D, Sullivan MJ, Carpenter S, Mellor PS, Pieterse SB, et al. Impacts of climate, host and landscape factors on *Culicoides* species in Scotland. *Med Vet Entomol*. 2011.
16. Baylis M, Meiswinkel R, Venter GJ. A preliminary attempt to use climate data and satellite imagery to model the abundance and distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Africa. *J S Afr Vet Assoc*. 1999; 70(2):80–9. PMID: [10855827](#).
17. Baylis M, Mellor PS, Wittmann EJ, Rogers DJ. Prediction of areas around the Mediterranean at risk of bluetongue by modelling the distribution of its vector using satellite imaging. *Vet Rec*. 2001; 149(21):639–43. PMID: [11764324](#).
18. Conte A, Goffredo M, Ippoliti C, Meiswinkel R. Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the Obsoletus Complex in Italy. *Vet Parasitol*. 2007; 150(4):333–44. PMID: [17997043](#).
19. Ducheyne E, Chueca MAM, Lucientes J, Calvete C, Estrada R, Boender GJ, et al. Abundance modelling of invasive and indigenous *Culicoides* species in Spain. *Geospatial Health*. 2013; 8(1):241–54. PMID: [24258899](#).
20. Ippoliti C, Gilbert M, Vanhuyse S, Goffredo M, Satta G, Wolff E, et al. Can landscape metrics help determine the *Culicoides imicola* distribution in Italy? *Geospatial Health*. 2013; 8(1):267–77. PMID: [24258901](#).
21. Rigot T, Conte A, Goffredo M, Ducheyne E, Hendrickx G, Gilbert M. Predicting the spatio-temporal distribution of *Culicoides imicola* in Sardinia using a discrete-time population model. *Parasit Vectors*. 2012; 5:270. doi: [10.1186/1756-3305-5-270](#) PMID: [23174043](#); PubMed Central PMCID: PMC3561275.
22. Roger FL. Emergence of Bluetongue Disease in the Mediterranean basin: Modelling Locations at Risk for Potential Vectors (*Culicoides* spp.) using Satellite Imagery [MSc]: University of London; 2002.
23. Tatem AJ, Baylis M, Mellor PS, Purse BV, Capela R, Pena I, et al. Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and north Africa using satellite imagery. *Vet Microbiol*. 2003; 97(1–2):13–29. PMID: [14637035](#).
24. Baylis M, Bouayoune H, Touti J, El Hasnaoui H. Use of climatic data and satellite imagery to model the abundance of *Culicoides imicola*, the vector of African horse sickness virus, in Morocco. *Med Vet Entomol*. 1998; 12(3):255–66. PMID: [9737597](#).
25. Conte A, Giovannini A, Savini L, Goffredo M, Calistri P, Meiswinkel R. The effect of climate on the presence of *Culicoides imicola* in Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2003; 50(3):139–47. PMID: [12667192](#).
26. Conte A, Ippoliti C, Savini L, Goffredo M, Meiswinkel R. Novel environmental factors influencing the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the Obsoletus Complex in Italy. *Vet Ital*. 2007; 43(3):571–80. PMID: [20422536](#).
27. Baylis M, Rawlings P. Modelling the distribution and abundance of *Culicoides imicola* in Morocco and Iberia using climatic data and satellite imagery. *Arch Virol Suppl*. 1998; 14:137–53. PMID: [9785503](#).
28. Acevedo P, Ruiz-Fons F, Estrada R, Marquez AL, Miranda MA, Gortazar C, et al. A broad assessment of factors determining *Culicoides imicola* abundance: modelling the present and forecasting its future in climate change scenarios. *PLoS One*. 2010; 5(12):e14236. PMID: [21151914](#). doi: [10.1371/journal.pone.0014236](#)
29. Allain E, Brenac T. Modèles linéaires généralisés appliqués à l'étude des nombres d'accidents sur des sites routiers: Le modèle de Poisson et ses extensions. *Recherche—Transports—Sécurité*. 2001; 72(0):3–16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0761-8980\(01\)90120-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0761-8980(01)90120-7).
30. Bouche G, Lepage B, Migeot V, Ingrand P. Application of detecting and taking overdispersion into account in Poisson regression model. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2009; 57:285–96. doi: [10.1016/j.respe.2009.02.209](#) PMID: [19540683](#)
31. Gardner W, Mulvey E, Shaw E. Regression analyses of counts and rates: Poisson, overdispersed Poisson, and negative binomial models. *Psychol Bull*. 1995; 118:392–404. PMID: [7501743](#)
32. Breslow N. Tests of Hypotheses in Overdispersed Poisson Regression and other Quasi-Likelihood Models. *J Amer Statist Assoc*. 1990; 85(410):565–71. doi: [10.1080/01621459.1990.10476236](#)
33. Dean C, Lawless JF. Tests for Detecting Overdispersion in Poisson Regression Models. *J Amer Statist Assoc*. 1989; 84(406):467–72. doi: [10.1080/01621459.1989.10478792](#)

34. Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM. Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R: Springer New York; 2009. 549 p.
35. Kirkeby C, Bodker R, Stockmarr A, Lind P. Spatial abundance and clustering of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) on a local scale. Parasit Vectors. 2013; 6(43):1–14.
36. Fall M, Diarra M, Fall AG, Balenghien T, Seck MT, Bouyer J, et al. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) midges, the vectors of African horse sickness virus—a host/vector contact study in the Niayes area of Senegal. Parasit Vectors. 2015; 8(1):39. doi: [10.1186/s13071-014-0624-1](https://doi.org/10.1186/s13071-014-0624-1) PMID: [25604465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25604465/); PubMed Central PMCID: PMC4307892.
37. Baylis M, el Hasnaoui H, Bouayoune H, Touti J, Mellor PS. The spatial and seasonal distribution of African horse sickness and its potential *Culicoides* vectors in Morocco. Med Vet Entomol. 1997; 11(3):203–12. PMID: [9330250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9330250/).
38. Meiswinkel R, Venter GJ, Nevill EM. *Culicoides* spp. Infectious diseases of livestock, Volume One: p 93–136. 2004.
39. Braverman Y. Characteristics of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) breeding places near Salisbury, Rhodesia. Ecological Entomology. 1978; 3:163–70.
40. Foxi C, Delrio G. Larval habitats and seasonal abundance of *Culicoides* biting midges found in association with sheep in northern Sardinia, Italy. Med Vet Entomol. 2010; 24(2):199–209. PMID: [20604864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20604864/). doi: [10.1111/j.1365-2915.2010.00861.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00861.x)
41. Uslu U, Dik B. Description of breeding sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey. Parasite. 2007; 14(2):173–7. PMID: [17645192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17645192/).
42. Poddar TK, Ray S, Choudhury A. Ecology of larval *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Hooghly estuary, Sagar Island, India. Ann Entomol. 1992; 10(1):19–25.
43. Wirth WW, Hubert AA. The *Culicoides* of southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). Mem Am Entomol Inst. 1989; 44:1–509.
44. Ray S, Choudhury A. Vertical Distribution of a Biting Midge, *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) During Different Seasons in the Hooghly Estuary, Sagar Island, India. Int J Trop Insect Sci. 1988; 9(03):329–33.
45. Yanase T, Matsumoto Y, Matsumori Y, Aizawa M, Hirata M, Kato T, et al. Molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the southern part of Japan. J Med Entomol. 2013; 50(5):1105–10. PMID: [24180116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24180116/).
46. Garcia-Saenz A, McCarter P, Baylis M. The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. Med Vet Entomol. 2010; 25(1):113–5. Epub 2010/08/14. doi: [10.1111/j.1365-2915.2010.00904.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00904.x) PMID: [20704653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20704653/).
47. Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Borrás D, Calvo JH, Lucientes J. Ecological correlates of bluetongue virus in Spain: predicted spatial occurrence and its relationship with the observed abundance of the potential *Culicoides* spp. vector. Vet J. 2009; 182(2):235–43. Epub 2008/08/01. doi: [10.1016/j.tvjl.2008.06.010](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.010) PMID: [18667341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18667341/).
48. Golyandina N, Korobeynikov A, Shlemov A, Usevich K. Multivariate and 2D Extensions of Singular Spectrum Analysis with the Rssa Package. arXiv:13095050v1 [statME]. 2013.
49. Golyandina N, Zhigljavsky A. Singular Spectrum Analysis for time series: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. 125 p.
50. Kondrashov D, Ghil M. Spatio-temporal filling of missing points in geophysical data sets. Nonlin Processes Geophys. 2006; 13:151–9. doi: [10.5194/npg-13-151-2006](https://doi.org/10.5194/npg-13-151-2006)
51. Curriero FC, Shone SM, Glass GE. Cross correlation maps: a tool for visualizing and modeling time lagged associations. Vector Borne Zoonotic Dis. 2005; 5(3):267–75. doi: [10.1089/vbz.2005.5.267](https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.267) PMID: [16187896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16187896/).
52. Lebl K, Brugger K, Rubel F. Predicting *Culex pipiens/restuans* population dynamics by interval lagged weather data. Parasit Vectors. 2013; 6(1):129. doi: [10.1186/1756-3305-6-129](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-129) PMID: [23634763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23634763/); PubMed Central PMCID: PMC3660179.
53. Shone SM, Curriero FC, Lesser CR, Glass GE. Characterizing population dynamics of *Aedes sollicitans* (Diptera: Culicidae) using meteorological data. J Med Entomol. 2006; 43(2):393–402. PMID: [16619626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16619626/).
54. Walsh A, Glass G, Lesser C, Curriero F. Predicting seasonal abundance of mosquitoes based on off-season meteorological conditions. Environ Ecol Stat. 2008; 15(3):279–91. doi: [10.1007/s10651-007-0056-6](https://doi.org/10.1007/s10651-007-0056-6)
55. Brugger K, Rubel F. Bluetongue disease risk assessment based on observed and projected *Culicoides* *obsoletus* spp. vector densities. PLoS One. 2013; 8(4):e60330. doi: [10.1371/journal.pone.0060330](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060330) PMID: [23560090](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23560090/); PubMed Central PMCID: PMC3613389.

56. McCullagh P, Nelder J. Generalized linear models. 2 ed. London: Chapman & Hall; 1989.
57. Elston DA, Moss R, Boulinier T, Arrowsmith C, Lambin X. Analysis of aggregation, a worked example: numbers of ticks on red grouse chicks. *Parasitology*. 2001; 122(5):563–9.
58. Tassi P. Méthodes Statistiques. 3e édition, Collection Economie et Statistiques avancées Paris, France, ISBN: 2-7178-4859-2. 2004.
59. R Core Team. R: A language and environment of statistical computing. Available: <http://cranr-project.org/manualshtml>. 2012.
60. Booman J, Goddard P. Observations on the biology of *Culicoides impunctatus* Goetgh. (Dipt., Ceratopogonidae) in southern England. *Bull Entomol Res*. 1970; 60(02):189–98.
61. Carpenter S, Mordue W. Oogenesis and laboratory survival in the Scottish biting midge *Culicoides impunctatus*. *Physiol Entomol*. 2006; 31(1):89–93.
62. Davis EL, Butler JF, Roberts RH, Reinert JF, Kline DL. Laboratory blood feeding of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) through a reinforced silicone membrane. *J Med Entomol*. 1983; 20(2):177–82. PMID: [6842525](#)
63. Lysyk TJ, Danyk T. Effect of temperature on life history parameters of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to geographic origin and vectorial capacity for bluetongue virus. *J Med Entomol*. 2007; 44(5):741–51. PMID: [17915503](#)
64. Mullens BA, Rutz DA. Development of immature *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) at constant laboratory temperatures. *Ann Entomol Soc Am*. 1983; 76(4):747–51.
65. Vaughan J, Turner E. Development of immature *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) from Saltville, Virginia, at constant laboratory temperatures. *J Med Entomol*. 1987; 24(3):390–5. PMID: [3585933](#)
66. Veronesi E, Venter GJ, Labuschagne K, Mellor PS, Carpenter S. Life-history parameters of *Culicoides* (*Avaritia*) *imicola* Kieffer in the laboratory at different rearing temperatures. *Vet Parasitol*. 2009; 163(4):370–3. PMID: [19473769](#). doi: [10.1016/j.vetpar.2009.04.031](#)
67. Ortega MD, Holbrook FR, Lloyd JE. Seasonal distribution and relationship to temperature and precipitation of the most abundant species of *Culicoides* in five provinces of Andalusia, Spain. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999; 15(3):391–9. PMID: [10480132](#).
68. Murray MD. The Seasonal Abundance of Female Biting-Midges, *Culicoides*-Brevitarsis Kieffer (Diptera, Ceratopogonidae), in Coastal South-Eastern Australia. *Aust J Zool*. 1991; 39(3):333–42.
69. Baylis M, Parkin H, Kreppel K, Carpenter S, Mellor PS, McIntyre KM. Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. *Med Vet Entomol*. 2010; 24(1):38–45. Epub 2010/04/10. doi: [MVE842](#) [pii] doi: [10.1111/j.1365-2915.2009.00842.x](#) PMID: [20377730](#).
70. Kluiters G, Sugden D, Guis H, Marie McIntyre K, Labuschagne K, Vilar MJ, et al. Modelling the spatial distribution of *Culicoides* biting midges at the local scale. *J Appl Ecol*. 2013; 50(1):232–42.
71. Murray MD. Potential vectors of bluetongue in Australia. *Aust Vet J*. 1975; 51(4):216–20. PMID: [169797](#).
72. Nevill EM. Biological studies on some South African *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) and the morphology of their immature stages: Thèse de Doctorat. Universiteit van Pretoria.; 1967.
73. Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Borrás D, Calvo JH, Lucientes J. Modelling the distributions and spatial coincidence of bluetongue vectors *Culicoides imicola* and the *Culicoides obsoletus* group throughout the Iberian peninsula. *Med Vet Entomol*. 2008; 22(2):124–34. Epub 2008/05/24. doi: [MVE728](#) [pii] doi: [10.1111/j.1365-2915.2008.00728.x](#) PMID: [18498611](#).
74. Narasimha Rao PV, Venkataratnam L, Krishna Rao PV, Ramana KV, Singarao MN. Relation between root zone soil moisture and normalized difference vegetation index of vegetated fields. *Int J Remote Sens*. 1993; 14(3):441–9. doi: [10.1080/01431169308904349](#)
75. Rogers DJ, Randolph SE. Mortality rates and population density of tsetse flies correlated with satellite imagery. *Nature*. 1991; 351:739–41. doi: [10.1038/351739a0](#) PMID: [2062367](#)
76. Tucker CJ, Vanpraet CL, Sharman MJ, Van Ittersum G. Satellite remote sensing of total herbaceous biomass production in the senegalese sahel: 1980–1984. *Remote Sensing of Environment*. 1985; 17(3):233–49. [http://dx.doi.org/10.1016/0034-4257\(85\)90097-5](http://dx.doi.org/10.1016/0034-4257(85)90097-5).
77. Guis H. Géomatique et épidémiologie: Caractérisation des paysages favorables à *Culicoides imicola*, vecteur de la fièvre catarrhale ovine en Corse. Thèse de doctorat es Science de la vie et de la santé Université de Franche-Comté. 2007:392.
78. Harrison XA. Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ*. 2014; 2:e616. doi: [10.7717/peerj.616](#) PMID: [PMC4194460](#).
79. Crawley MJ. The R book: Wiley; 2 edition.; 2012. 1076 p.

80. Hilbe JM. Negative binomial regression: Cambridge University Press; 2011. 553 p.
81. Richards SA. Dealing with overdispersed count data in applied ecology. *J Appl Ecol*. 2008; 45(1):218–27.
82. Peters J, Conte A, Van doninck J, Verhoest NEC, De Clercq E, Goffredo M, et al. On the relation between soil moisture dynamics and the geographical distribution of *Culicoides imicola*. *Ecohydrology*. 2014; 7(2):622–32. doi: [10.1002/eco.1383](https://doi.org/10.1002/eco.1383)
83. Bishop AL, McKenzie HJ, Barchia IM, Spohr LJ. Moon phase and other factors affecting light-trap catches of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *Aust J Entomol*. 2000; 39:29–32. PMID: [ISI:000085460500006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/100085460/).
84. Blackwell A. Diel flight periodicity of the biting midge *Culicoides impunctatus* and the effects of meteorological conditions. *Med Vet Entomol*. 1997; 11(4):361–7. PMID: [9430116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9430116/).
85. Walker AR. Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. *Bull ent Res*. 1977; 67:217–33.
86. De Liberato C, Farina F, Magliano A, Rombola P, Scholl F, Spallucci V, et al. Biotic and abiotic factors influencing distribution and abundance of *Culicoides obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae) in central Italy. *J Med Entomol*. 2010; 47(3):313–8. PMID: [20496577](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20496577/).
87. Guis H, Tran A, de La Rocque S, Baldet T, Gerbier G, Barragué B, et al. Use of high spatial resolution satellite imagery to characterize landscapes at risk for bluetongue. *Vet Res*. 2007; 38(5):669–83. PMID: [17583664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17583664/).
88. Searle KR, Barber J, Stubbins F, Labuschagne K, Carpenter S, Butler A, et al. Environmental Drivers of *Culicoides* Phenology: How Important Is Species-Specific Variation When Determining Disease Policy? *PLoS ONE*. 2014; 9(11):e111876. doi: [10.1371/journal.pone.0111876](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111876) PMID: [25386940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25386940/)
89. Guis H, Caminade C, Calvete C, Morse AP, Tran A, Baylis M. Modelling the effects of past and future climate on the risk of bluetongue emergence in Europe. *J Roy Soc Interface*. 2011. Epub Published online 22 June 2011 in advance of the print journal. doi: [10.1098/rsif.2011.0255](https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0255)
90. Hartemink NA, Purse BV, Meiswinkel R, Brown HE, de Koeijer A, Elbers ARW, et al. Mapping the basic reproduction number (R0) for vector-borne diseases: A case study on bluetongue virus. *Epidemics*. 2009; 1(3):153–61. doi: [10.1016/j.epidem.2009.05.004](https://doi.org/10.1016/j.epidem.2009.05.004) PMID: [21352762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21352762/)

Publications en cours:

Annexe 6

Bakhoun, M.T. **Fall, M.** Seck, M.T. Garros, C. Gardès, L. Fall, A.G. Diop, M. Mall, I. Balenghien, T. Baldet, T. Gimonneau, G. Bouyer, J. **Foraging range of medically important arthropods: new insights for *Culicoides* Latreille biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) using the ring method.** Ce papier sera soumis à la revue “Behavioural Ecology”

Annexe 7

Venail, R. Lhoir, J. **Fall, M.** Del Río, R. Talavera, S. Labuschagne, K. Miranda, M. Pagès, N. Venter, G. Rakotoarivony, I. Allène, X. Scheid, B. Gardes, L. Gimonneau, G. Lancelot, R. Garros, C. Cêtre-Sossah, C. Balenghien, T. Carpenter, S. Baldet, T. **Insecticide susceptibility of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae).** Ce papier est soumis à la revue Parasites and Vectors.

Communications orales ou affichées

Fall M, Bakhoun MT, Garros C, Diouf ND, Seck MT, Bouyer J, Ndao M, Dusom AM, Diarra M, Baldet T, Balenghien T, Delécolle JC, Fall AG. **The *Culicoides* species (Diptera : Ceratopogonidae) of Senegal: towards identifying the vectors of African horse sickness virus, 40 years after the first studies.** Présentation sous forme de poster au congrès E-SOVE (European Society for Vector Ecology) à Montpellier du 8 au 11 Octobre 2012

Fall M, Garros C, Diouf ND, Seck MT, Bouyer J, Ndao M, Dusom AM, Allene X, Rakotoarivony I, Diarra M, Baldet T, Balenghien T, Delecolle JC, Fall AG. **Vers l'identification des vecteurs de la peste équine au Sénégal, 40 ans après les premières études.** Présentation orale au SOAP (Société Ouest Africaine de Parasitologie) du 18-20 Décembre 2012 à l'UCAD

Fall M, Fall AG, Diarra M, Bouyer J, Seck MT, Balenghien T, Lancelot R, Garros C, Faye O, Baldet T. **Identification of potential *Culicoides* vectors of African horse sickness and bluetongue in Senegal and Susceptibility to insecticides (a.i.).** Présentation orale au meeting annuel d'EDENext de Barcelone en mars 2013.

Diarra M, **Fall M**, Fall AG, Diop A, Lancelot R, Seck MT, Mall I, Dosum AM, Ndao M, Garros C, Allène X, Rakotoarivony I, Bouyer J, Guis H. **Modelling the dynamics and spatial distribution of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges, potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in Senegal.** Poster; *19th European Society for Vector Ecology Conference*, Thessaloniki, Greece, October 2014.

Fall M, Diarra M, Fall AG, Seck MT, Bouyer J, Balenghien T, Lancelot R, Garros C, Bakhoun MT, Faye O, Gimonneau G, Baldet T. **Host preferences and circadian rhythm of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in Senegal.** Présentation orale au meeting annuel d'EDENext le 21-23 Mars 2015 à Heraklion en Grece.

Diarra M, **Fall M**, Fall AG, Diop A, Lancelot R, Seck MT, Mall I, Dosum AM, Ndao M, Garros C, Allène X, Rakotoarivony I, Bouyer J, Guis H. **Modelling the dynamics and spatial distribution of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges, potential vectors of African horse sickness and bluetongue viruses in Senegal.** Poster, au meeting annuel d'EDENext le 21-23 Mars 2015 à Heraklion en Grece.

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Entomologie

Résumé

Nom et prénoms du Candidat : Moussa FALL

Titre de la thèse: Ecologie et lutte contre les *Culicoides* vecteurs de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine au Sénégal

Date et lieu de soutenance : 22 / 05 / 2015 à la FST/UCAD, Dakar

Jury :	Président :	Pr Bhen Sikina Toguebaye	FST/UCAD
	Membres :	Dr Roch kounbobr Dabiré	IRSS/Burkina Faso
		Dr Oubri Bassa Gbati	EISMV/UCAD
		Dr Jeremy Bouyer	UMR CMAEE/ Cirad, Montpellier (France)
		Dr Momar Talla Seck	ISRA/LNERV
		Pr Ousmane Faye	FST/UCAD
		Dr Thierry Baldet	UMR CMAEE/ Cirad, Montpellier (France)

Résumé

Depuis la mise en évidence de l'implication d'un insecte dans le cycle parasitaire et la dissémination d'une maladie, la lutte contre ces insectes est devenue une alternative pour contrôler les maladies à transmission vectorielle. La peste équine africaine est un exemple de maladie à transmission vectorielle dont l'agent causal, un virus, est transmis aux chevaux par les *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae). C'est une maladie endémique au Sénégal (Afrique de l'Ouest) et la dernière épidémie date de 2007 avec la mort de 1 169 chevaux pour un coût total estimé à 1,4 millions d'Euros. En Afrique du Sud, les vecteurs impliqués dans la transmission de la peste équine africaine sont *Culicoides imicola* et *C. bolitinos* mais les espèces vectrices au Sénégal n'ont pas encore été déterminées. En outre, la lutte contre les *Culicoides* vecteurs reste très limitée par le manque de connaissances sur leur bio-écologie et faute de méthodes opérationnelles efficaces. Depuis 2011, plusieurs études ont été menées dans la région des Niayes du Sénégal pour une meilleure connaissance de l'identité des espèces vectrices et de leur bio-écologie afin d'élaborer des stratégies de lutte antivectorielle adaptées au contexte local. Ces études ont permis d'identifier 41 espèces dont 19 espèces nouvelles pour le Sénégal, portant la liste des *Culicoides* à 53 espèces recensées dans le pays. Parmi ces espèces nouvelles, se trouve *C. oxystoma* identifiée pour la première fois en région Afro-tropicale et aussi *C. bolitinos* le second vecteur du virus de la peste équine en Afrique du Sud. Ces travaux ont permis de mettre en évidence *C. oxystoma*, *C. imicola* et *C. kingi* comme les vecteurs potentiels de la peste équine africaine dans les Niayes. *Culicoides oxystoma* et *C. imicola* présentent des préférences trophiques orientées sur les chevaux avec des activités de vol crépusculaire et nocturne respectivement, la première espèce pouvant également être active le matin sous certaines conditions favorables de température et d'hygrométrie. Par contre, *C. kingi* préfère plutôt les bovins mais présente un comportement opportuniste en l'absence des hôtes privilégiés. Ces trois espèces incriminées présentent une sensibilité aux trois matières actives insecticides testées : la deltaméthrine a été le principe actif le plus toxique suivi de la perméthrine et du chlorpyrifos. On note toutefois une sensibilité réduite de *C. kingi* à la deltaméthrine. Les études préliminaires d'efficacité de produits insecticides (pour-on, moustiquaires imprégnées) que nous avons réalisées sur le terrain n'ont pas été très concluantes et soulignent la nécessité de poursuivre ces investigations dans le futur. D'autres études complémentaires apparaissent indispensables pour explorer au laboratoire la compétence vectorielle des espèces incriminées vis-à-vis du virus de la peste équine et identifier sur le terrain leurs gîtes larvaires et de repos.

Mots clés : peste équine africaine, *Culicoides oxystoma*, *C. imicola*, *C. kingi*, rôle vecteur, écologie, lutte antivectorielle, zone des Niayes, Sénégal.

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Entomologie

Résumé

Nom et prénoms du Candidat : Moussa FALL

Titre de la thèse: Ecologie et lutte contre les *Culicoides* vecteurs de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine au Sénégal

Date et lieu de soutenance : 22 / 05 / 2015 à la FST/UCAD, Dakar

Jury :	Président :	Pr	Bhen Sikina Toguebaye	FST/UCAD
	Membres :	Dr	Roch kounbobr Dabiré	IRSS/Burkina Faso
		Dr	Oubri Bassa Gbati	EISMV/UCAD
		Dr	Jeremy Bouyer	UMR CMAEE/ Cirad, Montpellier (France)
		Dr	Momar Talla Seck	ISRA/LNERV
		Pr	Ousmane Faye	FST/UCAD
		Dr	Thierry Baldet	UMR CMAEE/ Cirad, Montpellier (France)

Abstract

Since the discovery of the implication of an insect in the transmission and the spread of a parasitic disease, the fight against these insects has become an alternative to control vector-borne diseases. African horse sickness (AHS) is an example of a vector-borne disease whose causative agent, a virus, is transmitted to horses by *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). AHS is endemic in Senegal (West Africa) and the last outbreak date to 2007 with 1,169 died horses, entailing an estimated cost of 1.4 million Euros. In South Africa, species involved in the transmission of African horse sickness are *C. imicola* and *C. bolitinos* but in Senegal *Culicoides* vectors have not been determined yet. In addition, the fight against *Culicoides* vectors is very limited by the lack of knowledge of their bio-ecology and the absence of effective operational control methods. Since 2011, extensive investigations have been performed in the Niayes region of Senegal to better knowledge about *Culicoides* vectors species and their bio-ecology to develop vector control strategies adapted in this local context. These studies have identified 41 species, including 19 new species for Senegal, updating to 53 the list of *Culicoides* species recorded in the country. The new species include *C. oxystoma* identified for the first time in the Afro-tropical region and *C. bolitinos* the second vector of African horse sickness virus in South Africa. These studies have highlighted *C. oxystoma*, *C. imicola* and *C. kingi* as potential vectors of African horse sickness in the Niayes region. *Culicoides oxystoma* and *C. imicola* have a host preference for horses with crepuscular and nocturnal activity, respectively, the first species may also be active in the morning under certain favorable conditions of temperature and humidity. In contrast, *C. kingi* prefers the cattle but presents an opportunistic behavior in case of absence of preferred host. The three species of interest exhibit a sensitivity to the three active ingredients of insecticides tested: deltamethrin was the most toxic active ingredient followed by permethrin and chlorpyrifos. However, a reduced sensitivity of *C. kingi* has been observed to deltamethrin. Preliminary studies of the efficacy of insecticide products (pour-on, treated nets) conducted in the field have not been very successful and need further investigations in the future. Additional studies appear essential to explore in the laboratory the vector competence of local *Culicoides* species for AHS virus and identify in the field their breeding and resting sites.

Keywords: African horse sickness, *Culicoides oxystoma*; *C. imicola*; *C. kingi*; vector role; ecology; vector control; Niayes region; Senegal.